

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postepy Biochemii

POSTSAM
(217-392) (1985)

1985

tom 31 nr 2

PL ISSN 0032-5422



Pw

<http://rcin.org.pl>

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1985 TOM 31 ZESZYT 2

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 31 (2)
(217-392) (1985)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (Poznań)

Zastępca przewodniczącego: I. Szumiel (Warszawa)

Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)

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

REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

SEKRETARZ REDAKCJI

J. Tępińska

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

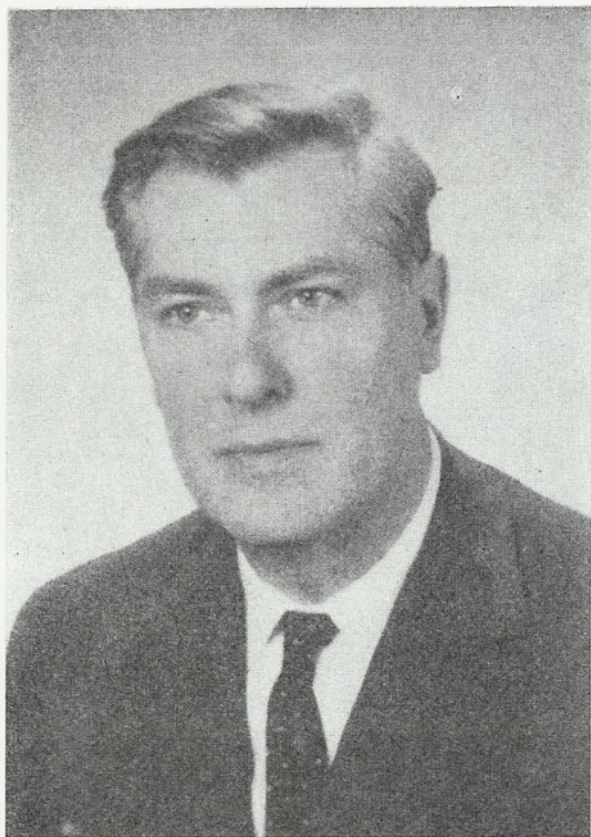
Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1985

| | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Nakład 2010 (1915+95) | Oddano do składania 1985.03.20 |
| Ark. wyd. 13,25; ark. druk. 11,0 | Podpisano do druku w sierpniu 1985 r. |
| Pap. druk. sat. kl. IV 70 g, 70×100 | Druk ukończono w październiku 1985 r. |
| Zam. 313/12/85 | Cena zł 120,— |

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa



PROFESOR DR HAB. JÓZEF CHMIEL
1924—1984

Dnia 6 kwietnia 1984 roku zmarł w wieku 59 lat profesor zwyczajny dr hab. Józef Chmiel, wybitny biochemik i analityk kliniczny, kierownik Katedry Biochemii i Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Profesor Chmiel uzyskał w 1952 roku dyplom lekarza medycyny, a w 1955 roku stopień mgr chemii. Stopień naukowy doktora medycyny uzyskał w 1960 roku, a doktora habilitowanego w 1962 roku. W 1970 roku uzyskał tytuł naukowy profesora nadzwyczajnego, a w 1980 roku profesora zwyczajnego.

Już jako student III roku medycyny rozpoczął pracę w Katedrze Chemii Fizjologicznej, gdzie zajął się badaniami, które stanowiły temat jego zainteresowań do końca życia, a mianowicie charakterystyką fizykochemiczną i metabolizmem krwinek czerwonych. Poza tym z dużym zaangażowaniem i umiejętnością zajmował się pracą dydaktyczną, prowadząc zajęcia ze studentami Wydziału Lekarskiego, Oddziału Stomatologii i Wydziału Farmaceutycznego.

W latach 1958—1959 przebywał jako stypendysta Fundacji Rockefellera na studiach w Stanach Zjednoczonych, gdzie w Pracowni prof. Gibsona w Uniwersytecie Harvarda oraz w Pracowni dr Bartletta w San Diego zajmował się metabolizmem tkankowym. Podczas pobytu w USA rozpoczął badania związków fosforanowych w krwinkach czerwonych, które ukończył po powrocie do kraju i które stały się podstawą dla uzyskania stopnia doktora habilitowanego.

Po otrzymaniu w 1963 roku stanowiska docenta etatowego w Katedrze Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego objął kierownictwo utworzonego w tym samym roku Zakładu Biochemii Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Poznaniu, który zorganizował i prowadził do końca swego życia. W Zakładzie tym rozwinął działalność naukową i dydaktyczną, kontynuując poprzednio prowadzone badania nad metabolizmem krwinek czerwonych, poszerzając je o obserwacje wpływu cytostatyków na te komórki. Umiał zawsze wyeksponować wartość praktyczną i użyteczność diagnostyczną prowadzonych pod jego kierunkiem badań. Jego dorobek naukowy obejmuje około 100 publikacji, w tym ponad 60 prac doświadczalnych. Był wielokrotnie nagradzany za działalność naukową, w tym również nagrodą zespołową I stopnia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej.

Był promotorem 19 prac doktorskich i patronem 2 przewodów habilitacyjnych.

Podczas swej długoletniej pracy nie tylko przekazywał wiedzę biochemiczną licznym rzeszom studentów, ale również jako specjalista wo-

jewódzki uczestniczył w wykształceniu wielu wartościowych analityków — lekarzy i farmaceutów — podnosząc w ten sposób poziom pracy laboratoriów naukowych i diagnostycznych. Przez wiele lat był przewodniczącym Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej oraz założycielem Oddziału Poznańskiego tego Towarzystwa.

Profesor Chmiel sprawował od 1966 roku przez 18 lat funkcję prodziekana Wydziału Farmaceutycznego, a od 1979 roku także kierownika Oddziału Analityki Medycznej utworzonego przy tym Wydziale. Nie doznał niestety ukończenia studiów przez pierwszych absolwentów wspomnianego Oddziału, którego był głównym organizatorem.

Był odznaczony Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski oraz szeregiem medali i odznaczeń.

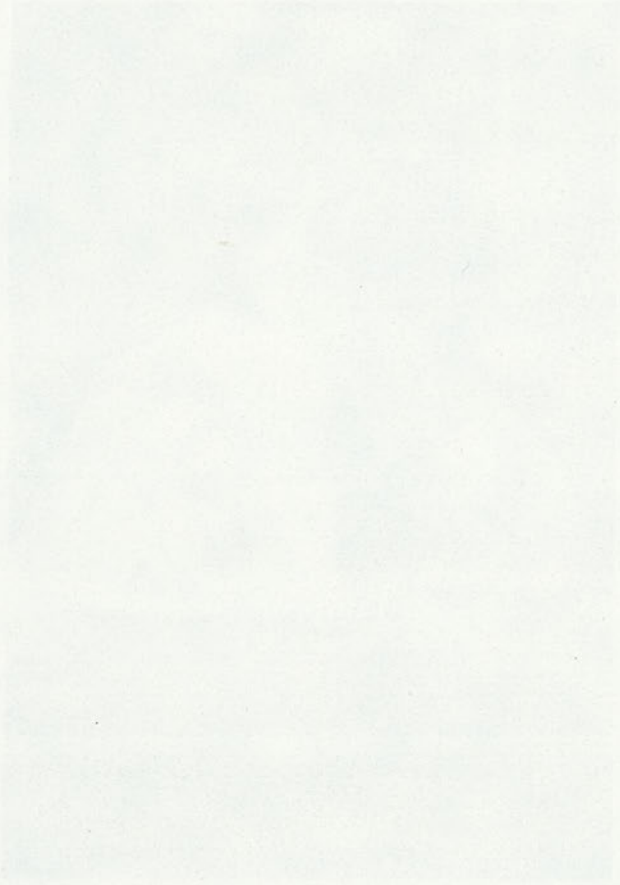
Profesor Chmiel był aktywnym członkiem licznych towarzystw naukowych krajowych i zagranicznych uczestnicząc w wielu konferencjach i zjazdach naukowych, a także sam je organizując. W różnych okresach był również członkiem kolegiów redakcyjnych kilku czasopism naukowych w tym także „Postępów Biochemii”.

Mimo ciężkiej choroby, z której rozwoju zdawał sobie doskonale sprawę, zachował — tak charakterystyczną dla niego — pogodę ducha i nie przerywał pracy do ostatnich dni swego życia.

Żegnamy profesora Chmiela z głębokim żalem i świadomością tego, że z jego śmiercią straciliśmy nie tylko wybitnego działacza, ale również człowieka o wielkim sercu i prawdziwego przyjaciela.



PROFESOR DR HAB. MARIA SARNECKA-KELLER
1925—1984



W dniu 3 lipca 1984 roku zmarła w Krakowie profesor dr hab. Maria Sarnecka-Keller, wybitna uczona, profesor Uniwersytetu Jagiellońskiego, kierownik Zakładu Biochemii Zwierząt Instytutu Biologii Molekularnej i były dyrektor tego Instytutu.

Urodziła się w Błazowej koło Rzeszowa, ale całe Jej życie było związane z Krakowem. Tutaj w czasie wojny uzyskała dyplom technika-chemika uczęszczając równocześnie na tajne komplety liceum matematyczno-fizycznego. Jesienią 1945 roku rozpoczęła studia na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Uniwersytetu Jagiellońskiego. Dyplom magistra filozofii z zakresu chemii uzyskała w 1950 roku. Jeszcze jako studentka zaczęła pracować w Uniwersytecie Jagiellońskim w Zakładzie Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego, przeniesionego później do nowo zorganizowanej Akademii Medycznej. Osobowość kierującego wówczas jej pracą profesora Bolesława Skarżyńskiego wpłynęła nie tylko na ukierunkowanie Jej pracy badawczej, lecz także na zainteresowanie historią nauki. Jej nieprzeciętne zdolności zostały szybko docenione i nie miała jeszcze ukończonych 30 lat, gdy powierzono Jej samodzielne prowadzenie wykładów i egzaminowanie studentów medycyny z kursowego przedmiotu „Chemia ogólna”. W 1964 roku przedstawiła rozprawę habilitacyjną pt.: „Peptydy moczu i osocza krwi” i wkrótce potem rozpoczęła pracę w Uniwersytecie Jagiellońskim prowadząc zajęcia z biochemii dla studentów Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi. W latach 1965—66 zorganizowała przy udziale profesora Ignacego Reifera Katedrę Biochemii i Biofizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego. Była współtwórcą z profesorem Janem Zakrzewskim Instytutu Biologii Molekularnej UJ, w którym następnie kierowała przez 14 lat Zakładem Biochemii Zwierząt. W 1972 roku została profesorem, a w latach 1972—77 była dyrektorem Instytutu, a w maju 1981 roku została wybrana prorektorem Uniwersytetu Jagiellońskiego. Była pierwszą kobietą piastującą tę godność w 620-letniej historii uczelni i zdobyła sobie powszechne uznanie dzięki prawości postępowania oraz rzetelności pracy, w której była głęboko zaangażowana do ostatnich dni swego życia.

Poza Uczelnią profesor Sarnecka-Keller działała przez wiele lat w Polskim Towarzystwie Biochemicznym i Polskim Towarzystwie Chemicznym, w Komitecie Biochemii i Biofizyki PAN oraz Komisji Biochemicznej krakowskiego Oddziału PAN. Jej działalność naukowa, organizacyjna i wychowawcza została wyróżniona wielokrotnie nagrodami Ministra Nauki, Szkolnictwa Wyższego i Techniki, Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski i honorowym tytułem Zasłużony Nauczyciel PRL.

Zainteresowania naukowe profesor Marii Sarneckiej-Keller dotyczyły głównie właściwości fizykochemicznych i funkcji biologicznych peptydów i glikoprotein występujących w płynach ustrojowych i błonach biologicznych. Opublikowała z tego zakresu 52 prace eksperymentalne, w większości w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, o ponadto 25 artykułów przeglądowych. Tematyka tych prac nie ograniczała się do biochemii, ale w wielu przypadkach nawiązywała do medycyny i patologii molekularnej: od pierwszych publikacji dotyczących aminoacidurii po ostatnie prace poświęcone cukrzycy. Wynikało to nie tylko z początkowej działalności na Akademii Medycznej w Zakładzie profesora Skarżyńskiego, ale także z umiejętności szerokiej współpracy i organizacji badań interdyscyplinarnych. Szerokość horyzontów umysłowych profesor Sarneckiej-Keller potwierdzają także Jej publikacje z zakresu historii nauki, w których zwracała uwagę na wkład polskich uczonych w tworzenie podstaw światowej chemii i biochemii. Należy tu wymienić monograficzne opracowania i artykuły popularnonaukowe poświęcone Jędrzejowi Śniadeckiemu i Leonowi Marchlewskiemu.

Ostatnio jeszcze podjęła wspólnie z gronem swych współpracowników organizację specjalistycznego sympozjum poświęconego cukrzycy, które odbędzie się w 1985 roku podczas XXI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Krakowie.

Bardzo owocna była również działalność dydaktyczna i szkoleniowa profesor Marii Sarneckiej-Keller. Jej wykłady zawsze starannie przygotowane były jednocześnie rzeczowe i niezwykle interesujące, bez względu na to czy dotyczyły specjalistycznych zagadnień, czy podstawowego kursu biochemii, czy popularyzacji nauki — nic więc dziwnego, że zawsze gromadziły komplet słuchaczy. Profesor Sarnecka-Keller była założycielką i długoletnim redaktorem serii „Biologia Molekularna” Zeszytów Naukowych UJ, autorem i redaktorem 5 skryptów akademickich i współautorem dwukrotnie wznawianego podręcznika „Cytologia i Histologia”. Wychowała całą rzeszę biologów, z pośród których już promowała 8 doktorów i była opiekunką 2 zakończonych przewodów habilitacyjnych, ale dalsze doktoraty i habilitacje Jej wychowanków są kwestią najbliższej przyszłości. Miała niezwykle dar mobilizowania do pracy naukowej i szczerze cieszyła się sukcesami nie tylko uczniów i najbliższych współpracowników, ale także innych kolegów w Instytucie, którzy darzyli Ją ogromnym szacunkiem. Dzięki inicjatywie i umiejętności podejmowania wyważonych i obiektywnych decyzji potrafiła wytworzyć w kierowanym przez siebie Zakładzie niepowtarzalny klimat zaufania i harmonijnej współpracy.

W pamięci najbliższych współpracowników pozostanie profesor Maria Sarnecka-Keller nie tylko jako wybitny naukowiec, ale także jako świetny organizator, serdeczny opiekun i mądry doradca.

ARTYKUŁY

*Profesorowi
Bronisławowi Filipowiczowi
w osiemdziesięciolecie urodzin,
pracę swoją dedykują*

Autorzy

GRZEGORZ BARTOSZ ^{*)}, WANDA LEYKO ^{**)}

Białko błony erythrocytu przenoszące aniony

Anion transport protein of the erythrocyte membrane

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Otrzymywanie białka przenoszącego aniony
- III. Struktura białka przenoszącego aniony
- IV. Położenie białka przenoszącego aniony w błonie
- V. Transport anionów
- VI. Białko przenoszące aniony a transport glukozy i transport wody
- VII. Oddziaływanie białka przenoszącego aniony z białkami szkieletu komórkowego
- VIII. Wiązanie enzymów glikolitycznych i hemoglobiny
- IX. Domenowy charakter białka przenoszącego aniony
- X. Możliwości regulacji funkcji białka przenoszącego aniony *in situ*
- XI. Białko przenoszące aniony a „antygen starych komórek”
- XII. Białka pokrewne białku przenoszącemu aniony

Contents

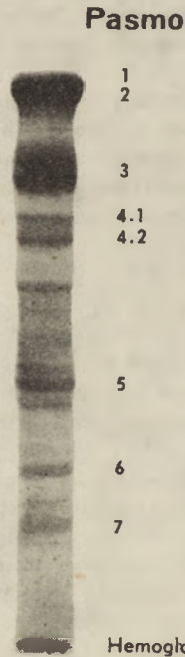
- I. Introduction
- II. Isolation of the anion transport protein
- III. Structure of the anion transport protein
- IV. Arrangement of the anion transport protein in the membrane
- V. Anion transport
- VI. Anion transport protein an the transport of glucose and water
- VII. Interaction of the anion transport protein with cytoskeleton proteins
- VIII. Binding of glycolytic enzymes and hemoglobin
- IX. Domain structure of the anion transport protein
- X. Possible control of the anion transport protein function *in situ*
- XI. Anion transport protein and the „senescent cell antigen”
- XII. Proteins related to the anion transport protein

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

Wykaz stosowanych skrótów: ATP — adenozynotrifosforan; ATPaza — adenozynotrifosfataza; BPA — białko przenoszące aniony; CH-8, CH-15, CH-17, CH-38, CH-55 — fragmenty BPA otrzymywane w wyniku trawienia chymotrypsyną, o masach cząsteczkowych odpowiednio 8000, 15 000, 17 000, 38 000 i 55 000, CN-23 — fragment BPA o masie cząsteczkowej 23 000 otrzymywany w wyniku S-cyjanylacji fragmentu TR-41; DAEA-celuloza — dietyloaminoetyloceluloza; DIDS — 4'4-diizotiocyanianostilbeno-2,2'-disulfonian; 2,3-DPG — 2,3-difosfoglicerynian; DTNB — 5'5-diitiobis-(2-nitrobenzoesan); EDTA — etylenodiaminotetraoctan; Fuk — fukoza; GluNac — N-acetyloglukozoamina; G3PDH — dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; H₂DIDS — 4,4'-diizotiocyaniano-1,2-difenyloetano-2,2'-disulfonian; Man — mannoza; NAD, NADP, NADPH — odpowiednio: dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, jego fosforan i zredukowana forma tego fosforanu; NAP-tauryna — N-(4-azydo-2-nitrofenylo)-2-aminoetylosulfonian; NEM — N-etylomaleimid; NTCB — 2-nitro-5-tiocyanianobenzoesan; P5 — fragment BPA o masie cząsteczkowej 5000 otrzymywany po trawieniu błon erytrocytów pepsyną; SDS — sól sodowa siarczanu dodecyłu; SITS — 4-acetamido-4'-izotiocyanianostilbeno-2,2'-disulfonian; TR-16, TR-22, TR-41, TR-52 — fragmenty BPA otrzymywane po trawieniu błon erytrocytów trypsyną, o masach cząsteczkowych odpowiednio 16 000, 22 000, 41 000 i 52 000.

I. Wstęp

Charakterystyczną cechą elektroferogramów białek błon erytrocytów ssaków, otrzymanych w wyniku rozdzielania w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS jest obecność szerokiego pasma odpowiadającego za 1/4 całkowitej zawartości białka błon (Ryc. 1). Jest to trzecie główne pasmo



Ryc. 1. Elektroferogram białek błon erytrocytów człowieka otrzymany w wyniku rozdzielania w 10% żelu poliakrylamidowym w obecności SDS. Numeracja pasm według nomenklatury Stecka (20) (zob. *Post. Bioch.* 28 (1982) 251—277).

tych elektroferogramów, licząc w kierunku rosnącej ruchliwości elektroforetycznej, stąd też główne białko tego pasma określane jest mianem „białka pasma 3” (ang. „band 3 protein”) (1). Inne, dawniej stosowane nazwy tego białka, takie jak „składnik a” (2) lub „składnik E” białek błony erythrocytu (3, 4) dziś praktycznie wyszły już z użycia. Trzecie główne pasmo elektroferogramów błony plazmatycznej erythrocytu jest heterogenne i zawiera m.in. ufosforylowaną formę (Na^+ , K^+)-ATPazy (5), a w przypadku erythrocytów ludzkich może zawierać także glikoforynę. Jednak co najmniej 90% tego pasma stanowi główne białko integralne błony erythrocytarnej i większość autorów do niego właśnie ogranicza nazwę „białka pasma 3” (6).

Białko to wzbudza ożywione zainteresowanie membranologów, głównie ze względu na różnorodne pełnione i przypisywane mu funkcje. Jest ono odpowiedzialne za wymianę anionów poprzez błonę erythrocytu i, jak się wydaje, jest to jego zasadnicza funkcja fizjologiczna. Z tego względu coraz powszechniej określane jest mianem „białka przenoszącego aniony”; nazwa ta, zwykle w formie skrótu (BPA) będzie konsekwentnie stosowana w niniejszym artykule. Białko to jest miejscem wiązania enzymów glikolitycznych i hemoglobiny z błoną erythrocytu oraz elementem błony, w którym zakotwiczony jest białkowy „szkielet” krwinki. Jest jednym z nośników determinantów antygenowych układów grup krwi I i Rh. W myśl współczesnej koncepcji immunologicznego rozpoznawania starych erythrocytów, białko to jest prekursorem „antygeny starych komórek”.

II. Otrzymywanie białka przenoszącego aniony

Stosowane metody otrzymywania w stanie czystym BPA i jego fragmentów są zwykle kombinacjami kilku podstawowych procedur takich jak:

— Ekstrakcja białek peryferycznych błony w warunkach stosunkowo łagodnych (np. działaniem izotonicznego roztworu NaCl lub roztworu EDTA o niskiej sile jonowej (5, 7) lub bardziej drastycznych (np. działaniem $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ roztworu NaOH, 10% roztworu kwasu octowego (8) lub bezwodnika kwasu 2,3-dimetylomaleinowego (9)),

— Ekstrakcja sjałoglikoprotein błony za pomocą roztworów detergentów niejonowych o niskich stężeniach (10) lub dijudosalicylanu litu (7),

— Rozpuszczenie pozostałych białek błony w roztworze detergentu niejonowego o wyższym stężeniu lub detergentu denaturującego (SDS) i chromatografia (jonowymienna na złożach takich jak aminoetyloceluloza (5), DEAE-celuloza (11) lub Affi-Gel 102 (12), adsorpcyjna na złożach takich jak hydroksyapatyt lub Cellex D (13, 14), kowalencyjna na tiolesefariozie (9, 11), sączenie molekularne (4, 7, 13, 15) lub chromatografia powinowactwa na immobilizowanych lektynach typu konkanawaliny A lub lektyny rącznika (16, 17)) bądź elektroforeza preparatywna (18, 19).

III. Struktura białka przenoszącego aniony

Białko przenoszące aniony jest głównym białkiem integralnym błon krwinek czerwonych ssaków, przechodzącym przez dwuwarstwę lipidową błony i eksponowanym po obu jej stronach. Jest ono glikoproteiną. W błonie erythrocytu człowieka znajduje się ok. 1,2 miliona monomerów BPA (2). Na podstawie ruchliwości elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS masę cząsteczkową BPA szacuje się na 88 000—105 000 (8, 20). Zwykle przyjmuje się, że masa cząsteczkowa polipeptydowego składnika BPA błon erythrocytów człowieka wynosi $93\,000 \pm 3000$ (8). Na elektroferogramach BPA widoczne jest jako charakterystyczne szerokie, asymetryczne pasmo o ostrej przedniej a rozmytej tylnej krawędzi (Ryc. 1). Szerokość pasma sugeruje heterogenność białka. Przyczyną tej heterogenności nie jest zmienność struktury polipeptydu ani występowanie równowagi asocjacyjnej, lecz różnicowanie stopnia glikozylacji. Wykazano bowiem identyczność map peptydowych wyeluowanych z żelu frakcji BPA o ruchliwościach elektroforetycznych odpowiadających masom cząsteczkowym 88 000, 93 000 i 98 000 (22), natomiast wyższą zawartość cukrowców we frakcji białka pasma 3 o niższej ruchliwości elektroforetycznej (5).

Skład aminokwasowy BPA (Tab. 1), podobnie jak i wielu innych białek integralnych błon, charakteryzuje się jedynie niewielkim podwyższeniem zawartości aminokwasów hydrofobowych i niepolarnych w porównaniu z typowymi niebłonowymi białkami globularnymi (25). Widma dichroizmu kołowego BPA w roztworze detergentu niedenaturującego wskazują na stosunkowo wysoką zawartość struktury α -helikalnej (ok. 43%) (5).

Cukrowce odpowiadają za 5—8% masy glikoproteiny (5, 23). Dane dotyczące składu sacharydowego BPA są w znacznym stopniu rozbieżne, wszystkie jednak potwierdzają znaczną zawartość galaktozy i N-acetyloglukozoaminy, natomiast niską zawartość lub brak N-acetylogalaktozaminy i kwasu sjałowego (Tab. 2). Wykazano, że cząsteczka BPA zawiera 2 łańcuchy oligosacharydowe, jeden o znacznej długości, a drugi krótki. Długi łańcuch wykazuje heterogenność, co jak się wydaje odpowiada za niejednorodność elektroforetyczną glikoproteiny (13). Frakcja BPA o wyższej ruchliwości elektroforetycznej (przednia krawędź pasma 3 na elektroferogramach błon) cechuje się niższą zawartością cukrowców (4,4%) niż frakcja o niższej ruchliwości (tylna krawędź pasma; 8,3%), co uwarunkowane jest głównie niższą zawartością galaktozy (odpowiednio 8 i 16 mmol/100 g białka) i N-acetyloglukozoaminy (odpowiednio 8,5 i 18 mmol/100 g białka) (28). Oba łańcuchy mają tę samą podstawową strukturę heksasacharydową: $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GluNAc}\beta 1-4(\text{Fuk}\alpha 1-6)\text{GluNAc}$ (29).

Erythrocyty osób o rzadkiej grupie krwi $\text{En}(a^-)$ nie zawierają glikoforyny, a ich BPA wykazuje znaczniejszy niż u osób mających inne grupy

Tabela 1

Skład aminokwasowy białka przenoszącego aniony z błon erytrocytów człowieka i erytrocytów krowy

| Aminokwas | Zawartość (mol%) Erytrocyt człowieka | | | | Erytrocyt krowy |
|----------------------|---|------|------|------|--------------------|
| Lys | 4,5 | 4,7 | 5,7 | 3,4 | 4,4 |
| His | 2,4 | 1,9 | 3,2 | 2,2 | 2,0 |
| Arg | 5,5 | 4,8 | 5,7 | 5,2 | 4,9 |
| Asx | 6,6 | 7,5 | 9,9 | 6,5 | 7,3 |
| Glx | 10,7 | 10,9 | 10,9 | 11,9 | 11,7 |
| | 29,7 | 29,8 | 34,9 | 29,2 | 30,3 |
| Thr | 5,0 | 5,3 | 5,8 | 5,0 | 5,2 |
| Ser | 6,3 | 5,8 | 5,2 | 6,8 | 5,9 |
| Pro | 5,1 | 5,5 | 5,0 | 5,7 | 7,7 |
| Gly | 7,4 | 7,5 | 9,2 | 7,7 | 7,2 |
| Ala | 7,5 | 8,3 | 10,7 | 7,4 | 6,0 |
| $\frac{1}{2}$ CySSCy | NO | 1,0 | 1,3 | 0,7 | 0,3 |
| | 31,3 | 33,4 | 37,2 | 33,3 | 32,3 |
| Val | 6,6 | 7,3 | 7,4 | 7,6 | 7,2 |
| Met | 2,9 | 1,9 | 2,3 | 2,2 | 1,7 |
| Ile | 5,1 | 4,7 | 4,3 | 4,7 | 5,2 |
| Leu | 15,3 | 14,1 | 10,8 | 13,4 | 14,6 |
| Tyr | 2,6 | 2,5 | 1,4 | 3,1 | 2,3 |
| Phe | 6,4 | 5,7 | 4,1 | 5,5 | 5,0 |
| Trp | NO | 0,7 | NO | 1,2 | 1,4 |
| | 38,9 | 36,9 | 30,3 | 37,7 | 37,4 |
| Źródło | (5) | (24) | (4) | (18) | (25) |

NO — nie oznaczano; Asx i Glx oznaczają Asp i Glu lub Asn i Gln

krwi stopień glikozylacji, w wyniku zwiększenia długości głównego łańcucha oligosacharydowego (13).

Jedną z podstawowych metod badania struktury i ułożenia BPA w błonie jest trawienie erytrocytów i cieni erytrocytów za pomocą enzymów proteolitycznych. Proteoliza BPA *in situ* ograniczona jest do kilku regionów w cząsteczce białka. Co najmniej dwa spośród nich ulegają działaniu proteaz o różnej specyficzności w miejscach na tyle sobie bliskich, że produkty otrzymane w wyniku działania różnych enzymów cechuje taka sama ruchliwość elektroforetyczna. Preparaty BPA wyodrębnionego z błony i rozpuszczonego w roztworach detergentów trawione są w sposób znacznie mniej wybiórczy, co sugeruje, że *in situ* regiony cząsteczki BPA podatne na proteolizę rozdzielone są przez fragmenty niedostępne dla proteaz (m.in. dzięki osłonie przez lipidy błony) (18).

Trawienie erytrocytów chymotrypsyną powoduje powstawanie z BPA fragmentów o masach cząsteczkowych 38 000 i 55 000 (oznaczanych zwykle CH-38 i CH-55). Fragment CH-38 zawiera główny, a fragment CH-55

krótszy łańcuch oligosacharydowy. Oba fragmenty pozostają związane z dwuwarstwą lipidową i nie można usunąć ich z błony za pomocą metod stosowanych do ekstrakcji białek peryferycznych (8, 30—32). Również działanie pronazy, papainy, termolizyny i subtylizyny na erythrocyty człowieka prowadzi do powstania fragmentów BPA o identycznych masach cząsteczkowych (3, 33, 34). Dłuższe trawienie komórek przy użyciu wyższych stężeń papainy redukuje fragment o masie cząsteczkowej 38 000 do krótszego peptydu o masie cząsteczkowej 30 000, a dłuższe trawienie chymotrypsyną otwartych (ang. leaky) cieni erythrocytów pozostawia z fragmentu CH-38 fragment znacznie krótszy, o masie cząsteczkowej ok. 8000 (35, 36).

Tabela 2

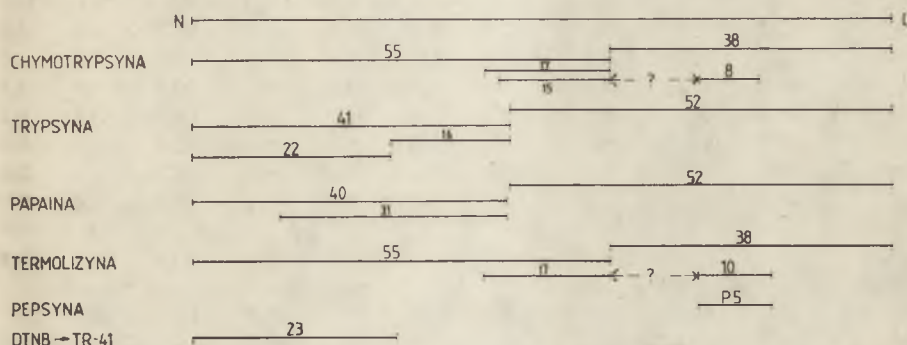
Skład sacharydowy białka przenoszącego aniony z błon erythrocytów człowieka

| Reszta sacharydowa | Zawartość (mol/mol BPA) | | | | | | |
|------------------------|-------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Fukoza | 8,3 | 2,5 | 0,75 | 1,4 | 4 | 7 | 0,5 |
| Mannoza | 8,3 | 7,2 | 3,4 | 4,3 | 7 | 5 | 3,2 |
| Galaktoza | 8,3 | 12 | 5,2 | 4,8 | 24 | 16 | 14,3 |
| N-acetyloglukozamina | 7,6 | 20 | 5,5 | 10,0 | 25 | 17 | 8,8 |
| N-acetylogalaktozamina | 0 | 0 | 0,87 | 3,2 | 4 | 2 | 0 |
| Kwas sjałowy | 1,8 | 0 | 0,87 | 0 | 5 | 5 | 1,8 |
| Razem | 34,3 | 41,7 | 16,6 | 23,7 | 69 | 52 | 28,6 |
| Źródło | (24) | (21) | (15) | (13) | (26) | (27) | (7) |

Łagodne trawienie wycinowanych (ang. inside-out) pęcherzyków błon erythrocytarnych chymotrypsyną, trypsyną lub papainą uwalnia rozpuszczalny fragment BPA o masie cząsteczkowej 41 000, pozostawiając związany z błoną fragment o masie cząsteczkowej 52 000 (8). Zwykle oznacza się te fragmenty symbolami TR-41 i TR-52, gdyż najczęściej otrzymuje się je w wyniku trawienia trypsyną; enzym ten, nie atakujący BPA na ekstracytoplazmatycznej powierzchni błony, może być użyty do trawienia łatwiejszych do otrzymania otwartych cieni erythrocytów dla uzyskania tych fragmentów. Dłuższe działanie trypsyny powoduje dalsze trawienie fragmentu TR-41, w wyniku którego powstają fragmenty o masach cząsteczkowych 22 000 i 16 000 (TR-22 i TR-16) (18). Fragment TR-41 zawiera 3 spośród 5 grup sulfhydrylowych BPA reaktywnych wobec NEM; 2 pozostałe znajdują się we fragmencie CH-38 (32, 77). Trawienie chymotrypsyną otwartych cieni erythrocytarnych redukuje fragment CH-55 do związanego w dalszym ciągu z błoną fragmentu o masie cząsteczkowej 17 000 (CH-17) składającego się ze 154 reszt aminokwasowych (18), a następnie nieco krótszego fragmentu o masie cząsteczko-

wej 15 000 (CH-15), złożonego ze 137 reszt aminokwasowych (35, 38). Fragmenty: CH-55, CH-17 i CH-15 zawierają region cząsteczki BPA wiążący inhibitory transportu anionów przez błonę erythrocytu będące pochodnymi stilbenu (np. DIDS, SITS) (6, 8, 35). Karboksypeptydaza A uwalnia tyrozynę zarówno z fragmentu CH-55, jak i z fragmentu CH-17 (18), co sugeruje, że oba te fragmenty mają wspólny C-koniec. Fragment o masie cząsteczkowej 17 000 uzyskuje się także w wyniku trawienia trypsyną otwartych cieni erythrocytów otrzymanych z krwinek poddanych działaniu chymotrypsyny (6).

Intensywne trawienie otwartych cieni erythrocytarnych termolizyną pozostawia związane z błoną fragmenty BPA o masach cząsteczkowych 17 000 i 10 000, a intensywne trawienie pepsyną — fragment P5, pokrywający się w znacznej mierze z mniejszym spośród fragmentów otrzymywanych w wyniku działania termolizyny (33, 34) (Ryc. 2).



Ryc. 2. Fragmentacja BPA przez enzymy proteolityczne i NTCB (na podstawie (8), (33) i (34)).

Skład aminokwasowy fragmentów BPA uzyskanych w wyniku trawienia enzymami proteolitycznymi, a także fragmentu o masie cząsteczkowej 23 000 otrzymanego w efekcie S-cyjanylacji fragmentu TR-41 za pomocą NTCB (CN-23) podany jest w Tabeli 3.

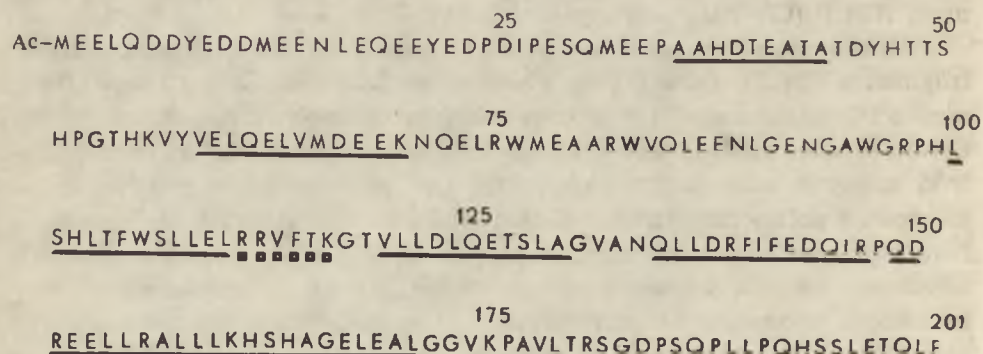
Ostatnio określono strukturę pierwszorzędową kilku fragmentów BPA: fragmentu CN-23, dwu krótkich odcinków fragmentu CH-15 oraz fragmentu P5. Sekwencja 33 N-końcowych reszt aminokwasowych fragmentu CN-23 (a więc i BPA) jest drugą w kolejności najbardziej kwasową spośród znanych sekwencji białek, ustępując pierwszeństwa jedynie fragmentowi δ polimerazy RNA z *Escherichia coli*. Nie stwierdzono znaczącej homologii pomiędzy sekwencją fragmentu CN-23, a żadną spośród znanych sekwencji aminokwasowych innych białek. Rzuca się natomiast w oczy homologia sekwencji 11 pierwszych i 11 następujących reszt aminokwasowych (Ryc. 3), sugerująca duplikację części genu odpowiedzialnego za syntezę tego białka w toku ewolucji. Zastosowanie metody prognozowania konformacji łańcuchowej w oparciu o strukturę pierwszorzędową wskazuje na możliwość występowania we fragmencie CN-23 kilku segmentów

Tabela 3

Skład aminokwasowy fragmentów białka przenoszącego aniony z błon erytrocytów człowieka

| Amino- kwas | Zawartość (ilość reszt/fragment) Fragment | | | | | | | | | |
|----------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | BPA | CH-55 | CH-38 | TR-41 | TR-16 | TR-22 | CN-23 | CH-15 | CH-17 | CH-9 |
| Lys | 27,9 | 12,7 | 14,8 | 15,7 | 2,5 | 6,3 | 5,8 | 5,3 | 7,2 | 5,3 |
| His | 18,0 | 8,7 | 7,2 | 11,4 | 4,2 | 7,7 | 7,8 | 2,1 | 1,8 | 2,6 |
| Arg | 43,5 | 24,5 | 16,5 | 18,8 | 7,1 | 10,2 | 9,6 | 1,4 | 4,5 | 4,0 |
| Asx | 54,1 | 31,5 | 21,2 | 29,5 | 9,1 | 17,2 | 16,4 | 9,3 | 10,6 | 7,6 |
| Glx | 99,4 | 63,7 | 30,9 | 55,8 | 24,0 | 33,5 | 38,0 | 14,7 | 11,1 | 10,4 |
| Thr | 41,7 | 27,0 | 21,2 | 19,9 | 6,4 | 11,7 | 13,0 | 8,5 | 9,4 | 3,3 |
| Ser | 56,3 | 34,4 | 23,9 | 21,8 | 9,3 | 9,6 | 12,1 | 10,9 | 10,8 | 1,9 |
| Pro | 47,8 | 29,1 | 23,2 | 20,3 | 10,8 | 9,0 | 10,2 | 7,5 | 4,2 | 3,4 |
| Gly | 64,3 | 38,6 | 26,7 | 23,4 | 10,5 | 11,6 | 11,4 | 13,8 | 24,0 | 11,7 |
| Ala | 61,4 | 35,2 | 26,0 | 27,6 | 11,3 | 15,4 | 13,7 | 10,9 | 12,5 | 11,6 |
| $\frac{1}{2}$ CySSCy | 5,8 | 3,0 | 2,3 | 4,3 | 1,4 | 1,0 | 1,3 | NO | NO | NO |
| Val | 62,9 | 31,4 | 29,9 | 23,2 | 9,7 | 12,1 | 11,3 | 11,2 | 11,3 | 6,6 |
| Met | 18,1 | 10,5 | 10,8 | 6,6 | 2,8 | 5,0 | 5,3 | 2,0 | 2,1 | 1,4 |
| Ile | 38,9 | 22,3 | 20,9 | 13,7 | 4,4 | 5,8 | 6,1 | 10,4 | 7,7 | 3,1 |
| Leu | 111,7 | 68,8 | 46,5 | 45,1 | 20,6 | 24,3 | 26,1 | 19,3 | 15,1 | 6,1 |
| Tyr | 25,9 | 14,5 | 6,6 | 8,9 | 3,5 | 5,3 | 6,3 | 5,5 | 2,3 | 0,9 |
| Phe | 45,8 | 32,2 | 18,9 | 13,9 | 6,3 | 6,6 | 6,7 | 11,5 | 8,4 | 2,8 |
| Trp | 9,9 | 3,8 | 1,2 | 4,5 | 0,3 | 2,4 | 3,6 | 2,8 | 2,6 | 0 |
| Razem | 833,4 | 491,4 | 346,6 | 364,4 | 144,2 | 194,7 | 204,7 | 153,6 | 136,7 | 83,8 |
| %H | 37,5 | 37,3 | 38,7 | 31,9 | 33,0 | 31,5 | 31,9 | 41 | 36 | 25 |
| Źródło | (18) | (18) | (18) | (18) | (18) | (18) | (18) | (35) | (35) | (35) |

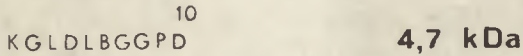
NO — nie oznaczano; %H — zawartość aminokwasów hydrofobowych (% molowy): Asx i Glx oznaczają Asp i Glu lub Asn i Gln



Ryc. 3. Struktura pierwszorzędowa fragmentu CN-23 BPA. Podkreślono reszty aminokwasowe tworzące prawdopodobnie segmenty α -helikalnej; ■ — reszty aminokwasowe tworzące prawdopodobnie segment o strukturze β . Na podstawie danych (39).

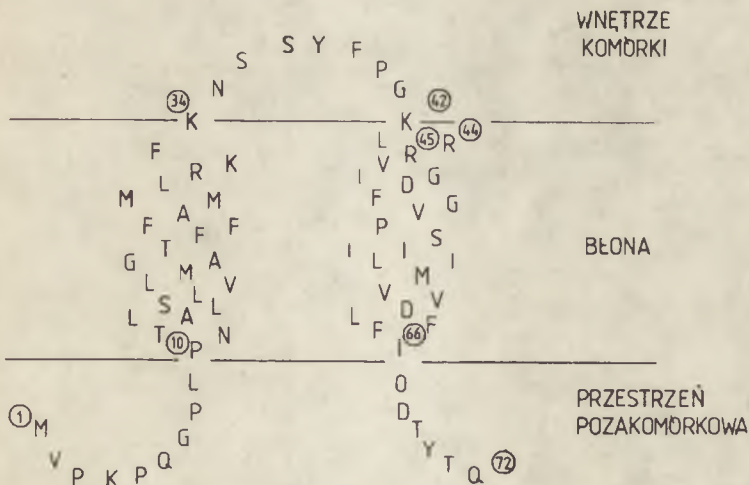
α -helikalnych i jednego segmentu o strukturze β . Ten ostatni może brać udział w oddziaływaniach warunkujących niekowalencyjną dimeryzację fragmentu TR-41 (39).

Działanie bromocyjanu na fragment CH-15 prowadzi do powstania głównie dwu mniejszych fragmentów, o masach cząsteczkowych odpowiednio 4700 i 8000. Fragment o masie cząsteczkowej 8800 zawiera region wiążący inny inhibitor transportu anionów, izotiocyanian 2,2'-dijodosulfofenyli. Określono strukturę pierwszorzędową N-końcowych odcinków obu tych fragmentów (40) (Ryc. 4).



Ryc. 4. Sekwencja aminokwasowa N-końcowych odcinków fragmentów o masach cząsteczkowych 4700 i 8800 otrzymanych z fragmentu CH-15 BPA. Na podstawie danych (40).

Znana jest także sekwencja 72 N-końcowych reszt aminokwasowych fragmentu P5 (Ryc. 5). Analiza tej sekwencji wskazuje, że regiony Pro-10 — Lys-34 oraz Lys-41 — Ile-66 mogą tworzyć struktury α -helikalne (41).



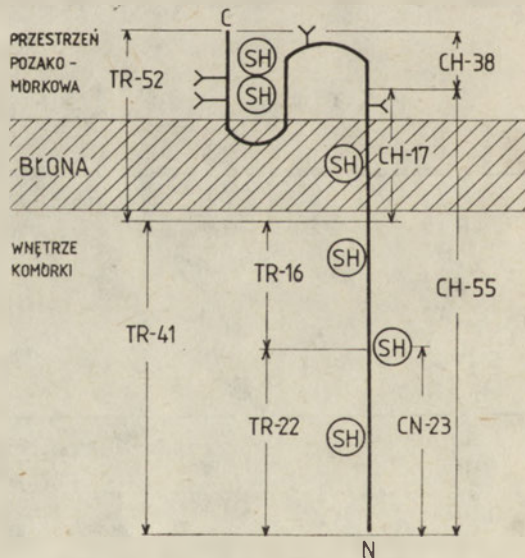
Ryc. 5. Struktura pierwszorzędowa N-końcowego regionu fragmentu P5 BPA i jego prawdopodobne położenie w błonie erythrocytu. Wg (41), zmodyf.

IV. Położenie białka przenoszącego aniony w błonie

Badania dostępności BPA dla proteaz i innych odczynników nie przenikających przez błonę pozwoliły na wykazanie, że białko to wystaje z dwuwarstwy lipidowej po obu jej stronach oraz na wysunięcie koncepcji jego położenia w błonie.

Stwierdzono, że łańcuchy sacharydowe BPA znajdują się na ekstracytoplazmatycznej powierzchni błony erythrocytu, zgodnie z zasadą obejmującą wszystkie glikoproteiny błon komórkowych (6). Ułożenie BPA w błonie stanowi jednak wyjątek od reguły, w myśl której N-koniec cząsteczki białka integralnego błony winien znajdować się po ekstracytoplazmatycznej stronie dwuwarstwy lipidowej, bowiem (acetylowany) N-koniec cząsteczki BPA znajduje się w regionie cząsteczki białka wystającym z błony do wnętrza krwinki (7, 21).

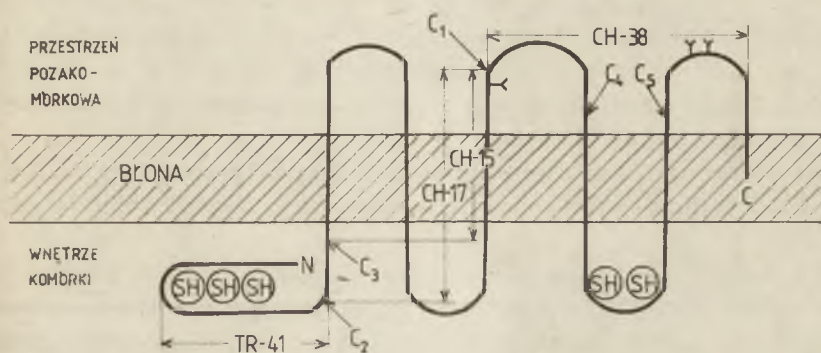
Odpowiednio zewnątrz- i wewnątrzkomórkowa lokalizacja regionów podatności proteolitycznej BPA po obu stronach fragmentu CH-17 świadczy, że fragment ten musi przechodzić przez dwuwarstwę lipidową błony erythrocytu. Zawiera on region wiążący inhibitory transportu anionów (H_2DIDS , $DIDS$ i ich pochodne) dostępny od strony ekstracytoplazmatycznej błony (42). Oba główne fragmenty powstające z BPA w wyniku wewnątrzkomórkowego trawienia chymotrypsyną, CH-55 i CH-38 są dostępne dla oksydazy galaktozowej i trinitrofluorobenzenu na ekstracytoplazmatycznej powierzchni błony. Na tej podstawie Steck i wsp. wysunęli koncepcję ułożenia BPA w błonie przedstawioną na Ryc. 6. W myśl tej koncepcji N-końcowa część łańcucha polipeptydowego BPA wystaje



Ryc. 6. Położenie BPA (linia ciągła) w błonie erythrocytu w myśl koncepcji Stecka i wsp. Wg (6) i (18), zmodyf.

do wnętrza komórki, część C-końcowa łańcucha wystaje z błony na zewnątrz komórki, środkowa część fragmentu CH-38 zanurzona jest w dwuwarstwie lipidowej, a jednym segmentem cząsteczki przebijającym dwuwarstwę jest fragment CH-17.

Szereg doświadczeń, dotyczących m. in. dostępności grup sulfhydrylowych BPA, sugeruje jednak bardziej skomplikowane położenie BPA w błonie. Wykazano, że grupy -SH fragmentu CH-38 dostępne są dla nie przenikającej przez błonę pochodnej NEM wyłącznie od strony cytoplazmatycznej (32, 37). Dwie grupy sulfhydrylowe fragmentu CH-38, znajdujące się w odległościach odpowiadających masom cząsteczkowym 10 000 i 12 000 od jego N-końca, pozostają we fragmencie CH-8, w odległościach od jego N-końca odpowiadających masom cząsteczkowym 3000 i 5000 (36). Ponieważ fragment CH-8 powstaje w wyniku działania chymotrypsyny po ekstracytoplazmatycznej stronie błony, oba jego końce muszą wystawać po zewnętrznej stronie dwuwarstwy lipidowej błony. Zatem sam fragment CH-38 musi co najmniej dwukrotnie przechodzić przez dwuwarstwę lipidową, koncepcja Rothsteina i wsp. (43, 44) ułożenia BPA w błonie przewiduje, w odróżnieniu od poprzedniej, że fragment CH-38 przebija kilkakrotnie dwuwarstwę lipidową błony erythrocytu oraz że fragment CH-17 przebija ją więcej niż jeden raz. Cała cząsteczka BPA przebija więc dwuwarstwę co najmniej pięciokrotnie (Ryc. 7).



Ryc. 7. Położenie BPA (linia ciągła) w błonie erythrocytu w myśl koncepcji Rothsteina i wsp. C_1, \dots, C_6 — miejsca cząsteczki wrażliwe na działanie chymotrypsyny. Wg (42) i (43), zmodyf.

Koncepcję tę potwierdzają wyniki analizy struktury pierwszorzędowej fragmentu P5 sugerując, że fragment ten może sam dwukrotnie przechodzić przez dwuwarstwę (Ryc. 5). Regiony fragmentu P5, które prawdopodobnie tworzą struktury helikalne (na co wskazuje ich struktura pierwszorzędowa) są dostatecznie długie na to, by każdy z nich mógł przejść przez dwuwarstwę lipidową, a regiony Pro-3 — Thr-12, Arg-31 — Arg-45 oraz Glu-67 — Glu-72 są szczególnie bogate w hydrofilowe reszty aminokwasowe i najprawdopodobniej znajdują się w środowisku wodnym na

zewnątrz dwuwarstwy. Wiązanie Lys-4 — Pro-5 jest trawione przez trypsynę po ekstracytoplazmatycznej stronie błony, Trp-70 ulega jodowaniu katalizowanemu przez zewnątrzkomórkową laktoperoksydazę, podczas gdy Tyr-38 nie ulega jodowaniu w tych warunkach, co sugeruje, że może znajdować się po stronie cytoplazmatycznej błony (41).

Wykazano, stosując kilka niezależnych metod (przede wszystkim określając wielkość agregatów BPA otrzymanych w wyniku działania czynników bifunkcyjnych na błony erythrocytarne), że białko przenoszące aniony występuje w błonie jako dimer, a być może (także) jako tetramer (45—48).

V. Transport anionów

Udział białka pasma 3 w transporcie anionów przez błonę erythrocytu wykazano przy użyciu kilku niezależnych metod:

— Stwierdzono, że specyficzne inhibitory transportu anionów (DIDS, H₂DIDS, SITS) wiążą się wyłącznie lub prawie wyłącznie z tym właśnie białkiem błony (24, 49—51),

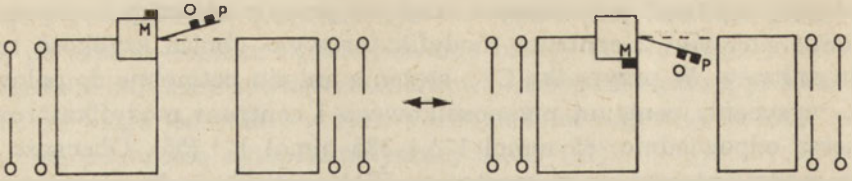
— Wykazano, że pęcherzyki otrzymane z błon erythrocytów w wyniku „negatywnego oczyszczania” białka pasma 3 (poprzez usunięcie białek peryferycznych i większości sjałoglikoprotein) zachowują zdolność transportu anionów oraz takie właściwości natywnych błon jak wartość energii aktywacji transportu anionów, selektywność transportu, wrażliwość na działanie inhibitorów transportu i charakter zależności szybkości transportu anionów od pH (10),

— Stwierdzono, że włączenie oczyszczonych preparatów białka pasma 3 w błony liposomów znacznie przyspiesza transport anionów przez te błony (52).

BPA umożliwia szybką, elektrycznie obojętną wymianę anionów przez błonę erythrocytarną (53). Jego rola fizjologiczna polega przede wszystkim na przyspieszeniu wymiany jonu chlorkowego na jon wodorowęglanowy. Szybkość transportu anionów związanego z przenoszeniem ładunku przez błonę jest znikoma i nie przekracza 0,01% szybkości wymiany elektrycznie obojętnej (54). Niemonotoniczny charakter zależności pomiędzy szybkością wymiany anionów a różnicą stężeń anionów po obu stronach błony można wyjaśnić zakładając, że w cząsteczce BPA występują dwa regiony oddziałujące z anionami, określane zwykle mianem centrów: centrum przenośnikowe i centrum modyfikatorowe (terminy wprowadzone przez analogię do będących w powszechnym użyciu terminów enzymologicznych „centrum aktywne” i „centrum allosteryczne”). Centrum przenośnikowe (ang. transport site) to region cząsteczki białka bezpośrednio odpowiedzialny za przeniesienie anionu z jednej strony błony na drugą. Centrum modyfikatorowe (ang. modifier site) to hipotetyczny region cząsteczki BPA

regulujący szybkość przenoszenia anionów przez centrum przenośnikowe: wiązanie anionów z centrum modyfikatorowym obniża szybkość transportu anionów. W przypadku Cl^- , stężenia anionu potrzebne do połowicznego wysycenia centrum przenośnikowego i centrum modyfikatorowego wynoszą odpowiednio: 65 mmol l^{-1} i 335 mmol l^{-1} (55). Obecność centrum modyfikatorowego w cząsteczce BPA warunkuje hamowanie przenoszenia anionów przy wysokich wartościach różnicy stężeń anionów po obu stronach błony (zjawisko analogiczne do hamowania niektórych enzymów przez nadmiar substratu). Wiązanie anionów z centrum przenośnikowym blokowane jest przez pochodne stilbenodisulfonianu, takie jak DIDS, H_2DIDS i SITS. Inhibitory tego typu najpierw oddziałują niekowalencyjnie z centrum przenośnikowym BPA, a następnie wiążą się kowalencyjnie z lizyną fragmentu CH-15 (56—58). Inny inhibitor transportu anionów, NAP-tauryna wiąże się także z fragmentem CH-15, jednak nie w centrum przenośnikowym, lecz być może w hipotetycznym centrum modyfikatorowym (59).

Wiązanie się szeregu inhibitorów transportu anionów z fragmentem CH-17 (CH15) BPA sugeruje udział tego fragmentu cząsteczki białka w przenoszeniu anionów przez błonę. Stwierdzono jednak, że trawienie papainą powodujące rozpad fragmentu CH-38 również wywołuje hamowanie transportu anionów (60, 61). Co więcej, inny inhibitor transportu anionów, izotiocyanian fenylu, wiąże się głównie z fragmentem o masie cząsteczkowej 10 000 pochodzącym z fragmentu CH-38. Wnioskuje się stąd, że zdolność białka pasma 3 do przenoszenia anionów przez błonę uwarunkowana jest współdziałaniem pewnych regionów fragmentów CH-17 i CH-38. Sugerowano, że regiony BPA położone wewnątrz dwuwarstwy lipidowej oddziałują ze sobą w taki sposób, że tworzą kanał hydrofilowy umożliwiający przenikanie anionów przez błonę (59). Przeciwno takiej koncepcji funkcjonowania BPA przemawia jednak wysoka selektywność procesu wymiany anionów, skłaniająca do przypuszczeń, że białko to działa raczej jako ruchomy przenośnik (ang. „carrier”). Wydaje się nieprawdopodobne, by podczas transportu anionów przez BPA następowało obracanie się cząsteczki białka wokół osi równoległej do powierzchni błony. Bardziej realne wydaje się być zachodzenie zmian konformacyjnych cząsteczki BPA, w wyniku których centrum przenośnikowe eksponowane jest na przemian po wewnętrznej i po zewnętrznej stronie bariery przepuszczalności (Ryc. 8). Mechanizm działania BPA zaproponowany przez Rothsteina i wsp. zakłada, że przejścia jednej konformacji w drugą zachodzą spontanicznie (jak wiadomo, wymiana anionów nie wymaga nakładu energii), lecz jedynie wtedy, gdy z centrum przenośnikowym związany jest anion. Zmiany konformacji BPA związane z przenoszeniem anionów muszą zachodzić z dużą szybkością, gdyż „liczba obrotów” białka jest wysoka ($2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$), wydaje się więc, że mogą obejmować jedynie stosunkowo nieznaczny region cząsteczki białka.



Ryc. 8. Mechanizm transportu anionów przez BPA proponowany przez Rothsteina i wsp. BPA może występować w dwu stanach konformacyjnych, w których jego centrum przenośnikowe (P) znajduje się odpowiednio na zewnątrz i po wewnętrznej stronie bariery przepuszczalności. Przejście pomiędzy jednym a drugim stanem zachodzi po związaniu się anionu z centrum modyfikatoryjnym (M) blokuje przejście konformacyjne. Wg (59) i (62), zmodyf.

Szereg danych wskazuje, że w centrum przenośnikowym BPA znajduje się naładowana dodatnio (w fizjologicznym zakresie pH) grupa guanidylowa argininy (co odpowiadałoby za brak zależności szybkości wymiany anionów jednowartościowych od pH w zakresie pH 7—11) (63). Prawdopodobnie centrum przenośnikowe zawiera również drugą grupę zdolną do jonizacji (być może ϵ -aminową grupę lizyny położonej w sąsiedztwie argininy), która ulega jonizacji przy pH niższym niż 7. Jonizacja tej grupy umożliwia wiązanie i przenoszenie anionów dwuwartościowych, takich jak jon siarczanowy, i tłumaczy zależność szybkości transportu tych jonów od pH (62).

Porównanie szybkości transportu anionów różnych kwasów organicznych przez BPA wskazuje, że obecność grupy hydrofobowej w cząsteczce kwasu ułatwia przenoszenie anionu (64). Sugeruje to, że anion przenoszony przez BPA musi utracić przynajmniej część swej otoczki hydratacyjnej. Mechanizm transportu jonów uwzględniający tę sugestię zaproponowany został ostatnio przez Brocka i wsp. (41) na podstawie analizy struktury pierwszorzędowej fragmentu P5. Zakłada on, że fragment P5 może przenosić aniony przez błonę. Pierwszym etapem transportu anionu jednowartościowego z wnętrza komórki na zewnątrz jest oddziaływanie anionu z dodatnio naładowaną resztą Arg-45 na powierzchni błony (Ryc. 5). Anion wiąże się z tą resztą, tracąc część swej otoczki hydratacyjnej. Związanie anionu powoduje zmianę położenia łańcucha bocznego argininy, który przesuwają się w pobliżu reszty Arg-49. Następuje przeniesienie anionu na resztę Arg-49, a potem w analogiczny sposób na inne dodatnio naładowane reszty aminokwasowe, póki w wyniku zmiany położenia ostatniej przenoszącej go reszty nie osiągnie zewnętrznej powierzchni błony. Tu anion uwalnia się, a dodatnio naładowana reszta aminokwasowa eksponowana teraz na zewnętrznej powierzchni błony może wiązać inny anion, który zostaje przekazany w odwrotnym kierunku. Choć założenie, że fragment P5 BPA przenosi aniony jest arbitralne, zaproponowany mechanizm może dotyczyć także innego fragmentu białka przebijającego dwuwarstwę lipidową.

VI. Białko przenoszące aniony a transport glukozy i transport wody

Stwierdzenie, że szereg związków hamujących przenikanie wody przez błonę plazmatyczną erythrocytu (np. DTNB) wiąże się głównie z BPA posłużyło za podstawę sugestii, że BPA odpowiedzialne jest także za transport wody przez błonę (65). Nowsze badania wskazują jednak, że związki blokujące transport wody wiążą się również z innymi białkami błony (zwłaszcza białkami pasm 4.5, 4.9 i 7) (66), stąd też większość autorów uważa problem elementu błony krwinki czerwonej pośredniczącego w transporcie wody za wciąż otwarty.

Niektórzy autorzy są zdania, że BPA jest przenośnikiem glukozy przez błonę erythrocytu. Dane przemawiające za słusznością tej hipotezy to: wiązanie niektórych analogów glukozy (takich jak np. izotiocyjanian maltozyli) z BPA oraz przyspieszenie transportu glukozy przez błony liposomów w wyniku włączenia do nich BPA (67). Większość autorów podziela jednak pogląd, że rolę przenośnika glukozy pełni w błonie erythrocytu białko pasma 4.5 (68).

VII. Oddziaływanie białka przenoszącego aniony z białkami szkieletu komórkowego

Cytoplazmatyczną powierzchnię błony erythrocytu wyściela sieć białek tworzących szkielet komórkowy (ang. cytoskeleton), determinujący mechaniczne właściwości kwinki. W jego skład wchodzi: spektryna (pasma 1 i 2 na elektroferogramach białek błon), aktyna (pasmo 5), ankiryne (pasmo 2.1) i białko pasma 4.1. Ankiryne jest elementem wiążącym szkielet komórkowy z rdzeniem błony (który stanowi dwuwarstwa lipidowa i białka integralne). Składnikiem rdzenia błony, z którym oddziałuje ankiryne jest BPA, a dokładniej region tego białka wchodzący w skład fragmentu TR-41. Przemawiają za tym wyniki wielu doświadczeń. Na przykład, przeciwciała przeciwko ankiryne wytrącają z ekstraktów białek błon otrzymanych działaniem detergentów niejonowych ekwimolarny kompleks ankiryne i BPA; analogicznie reagują przeciwciała przeciwko fragmentowi TR-41. Spektryna wiąże się z BPA jedynie wtedy, gdy uprzednio związało ono ankiryne. Proteoliza cieni erythrocytów prowadząca do uwolnienia fragmentu TR-41 znosi wiązanie ankiryne z błoną; fragment TR-41 jest kompetycyjnym inhibitorem takiego wiązania (69, 70). Oddziaływanie szkieletu komórkowego z BPA powoduje ograniczenie ruchliwości rotacyjnej i translacyjnej tego białka w błonie (71, 72).

Ilość cząsteczek BPA w krwince czerwonej ($1,2 \cdot 10^6$ monomerów) jest znacznie większa niż ilość cząsteczek ankiryne (10^5 monomerów) i spektryny (10^5 monomerów). Nawet jeżeli BPA występuje w błonie w postaci tetramerów, jedynie część tych tetramerów może być związana z anki-

ryną. Wysuwano sugestię, że sytuacja ta może być wynikiem heterogenności BPA, wskutek której tylko jedna z subpopulacji tego białka ma zdolność wiązania ankiryiny. Stwierdzono jednak, że zdolność tę mają wszystkie cząsteczki BPA (70).

BPA wiąże też białko pasma 4.2, którego rola w błonie erythrocytu nie jest dotąd jasna (70, 73). Wydaje się, że *in situ* BPA oddziałuje również z glikoforyną, główną sialoglikoproteiną błony erythrocytarnej, gdyż przeciwiła przeciwko glikoforynie zmniejszając szybkość rotacji BPA w błonie (71). Ilość monomerów glikoforyny w błonie erythrocytu (ok. 10^6) zbliżona jest do ilości monomerów BPA (71). Prawdopodobnie agregaty BPA i glikoforyny tworzą cząstki wewnątrz błonowe (ang. intramembrane particles), widoczne na zdjęciach elektronomikroskopowych hydrofobowego wnętrza błon krwinek czerwonych otrzymanych metodą *freeze-frac-ture* (6, 74).

VIII. Wiązanie enzymów glikolitycznych i hemoglobiny

Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (oksydoreduktaza aldehyd 3-fosfo-D-glicerynowy: NAD (fosforylująca), EC 1.2.1.12), aldolaza (D-gliceroaldehydo-3-fosforano-liaza fruktozo-1,6-bis-fosforanu, EC 4.1.2.13) i fosfofruktokinaza (1-fosfotransferaza ATP: D-fuktozo-6-fosforan, EC 2.7.1.11) są enzymami, które mogą odwracalnie wiązać się z błoną erythrocytu, obecność ich można więc stwierdzić zarówno w cytoplazmie, jak i w preparatach błon (enzymy takie określane są jako ambikwityczne) (75, 76). G3PDH jest istotnym ilościowo składnikiem cieni erythrocytów otrzymanych metodą lizy hipotonicznej. Stanowi ona 5—7% białek błonowych erythrocytu (pasma 6 na elektroferogramach) (Ryc. 1) (77). Wiązanie wymienionych enzymów z błoną krwinki czerwonej zachodzi głównie dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym i można uwolnić je z błony działając roztworami o wysokiej sile jonowej. Wiążą się one wyłącznie z cytoplazmatyczną powierzchnią błony, a elementem błony odpowiedzialnym za ich wiązanie jest BPA. Wiązanie zachodzi w stosunku: tetramer G3PDH lub aldolazy na monomer BPA (73, 78, 79). Specyficzne uwolnienie G3PDH z błony można uzyskać stosując roztwory NADH, NADP, NADPH, aldehydu 3-fosfoglicerynowego, a specyficzne uwolnienie aldolazy stosując roztwory fruktozo-1,6-difosforanu. Roztwory ATP i 2,3-DPG uwalniają oba enzymy (77, 79). Fruktozo-1,6-difosforan, Mg^{2+} i ATP stymulują wiązanie fosfofruktokinazy z BPA (80).

Każdy z wymienionych enzymów wiąże się najprawdopodobniej z tym samym regionem BPA, gdyż wiązanie ich ma charakter kompetycyjny. Nie jest to region wiążący ankirynę, gdyż nie obserwuje się współzawodnictwa ankiryiny z enzymami glikolitycznymi w wiązaniu z błonami erythrocytów i z BPA (81, 82). Badania nad hamowaniem wiązania enzymów

glikolitycznych z błonami krwinek czerwonych przez różne fragmenty BPA wykazały, że za wiązanie to odpowiada fragment CN-23, a dokładniej jego region N-końcowy (81), określane ze względu na swój ładunek jako „giętki palec polianionowy” (76).

Fizjologiczne znaczenie wiązania enzymów glikolitycznych z BPA nie jest w pełni jasne, podobnie jak i sam zakres tego zjawiska *in situ*. Stopień wiązania jest wysoki w warunkach niskiej siły jonowej i w pH niższym od fizjologicznego. Ekstrapolacja danych kinetycznych dotyczących asocjacji G3PDH z błoną erythrocytu i dysocjacji enzymu podczas hemolizy sugeruje, że w natywnej krwi co najmniej połowa cząsteczek enzymu związana jest z błoną. Stopień wiązania wzrasta podczas starzenia się krwinki czerwonej *in vitro* (83). Wiązanie z BPA inaktywuje aldolazę (79) i zmienia właściwości kinetyczne fosfofruktokinazy (84), może więc stanowić jeden z mechanizmów regulacji glikolizy w krwi.

BPA odgrywa również zasadniczą rolę w wiązaniu hemoglobiny z błoną erythrocytu. Wprawdzie tylko 25—30% hemoglobiny zaadsorbowanej na błonie związane jest z BPA9 (pozostała część wiąże się z glikoforyną i fosfolipidami błony), jednak BPA jest elementem błony wykazującym największe powinowactwo wobec tego białka (85—87). Wiązanie hemoglobiny z BPA jest silne w $\text{pH} \leq 6$, a maleje ze wzrostem pH i siły jonowej (88), co tłumaczy konieczność stosowania lekko alkalicznych buforów dla odmycia cieni erythrocytów od hemoglobiny. Hemoglobina dzieli z enzymami glikolitycznymi wspólny region wiązania w N-końcowym regionie BPA (89).

IX. Domenowy charakter białka przenoszącego aniony

Wiele obserwacji wskazuje, że poszczególne fragmenty BPA otrzymywane w wyniku kontrolowanej proteolizy zachowują właściwości funkcjonalne, jakie mają w natywnej cząsteczce białka i że reprezentują wyrażone domeny strukturalne cząsteczki BPA (90). Fragment TR-41 zachowuje zdolność wiązania ankiryny (70, 46), G3PDH (73), aldolazy (79) i hemoglobiny (87). Odszczepienie tego fragmentu, podobnie jak ograniczone trawienie chymotrypsyną nie wpływa na funkcję transportową BPA (31, 91). Trawienie BPA na ekstracytoplazmatycznej powierzchni błony nie wpływa na oddziaływanie tego białka z hemoglobina (92). Donoszono także o niezależności funkcjonalnej poszczególnych regionów natywnej cząsteczki BPA. Stwierdzono, że wiązanie G3PDH i aldolazy nie wpływa na transport pirogronianu przez BPA (76). Badania błon erythrocytów metodą kalorymetrii skaningowej wykazały zachodzenie kilku przejść endotermicznych błony, z których jedno (B_2) związane jest z denaturacją cieplną cytoplazmatycznego regionu BPA, a inne (C) z denaturacją części cząsteczki zawierającej region wiążący DIDS. Oba przejścia zachodzą w różnych prze-

działach temperatur; wiązanie DIDS powoduje znaczne (o ponad 10 K) przesunięcie temperatury przejścia C, zupełnie nie wpływając na temperaturę przejścia B₂ (93).

Inne dane wskazują jednak na możliwość transbłonowego przekazywania oddziaływań w cząsteczce BPA. Na przykład wiązanie DIDS z ekstracytoplazmatyczną częścią fragmentu CH-17 BPA wpływa na wiązanie hemoglobiny (92) i ankiryiny (94) z regionem wchodzącym w skład fragmentu CN-23. Kowalencyjna dimeryzacja BPA, zachodząca w wyniku utworzenia mostka dwusiarczkowego pomiędzy regionami monomerów białka wchodzącymi w skład fragmentu TR-41 wpływa na transport pirogronianu (95). Widmo ERP maleimidowego znacznika spinowego, związanego z grupami sulfhydrylowymi w regionie odpowiadającym fragmentowi TR-41 ulega zmianie w efekcie oddziaływania części transbłonowej BPA z anionami (96).

X. Możliwości regulacji funkcji białka przenoszącego aniony *in situ*

Lista czynników, którym przypisuje się rolę w regulowaniu funkcji BPA w komórce obejmuje fosforylację BPA, skład lipidów błony oraz stężenie Ca²⁺ i ATP w komórce.

Region cytoplazmatyczny BPA ulega fosforylacji katalizowanej przez endogenną kinazę białkową błony erythrocytu (21, 97). Stopień fosforylacji BPA wykazuje jednak słabą zależność od większości badanych efektorów fosforylacji. Fosforylacji ulegają zarówno reszty serynowe, jak i treoninowe BPA; jednym z głównych miejsc fosforylacji jest Tyr-8 (97). Fosforylacja nie wpływa na oddziaływanie BPA z ankiryną (82), ale może mieć znaczenie dla oddziaływania tego białka z enzymami glikolitycznymi (97).

Stwierdzono, że skład lipidów błony wpływa na szybkość transportu anionów przez błonę erythrocytu. Wzbogacenie błony w cholesterol, tak *in vitro*, jak *in vivo*, hamuje przenoszenie siarczanu (98). Porównanie szybkości transportu anionów przez błony erythrocytów różnych gatunków ssaków wykazało dodatnią korelację pomiędzy szybkością transportu a zawartością fosfatydylocholinoi i kwasu arachidonowego w błonach i ujemną korelację pomiędzy szybkością transportu a zawartością cholesterolu i sfingomieliny (99—101). Na podstawie tych obserwacji wysunięto hipotezę, że BPA zawiera centrum wiążące cholesterol. Związanie cholesterolu z tym centrum hamuje transport anionów. Skład fosfolipidów błony wpływa na wiązanie cholesterolu z BPA (101). W sprzeczności z tą hipotezą stoi jednak obserwacja, że utlenienie nawet 90% cholesterolu błony erythrocytu w wyniku działania oksydazy cholesterolowej nie ma istotnego wpływu na szybkość wymiany anionów (102).

BPA zawiera też centrum wiążące jony wapnia, o wysokim powinowactwie (stała wiązania rzędu 10⁵ mol⁻¹ l w pH 8). Wiadomo również, że

wewnątrzkomórkowe stężenia Ca^{2+} rzędu $\mu\text{mol l}^{-1}$ hamują wymianę anionów przez błonę erythrocytu. Dane te skłaniają do sugestii, że jon Ca^{2+} może działać jako regulator transportu anionów przez BPA (103).

Wykazano, że przenoszenie anionów przez błonę hamowane jest w wyniku spadku wewnątrzkomórkowego stężenia ATP. Obserwacja ta jest nieco zaskakująca, bowiem wymiana anionów przez BPA jest procesem dyfuzji ułatwionej, nie wymagającej nakładu energii, a więc bezpośredniego udziału ATP. Wydaje się, że wpływ obniżenia stężenia ATP wewnątrz erythrocytu na funkcję BPA jest pośredni i wiąże się ze zmianą organizacji białek szkieletu komórkowego oddziałujących z BPA (104).

XI. Białko przenoszące aniony a „antygen starych komórek”

Wiadomo, że BPA może odgrywać pewną rolę w zjawiskach immunologicznych dotyczących erythrocytu ponieważ jest ono, obok glikolipidów błony, nośnikiem antygenów grupowych krwi układów I (24) i Rh (105). Zasadniczą rolę w procesach immunologicznych przypisuje białku przenoszącemu aniony koncepcja Kay immunologicznego rozpoznawania starych erythrocytów (i innych komórek) w organizmie. W myśl tej koncepcji sygnałem dla usunięcia starej krwinki z krwiobiegu jest pojawienie się na jej powierzchni dostatecznej liczby kopii („antygeny starych komórek”) (ang. „senescent cell antigen”), białka o masie cząsteczkowej ok. 62 000 (106). Antygen starych komórek wykazuje pokrewieństwo immunochemiczne z BPA i najprawdopodobniej powstaje z niego wskutek działania obecnej w błonie proteazy (107).

XII. Białka pokrewne białku przenoszącemu aniony

Antygen starych komórek, a także białko pasma 4.5 błony erythrocytu odpowiedzialne, jak się wydaje, za transport glukozy przez błonę wykazują podobieństwo strukturalne z BPA. Prawdopodobnie oba te białka powstają w wyniku proteolizy BPA. Wydaje się więc, że BPA jest głównym składnikiem i zarazem prekursorem grupy pokrewnych strukturalnie białek błony erythrocytu pełniących różne funkcje w błonie (107, 108).

Powszechność procesów transportu anionów i glukozy przez błony plazmatyczne komórek oraz stwierdzenie obecności antygeny starych komórek również na powierzchni starych limfocytów, płytek krwi, hepatocytów i komórek nerki (107) są bodźcami do poszukiwania BPA w komórkach innych niż erythrocyt. Ostatnio wykazano, że białka reagujące z przeciwciałami specyficznymi wobec BPA obecne są w błonach plazmatycznych fibroblastów, komórek płuc, leukocytów, komórek mezenchymatycznych pępowiny, komórek nabłonkowych owodni i komórek mięśni gład-

kich naczyń krwionośnych człowieka, komórek nabłonka i nerwiaka niedojrzałego myszy oraz hepatocytów szczura, choć w wielu przypadkach masa cząsteczkowa tych białek jest niższa od masy cząsteczkowej BPA z erytrocytów człowieka (109, 110). Porównanie map peptydowych BPA i pokrewnego immunochemicznie białka leukocytów wykazało znaczną homologię (109). Stwarza to podstawę do przypuszczenia, iż podobnie jak spektryna czy ankiryne, BPA może okazać się powszechnym składnikiem błon komórek wielu rodzajów.

Zaakceptowano do druku 28.10.1984 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H., (1971), *Biochemistry*, **10**, 2606—2617.
2. Bretscher M. S., (1973), *Science*, **181**, 622—629.
3. Jenkins R. E., Tanner M. J. A., (1975), *Biochem. J.*, **147**, 393—399.
4. Tanner M. J. A., Boxer D. H., (1972), *Biochem. J.*, **129**, 333—347.
5. Yu J., Steck T. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9170—9175.
6. Steck T. L., (1978), *J. Supramol. Struct.*, **8**, 311—324.
7. Fukuda M., Eshdat Y., Tarone G., Marchesi V. T., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2419—2428.
8. Steck T. L., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1154—1161.
9. Kahlenberg A., (1976), *Anal. Biochem.*, **74**, 337—342.
10. Wolosin J. M., Ginsburg H., Cabantchik Z. I., (1977), *J. Biol. Chem.* **252**, 2419—2427.
11. Darmon A., Zangvill M., Cabantchik Z. I., (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **727**, 77—88.
12. England B. J., Gunn R. B., Steck T. L., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **623**, 171—182.
13. Gahmberg C. G., Myllyla G., Leikola J., Pirkola A., Nordling S., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6108—6116.
14. Pappert G., Schubert D., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **730**, 32—40.
15. Furthmayr H., Kahane I., Marchesi V. T., (1976), *J. Membrane Biol.*, **26**, 173—187.
16. Adair W. L., Kornfeld S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4696—4704.
17. Findlay, J. B. C., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4398—4403.
18. Steck T. L., Koziarz J. J., Singh M. K., Reddy G., Köhler H., (1978), *Biochemistry*, **17**, 1216—1222.
19. Bhakdi S., Bjerrum O. J., Knüfermann H., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **446**, 419—431.
20. Steck T. L., (1974), *J. Cell. Biol.*, **62**, 1—19.
21. Drickamer L. K., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5115—5123.
22. Markowitz S., Marchesi V. T., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 6463—6468.
23. Childs R. A., Feizi T., Tonegawa Y., (1979), *Biochem. J.* **181**, 533—533.
24. Ho M. K., Guidotti G., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 675—683.
25. Makino S., Nakashima H., Shibagaki K., (1981), *J. Biochem.*, **89**, 651—658.

26. Tannner M. J. A., Jenkins R. E., Anstee D. J., Clamp J. R., (1976), *Biochem. J.*, **155**, 701—703.
27. Koziarz J. J., Köhler H., Steck T. L., (1978), *J. Supramol. Struct.*, **7** (Suppl. 2), 215.
28. Tsuji T., Irimura T., Osawa T., (1981), *Carbohydr. Res.*, **92**, 328—332.
29. Tsuji T., Irimura T., Osawa T., (1980), *Biochem. J.*, **187**, 677—686.
30. Cabantchik Z. I., Rothstein A., (1974), *J. Membrane Biol.*, **14**, 227—248.
31. Jennings M. L., Passow H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **554**, 498—519.
32. Rao A., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3503—3511.
33. Tanner M. J. A., Williams D. G., Kyle D., (1979), *Biochem. J.*, **183**, 417—427.
34. Kempf C., Brock C., Sigrist H., Tanner M. J. A., Zahler P., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **641**, 88—98.
35. Ramjeesingh M., Grinstein S., Rothstein A., (1980), *J. Membrane Biol.*, **57**, 95—102.
36. Ramjeesingh M., Gaarn A., Rothstein A., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **729**, 150—160.
37. Rao A., Rothmeier R. A. F., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6144—6150.
38. Ramjeesingh M., Gaarn A., Rothstein A., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **599**, 127—139.
39. Kaul R. K., Murthy S. N. P., Reddy A. G., Steck T. L., Köhler H., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 7981—7990.
40. Mawby W. J., Findlay J. B. C., (1982), *Biochem. J.*, **205**, 465—475.
41. Brock C. J., Tanner M. J. A., Kempf C., (1983), *Biochem. J.*, **213**, 577—586.
42. Rothstein A., Ramjeesingh M., (1982), *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, **B 299**, 497—507.
43. Rothstein A., Ramjeesingh M., (1980), *Ann. New York Acad. Sci.*, **358**, 1—12.
44. Rothstein A., Ramjeesingh M., Grinstein S., w: Membrane Transport in Erythrocytes, Red. Lassen U. V., Ussing H. H., Wieth J. O., str. 329—344, Munksgaard, Kopenhagen (1980).
45. Reithmeier R. A. F., Rao A., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6151—6155.
46. Hargreaves W. R., Giedd K. N., Verkleij A., Branton D., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11965—11972.
47. Staros J. V., Kakkad B. P., (1983), *J. Membrane Biol.*, **74**, 247—254.
48. Weinstein R. S., Khodadad J. K., Steck T. L., (1980), *J. Cell Biol.*, **87**, 209a.
49. Cabantchik Z. I., Rothstein A., (1974), *J. Membrane Biol.*, **15**, 207—226.
50. Cabantchik Z. I., Knauf P. A., Ostwald T., Markus H., Davidson L., Breuer W., Rothstein A., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 526—537.
51. Zaki L., Fasold B., Schuhmann B., Passow H., (1975), *J. Cell Physiol.*, **86**, 471—494.
52. Rothstein A., Cabantchik Z. I., Balshin M., Juliano R., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **64**, 144—150.
53. Brahm J., (1977), *J. Gen. Physiol.*, **70**, 283—306.

54. Knauf P. A., Fuhrmann G. F., Rothstein S., Rothstein A., (1977), *J. Gen. Physiol.*, **69**, 363—386.
55. Dalmark M., (1976), *J. Gen. Physiol.*, **67**, 223—234.
56. Lepke S., Fasold H., Pring H., Passow H., (1976), *J. Membrane Biol.*, **29**, 147—177.
57. Ship S., Shami Y., Breuer W., Rothstein A., (1977), *J. Membrane Biol.*, **33**, 311—324.
58. Ramjeesingh M., Gaarn A., Rothstein A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **641**, 173—182.
59. Knauf P. A., Grinstein S., (1982), w: Chloride Transport in Biological Membranes, str. 61—90, Academic Press, New York, London.
60. Jennings M. L., Adams M. F., (1981), *Biochemistry*, **20**, 7118—7123.
61. Cousin J. L., Motais R., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **687**, 147—155.
62. Knauf P. A., (1979), *Curr. Top. Membranes Transport*, **12**, 249—363.
63. Funder J., Wieth J., (1976), *J. Physiol.*, **262**, 679—698.
64. Aubert L., Motais R., (1975), *J. Physiol.*, **246**, 159—179.
65. Brown P. A., Feinstein M. B., Shaafi R., (1975), *Nature*, **254**, 523—525.
66. Brahm J., (1983), *Period. Biol.*, **85**, 109—115.
67. Shelton R. L., Langdon R. G., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **733**, 25—33.
68. Shanahan M. F., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 7290—7293.
69. Bennett V., Stenbuck P. J., (1979), *Nature*, **280**, 468—473.
70. Bennett V., Stenbuck P. J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6424—6432.
71. Nigg E. A., Cherry R. J., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3457—3465.
72. Haest C. W. M., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **694**, 331—352.
73. Yu J., Steck T. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9176—9184.
74. Shin B. C., Carraway K. L., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **345**, 141—153.
75. Wilson J. E., (1978), *Trends Biochem., Sci.*, **3**, 124—128.
76. Gillies R. J., (1982), *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 41—42.
77. Kant J. A., Steck T. L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8457—8464.
78. Strapazon E., Steck T. L., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1421—1424.
79. Strapazon E., Steck T. L., (1977), *Biochemistry*, **16**, 2966—2971.
80. Richards S., Higashi T., Uyeda K., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 798.
81. Murthy S. N. P., Liu T., Kaul R. K., Köhler H., Steck T. L., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 11203—11208.
82. Bennett V., (1982), *J. Cell. Biochem.*, **18**, 49—65.
83. Kliman H. J., Steck T. L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6314—6321.
84. Karadsheh N. S., Uyeda K., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7418—7420.
85. Rauenbuehler P. B., Cordes K. A., Salhany J. M., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **692**, 361—370.
86. Shaklai N., Yguerabide J., Ranney H. M., (1977), *Biochemistry*, **16**, 5585—5592.
87. Boivin P., (1983), *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **25**, 75—79.
88. Zilber I., Shaklai N., (1982), *Biochem. Int.*, **4**, 297—303.
89. Kaul R. K., Köhler H., (1983), *Klin. Wchschrft.*, **61**, 831—837.
90. Snow J. W., Vincentelli J., Brandts J. R., (1981), *Biochim. Biophys Acta*, **642**, 418—428.
91. Grinstein S., Ship S., Rothstein A., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 294—304.

92. Salhany J. M., Cordes K. A., Gaines E. D., (1980), *Biochemistry*, **19**, 1447—1454.
93. Appell K. C., Low P. S., (1982), *Biochemistry*, **21**, 2151—2157.
94. Hsu L., Morrison M., (1981), *Fed. Proc.*, **40**, 1194.
95. Rice W. R., Steck T. L., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **468**, 305—317.
96. Ginsburg H., O'Connor S. E., Grisham C. M., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **114**, 533—538.
97. Dekowski S. A., Rybicki A., Drickamer K., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 2750—2753.
98. Grunze M., Forst B., Deuticke B., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 860—869.
99. Gruber W., Deuticke B., (1973), *J. Membrane Biol.*, **13**, 19—36.
100. Lu, Y.-B., Chow, E. I.-H., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **689**, 485—489.
101. Schubert D., Boss K., (1982), *FEBS Lett.*, **150**, 4—8.
102. Gregg V. A., Reithmeier R. A. F., (1983), *FEBS Lett.*, **157**, 159—164.
103. Passing R., Schubert D., (1983), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **364**, 873—878.
104. Motais R., Baroin A., Baldy S., (1981), *J. Membrane Biol.*, **62**, 195—206.
105. Moore S., Woodrow C. F., McClelland D. B. C., (1982), *Nature*, **295**, 529—531.
106. Kay, M. M. B., (1981), *Nature*, **289**, 491—494.
107. Kay, M. M. B., Goodman S. R., Sørensen K., Whitfield C. F., Wong P., Zaki L., Rudloff V., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1631—1635.
108. Nickson J. K., Jones M. N., (1980), *Biochem. Soc. Trans.*, **8**, 308—309.
109. Kay M. M. B., Tracey C. M., Goodman J. R., Cone J. C., Bassel P. S., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6882—6886.
110. Drenckhahn D., Zinke K., Schauer U., Appell K. C., Low, P. S., (1984), *Eur. J. Cell Biol.*, **34**, 144—150.

[The text in this section is extremely faint and illegible. It appears to be a list or a series of entries, possibly containing names and dates, but the characters are too light to transcribe accurately.]

Profesorowi
Bronisławowi Filipowiczowi
w osiemdziesięciolecie urodzin,
pracę swoją dedykuje

Autorka

LILLA LACHOWICZ *

Transport głównych kationów w zakończeniach komórek nerwowych

Main Cation Transport In the Nerve Terminals.

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Kanały sodowe
- III. Kanały potasowe
- IV. Odbudowa gradientu Na^+ i K^+ w zakończeniach komórki nerwowej
 - IV-1. Biochemiczna charakterystyka Na^+ , K^+ -ATPazy
 - IV-2. Rozmieszczenie Na^+ , K^+ -ATPazy w neuronach
 - IV-3. Regulacja aktywności Na^+ , K^+ -ATPazy
- V. Kanały wapniowe
 - V-1. Ogólna charakterystyka kanałów wapniowych
 - V-2. Regulacja kanałów wapniowych i ich znaczenie biologiczne
- VI. Usuwanie Ca^{2+} z cytoplazmy
 - VI-1. Ogólna charakterystyka pomp wapniowych
 - VI-2. Regulacja Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPazy w zakończeniach komórek nerwowych
- VII. Rola wapnia w zakończeniach komórek nerwowych — uwagi końcowe.

Contents

- I. Introduction
- II. Sodium channels
- III. Potassium channels
- IV. Restoration of Na^+ and K^+ gradients
 - IV-1. Biochemical characterization of Na^+ , K^+ -ATPases
 - IV-2. Distribution of Na^+ , K^+ -ATPase on neurons
 - IV-3. Regulation of Na^+ , K^+ -ATPase activity
- V. Calcium channels
 - V-1. General characterization of calcium channels
 - V-2. Regulation and biological significance of the calcium channels

* Doc. Dr hab., II Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

Wykaz stosowanych skrótów: Na^+ , K^+ -ATPaza — ATPaza zależna od Na^+ i K^+ ; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPaza — ATPaza zależna od Ca^{2+} i Mg^{2+} ; CUN — centralny układ nerwowy.

VI. Ca^{2+} Removal from the cytoplasm**VI-1. General characterization of Ca^{2+} -pumps****VI-2. Regulation of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase in nerve terminals****VII. Function of calcium in nerve terminals — conclusions****I. Wstęp**

Zakończenie komórki nerwowej jest wysoce wyspecjalizowanym obszarem neuronu, którego główną funkcją jest uwalnianie neuroprzekaźnika w odpowiedzi na sygnał elektryczny przeniesiony przez akson. Zmiany potencjału elektrycznego w komórce nerwowej związane są ze zmianami w wybiórczej przepuszczalności plazmolemy dla różnych jonów. Od dawna wiadomo, że początkowy wzrost przepuszczalności dla jonu sodowego powoduje depolaryzację błony komórkowej. Natomiast wzrost przepuszczalności dla K^+ przy równoczesnym zahamowaniu przemieszczania Na^+ stanowi przyczynę repolaryzacji błony.

Powstanie impulsu nerwowego wiąże się z przesuwaniem się fali depolaryzacji, czemu towarzyszy, dla wyrównania ładunków elektrycznych, wzmożony przepływ jonów sodowych poprzez kanały sodowe.

Zatem, układy enzymatyczne, kanały jonowe, a także białka o działaniu hormonalnym czy przekaźnikowym, które biorą pośredni lub bezpośredni udział w procesach przemieszczania jonów w zakończeniach komórki nerwowej mają kluczowe znaczenie dla czynności tych obszarów neuronu. W czasie depolaryzacji błony presynaptycznej odbywa się także uwalnianie neuroprzekaźników zgromadzonych w pęcherzykach synaptycznych. Proces ten uwarunkowany jest wniknięciem do zakończeń komórki nerwowej jonów wapnia poprzez specyficzne „kanały wapniowe”, które otwierają się dla Ca^{2+} w odpowiedzi na depolaryzację błony plazmatycznej. Stanowi to jedną z możliwych dróg regulacji procesu uwalniania neuroprzekaźników.

Kanały jonowe, obok pomp odpowiedzialnych za aktywny transport jonowy umożliwiają komórce nerwowej prawidłowe procesy metaboliczne, prawidłową aktywność neuronalną, w pojęciu której mieści się skuteczna transmisja synaptyczna.

Zarówno „gęstość” rozmieszczenia jak i selektywna przepuszczalność jonowa tych kanałów zależą od różnych funkcjonalnych właściwości neuronów w mózgowiu.

Kanały jonowe charakteryzują się różną wrażliwością na zmiany potencjału błonowego, na stosowane neuroprzekaźniki czy hormony, jak również na zmiany poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} . Czynność niektórych kanałów jonowych w mózgowiu regulowana jest przez aktywność kinaz białkowych zależnych od cyklicznych nukleotydów. Wzrost stężenia endogennych cyklicznych nukleotydów może być zależny od działania neuroprzekaźników czy neurohormonów. Szczególną wrażliwość na

regulację na tej drodze wykazują kanały wapniowe. Ciąg wydarzeń regulujących czynność kanałów jonowych można by ogólnie przedstawić następująco: zmiany aktywności kinaz białkowych zależnych od cAMP, regulowanych poprzez neurotransmitery czy neuromodulatory powodują zmiany w funkcjonowaniu np. kanału Ca^{2+} , co w konsekwencji wpływa na stopień uwalniania innych neuroprzekaźników.

Zatem wszystkie prace prowadzone nad procesami transportu jonów jak i związanymi z tym procesami mają zasadnicze znaczenie dla zbadania czynności zakończeń komórek nerwowych. Określają bowiem możliwości i drogi regulacji funkcji układu nerwowego (1).

II. Kanały sodowe

Pod pojęciem kanałów jonowych rozumie się określony układ w błonie, który odpowiedzialny jest za wszystkie formy przenoszenia jonów z pominięciem transportu aktywnego, co nie wyklucza istnienia w strukturze kanału układów przekaźnikowych jak i dużej szybkości przepływu jonów.

Tradycyjne biochemiczne metody stosowane w badaniu kanałów sodowych pozwoliły na stwierdzenie, że są one wrażliwe na różnice potencjałów oraz, że odgrywają główną rolę w powstawaniu potencjału czynnościowego (2).

Podejścia doświadczalne stosowane do badań kanałów Na^+ zakładają istnienie tylko jednego rodzaju kanału Na^+ . Występować w nim mają dwa „zawory” lub dwie podjednostki (podsegmenty — subsections) kanału, z których oba winny być otwarte dla umożliwienia przepływu jonu przez kanał (2, 3, 4).

Gdy potencjał ma typową wartość spoczynkową zawór „m” jest zamknięty, a zawór lub podjednostka „h” — otwarty. Depolaryzacja powoduje otwarcie zaworu „m” i przepływ jonu, po czym następuje zamknięcie zaworu „h”. Różni się on od zaworu „m” mniejszą szybkością przepływu (2). Procesy powodujące zamknięcie jak i otwarcie „zaworów” kanału sodowego mają być regulowane zmianami potencjału śród błonowego (5, 6, 7, 8). Ostatnio przedstawiono dane, z których wynika, że zawory „m” i „h” wydają się funkcjonować niezależnie. Stanowi to potwierdzenie obecności różnych podjednostek w kanale Na^+ . Udało się je zidentyfikować we frakcji synaptosomów mózgu szczura, jako dwa peptydy o różnej masie cząsteczkowej, ok. 32 000 i 250 000, a które stanowiąc mają charakterystyczne podjednostki kanału Na^+ w synaptosomach (7, 8).

Rozmieszczenie kanałów Na^+ przede wszystkim w dendrytach, aksonach i zakończeniach nerwowych przemawia za ich czynnym udziałem w takich procesach synaptycznych jak powstawanie i przewodzenie potencjału czynnościowego, uwalnianie neuroprzekaźników (9).

III. Kanały potasowe

Ponad 30 lat temu Hodgkin i Huxley (1) wykazali, że po procesie depolaryzacji spowodowanym wniknięciem do komórki jonu sodowego, istnieje możliwość odbudowy potencjału błonowego do wartości podstawowych; zachodzi to w wyniku wzmożonego przemieszczania jonów K^+ z aksonu. Różne pod względem morfologicznym i czynnościowym neurony charakteryzują się różnymi rodzajami kanałów potasowych. Jedne z nich są otwarte, kiedy potencjał błony ma wartość bliską potencjałowi spoczynkowemu, a regulacja ich czynności zachodzi poprzez proces „wzbudzenia”, drugi rodzaj kanałów K^+ wrażliwych na różnicę potencjałów, aktywowany jest przez depolaryzację i trzeci rodzaj zależny jest od Ca^{2+} . Ta forma kanału K^+ otwarta jest tylko, kiedy poziom wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} jest wysoki (1, 10).

Kanały potasowe są odporne na działanie np. toksyn skorpionia, które blokują kanały Na^+ , a szybkość przepływu jonu K^+ przez odpowiedni kanał jest wyraźnie mniejsza w porównaniu z przepływem Na^+ . Podstawą podziału kanałów K^+ są różnice w ich odpowiedzi na stosowane czynniki regulujące (10, 11). I tak aktywność kanałów K^+ regulowana może być przynajmniej przez cztery zmienne: a — potencjał spoczynkowy błony, b — różnice potencjałów, c — zmiany stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} oraz d — działanie różnych neuroprzekaźników (12, 13, 14, 15, 16). W efekcie uzyskuje się różne, selektywne odpowiedzi neuronu na stosowanie tego samego bodźca (17, 18, 19, 20, 21).

Zakłada się w związku z tym, że różnice w czynności kanałów K^+ wywołane tym samym czynnikiem regulującym, mogą stanowić wykładnik zróżnicowania neuronów w układzie nerwowym (22).

Prawidłowa czynność kanałów K^+ reguluje procesy egzocytozy i moduluje działanie synaptyczne w komórce nerwowej. Czynność kanałów K^+ wpływa pośrednio na własności behawioralne ustroju i procesy utrwalania pamięci (23).

Ostatnio dużą uwagę przypisuje się badaniom nad charakterystyką specyficznych kanałów K^+ regulowanych neuroprzekaźnikami. Są to kanały K^+ „M” znalezione w neuronach CUN różnych populacji i kanał K^+ „S” wykryty tylko w neuronach czuciowych. Stwierdzono też, że poza klasycznymi neuroprzekaźnikami i peptydami o działaniu transmittersym regulacja aktywności tych rodzajów kanałów K^+ zachodzi również poprzez zmiany stężenia Ca^{2+} (24, 25). Jak następnie wykazano te dwa rodzaje kanałów są najlepiej zbadane wśród wielkiej liczby kanałów K^+ w komórce nerwowej, wrażliwych na neuroprzekaźniki (18, 24, 25).

IV. Odbudowa gradientu Na^+ i K^+ w zakończeniach komórki nerwowej

Dla utrzymania gradientu jonowego w neuronach, podobnie jak i w komórkach pozaneuronalnych, działają pompy jonowe oraz różne inne mechanizmy.

Głównym mechanizmem, który usuwa z wnętrza Na^+ i przywraca prawidłowe stężenie K^+ jest klasyczna, zależna od ATP pompa Na^+ , K^+ , która zajmuje centralną pozycję w funkcjach neuronalnych. Transport Na^+ z komórki nie zawsze jednak bywa sprzężony z wprowadzeniem K^+ do jej wnętrza. Usunięcie Na^+ z komórki bez kompensacyjnego wejścia K^+ stanowi o wytworzeniu elektrochemicznego potencjału i jest istotą tzw. pompy elektrogennej (26).

Utrzymanie gradientu stężeń Na^+ między wnętrzem komórki, a przestrzenią pozakomórkową decyduje również o osmolalności wewnątrzkomórkowej, a w następstwie o objętości komórki.

Z drugiej strony rozkład stężeń Na^+ kształtowany może być przez różne procesy wymiany jonowej, których konsekwencje określają prawidłowe lub zaburzone czynności neuronalne. Wprowadzenie Na^+ do zakończeń komórki nerwowej w miejsce usuniętego z cytoplazmy Ca^{2+} powoduje zahamowanie tych procesów biochemicznych, które przebiegają tylko wobec „progowego” stężenia wapnia. Dotyczy to również procesów egzocytozy (27, 28).

Energia „zakumulowana” w nierównomiernym rozkładzie Na^+ po obu stronach błony wykorzystywana może być m.in. do transportu cukrów, aminokwasów, neuroprzekazników jak i ich prekursorów (29). We frakcjach zakończeń nerwowych wykazano ścisłą zależność między procesami transmisji synaptycznej, a gradientem Na^+ (30).

Aktywność pompy Na^+ w neuronach limitowana jest wewnętrznym stężeniem Na^+ (31, 32). Wzrost stężenia Na^+ w cytoplazmie związany np. z potencjałem czynnościowym, może aktywować pompę sodowo-potasową. W efekcie może dojść do hyperpolaryzacji komórki, jako że trzy wewnętrzne jony Na^+ wymieniane są na tylko dwa jony K^+ wprowadzane do komórki (33, 34, 35, 36).

IV-1. Biochemiczna charakterystyka Na^+ , K^+ -ATPazy

Badania struktury i funkcji Na^+ , K^+ -ATPazy izolowanej z różnych materiałów biologicznych wykazały, że enzym ten składa się przynajmniej z dwu polipeptydowych łańcuchów stanowiących podjednostki enzymu (37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44).

Podjednostka większa, katalityczna nazywana alfa (α) o masie cząsteczkowej ca 100 000—130 000 zawiera nieznaczną komponentę węglowodanową i miejsce wiązania ATP na wewnętrznej stronie, podczas gdy miejsce wiązania ouabainy znajduje się na zewnętrznej stronie błony (45).

Podjednostka mniejsza beta (β) o masie cząsteczkowej $\sim 40\,000$ — $60\,000$ zawiera część glikoproteinową oraz dodatkowo fragment proteolipidowy (c.cz. $\sim 12\,000$), którego rola funkcjonalna jest na razie trudna do ustalenia (36, 42, 44). Wiadomym jest, że usunięcie podjednostki mniejszej z enzymu powoduje stratę jego aktywności.

Na^+ , K^+ -ATPaza izolowana z mózgowia okazała się enzymem występującym w dwu formach: jednej podstawowej, właściwej tak dla mózgowia jak i innych tkanek czy narządów (mięśnie, nerki, kora nadnerczy) i drugiej formy specyficznej wyłącznie dla neuronów. Ta specyficzna neuronalna forma Na^+ , K^+ -ATPazy pojawia się w rozwijających się tkankach mózgowia niezależnie od formy podstawowej (40).

Następne badania specyficznej formy neuronalnej Na^+ , K^+ -ATPazy wykazały jej heterogenność. Różnice dotyczą przede wszystkim składu podjednostek, oporności na proteolizę, kinetyki reakcji oraz rodzaju odpowiedzi po stosowaniu glikozydów nasercowych, zwłaszcza strofantyny G (40, 41, 46, 47, 48). Wykazano też, że jedna z „odmian” specyficznej neuronalnej Na^+ , K^+ -ATPazy odpowiedzialna jest wyłącznie za tzw. cykl sodowy, druga zaś za mechanizm wymiany Na^+ i K^+ . Wykazano wyraźne różnice w ich powinowactwie wobec substratu. Podczas procesu hydrolizy ATP tylko cząsteczki enzymu odpowiedzialne za cykl sodowy ulegają fosforylacji (4, 50, 51).

IV-2. Rozmieszczenie Na^+ , K^+ -ATPazy w neuronach

Rozmieszczenie enzymu w neuronach ogranicza się głównie do plazmolemy. Występuje on na powierzchni ciała komórki nerwowej i w dendrytach. Znaczne aktywności enzymu stwierdzono w obrębie przewężeń Ranviera w aksonach z mielinowymi osłonkami oraz we frakcji mikrosomalnej (47).

Zakończenia komórek nerwowych można podzielić na dwie klasy: o niskiej i o wysokiej aktywności Na^+ , K^+ -ATPazy. Różnice w stężeniu Na^+ , K^+ -ATPazy prawdopodobnie mogą mieć znaczenie w regulacji odpowiedzi różnych neuronów na różne rodzaje stymulacji.

IV-3. Regulacja aktywności Na^+ , K^+ -ATPazy

Wykazano, że neurohormony i neuroprzekaźniki takie jak wazopresyna, katecholaminy mogą regulować aktywność Na^+ , K^+ -ATPazy tak w obrębie neuronów jak i w zakończeniach komórek nerwowych (52, 53). Aminy biogenne takie jak noradrenalina, dopamina, 5-hydroktryptamina czy histamina wywierają wpływ na aktywność Na^+ , K^+ -ATPazy również we frakcjach synaptosomów uzyskanych z różnych obszarów mózgowia.

Uzyskane efekty warunkować ma obecność w cząsteczce aminy lub innego stosowanego związku, tzw. „jądra” katecholowego, któremu przypisuje się rolę stymulatora Na^+ , K^+ -ATPazy synaptosomów. Wynik działania zależeć ma również od obszaru mózgowia, z którego izolowano frakcję synaptosomów (54, 55). W wielu z tych procesów prawdopodobnie pośredniczą cykliczne nukleotydy i kinazy białkowe zależne od cAMP (52, 53).

Efekty wybiórczej, zależnej od obszaru mózgowia stymulacji bądź inhibicji aktywności Na^+ , K^+ -ATPazy błon synaptosomalnych uzyskano stosując 11-peptyd substancję P, także fragmenty jej analogów SP_{5-11} i SP_{6-11} (Pyr^5 , Tyr^6), krótszy neuropeptyd TRH, czy L-glutaminian.

Analizując udział cAMP w działaniu wyżej wymienionych substancji stwierdzono, że cykliczne nukleotydy modulują efekty działania stosowanych peptydów. Redukują wyraźną stymulację czy inhibicję wywołaną działaniem peptydów. cAMP zastosowany łącznie z L-glutaminianem niweluje zmiany aktywności Na^+ , K^+ -ATPazy spowodowane stosowaniem tego aminokwasu (56, 57).

Uzyskane rezultaty zbieżne są z wynikami działania hormonów tarczycy i kwasu arachidonowego w badaniu aktywności ATPazy mózgowej (58). Stanowią one potwierdzenie ogólnych założeń, że niektóre hormony i związki o działaniu neuroprzekaznikowym mogą modulować różne procesy synaptyczne, także poprzez regulację stężenia czy aktywności białka enzymatycznego odpowiedzialnego za przemieszczanie Na^+ i K^+ w zakończeniach komórek nerwowych (59).

V. Kanały wapniowe

V-1. Ogólna charakterystyka kanałów wapniowych

Stwierdzono, że kanały Ca^{2+} występujące tak w tkance nerwowej jak i pozanerwowej różnią się znamienne właściwościami kinetyki reakcji oraz różnią odpowiedzią na stosowanie tych samych inhibitorów. Stało się to podstawą sugestii, że uzyskane z jednorodnego materiału biologicznego kanały wapniowe są niejednorodne (60).

Szczegółowe badania wykazały pewne podobieństwa i różnice w działaniu kanałów Ca^{2+} i Na^+ . Kanały Ca^{2+} , w przeciwieństwie do kanału sodowego, pozostają w synapsach otwarte w czasie przedłużonej depolaryzacji (61, 62, 63), a ilość przemieszczanych jonów Ca^{2+} przez kanały stanowi tylko 1/20 liczby jonów Na^+ przenoszonych w tym czasie przez kanał sodowy. Sygnałem otwierającym kanał Ca^{2+} jest różnica potencjału, a po wyrównaniu różnicy kanały zamykają się.

Dogodnym układem do badań kanałów Ca^{2+} są zakończenia komórek nerwowych kałamarnicy. Sugeruje się, że ich błony są szczególnie bogate w kanały Ca^{2+} , które mogą występować w tzw. skupieniach — gronach.

Zaobserwowano, że w czasie powtarzającej się stymulacji nerwowej ilość wnikaącego Ca^{2+} do zakończeń nerwowych w przeliczeniu na jeden impuls pozostaje stała i wykazuje liniową zależność od ilości bodźców (cyt. za 64).

Liczba jonów, które przemieszczają się przez pojedynczy kanał w czasie jednego impulsu może być obliczona, jeżeli znana jest „gęstość” występowania kanałów w badanym materiale. Zakłada się, że każdy kanał Ca^{2+} przemieścić może około 150 jonów Ca^{2+} w czasie jednego impulsu (cyt. za 64).

V-2. Regulacja kanałów wapniowych i ich znaczenie biologiczne

Wszystkie krótkotrwałe procesy neuronalne powodujące tzw. plastyczność synaptyczną wiążą się ściśle z modulacją poziomu Ca^{2+} , aczkolwiek należy podkreślić, że różne są mechanizmy odpowiedzialne za zmiany poziomu tego kationu.

Wewnątrzkomórkowy poziom Ca^{2+} zależy m.in. od zdolności akumulacji tych jonów wprowadzanych głównie w czasie następujących po sobie stymulacji, jak również od bezpośrednich modyfikacji jakim podlega czynność kanałów wapniowych (65, 66, 67, 68, 69). Ilość Ca^{2+} przemieszczanego do wnętrza regulowana jest czynnością kanałów Na^+ i K^+ oraz wartością potencjału czynnościowego (70).

Wpływ na procesy przemieszczania i gromadzenia Ca^{2+} w zakończeniach neuronów wywierają także hormony i neuroprzekazniki, które regulując czynność kanałów wapniowych modyfikują w ten sposób efektywność zjawisk synaptycznych. Znaczny wzrost stężenia Ca^{2+} w zakończeniach neuronów prowadzi często do inaktywacji kanałów wapniowych.

Inaktywację kanałów Ca^{2+} osiąga się poprzez wprowadzenie Ca^{2+} do cytoplazmy w ilościach przewyższających prawidłowe jego stężenie w tym przedziale komórki. Pod wpływem działania niektórych hormonów czy przekazników jak np. noradrenaliny, γ -aminomaślanu, czy somatostatyny obserwuje się redukcję przepływu Ca^{2+} przez kanał (67). W czasie działania inhibitorów neurotransmisji na błonę presynaptyczną obserwuje się wyraźną redukcję uwalniania przekaznika i równocześnie przepływu Ca^{2+} . Spadek przepływu Ca^{2+} wydaje się być odbiciem bezpośredniego działania przekaznika na czynność kanału wapniowego, który nie podlegał żadnym modyfikacjom w czasie zmian potencjału błony (68).

Mechanizm inhibitorowego działania neuroprzekazników na kanały jonowe nie jest dotychczas znany. Wydaje się jednakże, że np. kanały Ca^{2+} nie są regulowane wyłącznie działaniem neurotransmiterów. Stwierdzono bowiem, że np. ATP podany zewnątrzkomórkowo w stężeniu zbliżonym do nanomolowego, wywołuje wzrost przepływu Ca^{2+} o 25–30%,

a stymulacji tej nie towarzyszy hydroliza ATP (71). Wiadomo także, że ATP uwalniany jest razem z wieloma neuroprzekaznikami, zatem stymulujący efekt ATP na przepływ Ca^{2+} może mieć istotne znaczenie fizjologiczne.

Należy podkreślić, że o ile regulacja czynności kanałów Ca^{2+} występujących w mięśniu sercowym jest dość dobrze poznana, to modyfikacje czynności neuronalnych kanałów Ca^{2+} , których skutki łączą się ze zmianami w przewodzeniu synaptycznym są na razie mało znane.

VI. Usuwanie Ca^{2+} z cytoplazmy

Wapń, który wnika do komórki w czasie utrzymywania się potencjału czynnościowego, usuwany jest z cytoplazmy przez różne, zgodnie działające mechanizmy. Zarówno w plazmolemie aksonów, jak i w synaptosomach zachodzi aktywna wymiana $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Stwierdzono tamże znaczną aktywność zależnej od Ca^{2+} i innych jonów ATPazy, której zadaniem jest czynne usuwanie Ca^{2+} z komórki (72).

Potencjał elektrochemiczny wewnętrznej błony mitochondrialnej jest źródłem energii, którą kompleks ATPazy mitochondrialnej zamienia na ATP. Energia wymagana jest m.in. do zapewnienia wysokiej zdolności pobierania Ca^{2+} przez mitochondria, również synaptosomalne (73, 74, 75).

Niemniej jednak w warunkach prawidłowych poziom cytoplazmatycznego Ca^{2+} jest znacznie niższy niż mogłyby to zapewnić sprawne mitochondria. Zatem układ „transportujący”, który występuje w mitochondriach stanowi ważny, ale nie jedyny mechanizm regulowania poziomu Ca^{2+} cytoplazmatycznego w czasie intensywnego napływu tego kationu. Innymi subkomórkowymi frakcjami pobierającymi wapń okazały się gładkie retikulum endoplazmatyczne oraz pęcherzyki synaptyczne (76, 77).

W pęcherzykach synaptycznych udało się ustalić „układ” odpowiedzialny za pobieranie Ca^{2+} , a zależny od ATP, ale brak jest na razie przekonujących dowodów, że procesowi temu towarzyszy hydroliza ATP (78, 79, 80). Błony pęcherzyków synaptycznych zdolne są utworzyć znaczny potencjał elektrochemiczny, który prawdopodobnie umożliwi gromadzenie neurotransmiterów, a także mógłby stanowić źródło energii koniecznej do pobierania Ca^{2+} (79, 80).

W przypadku uwolnienia Ca^{2+} przez wewnątrzkomórkowe organeli winien on być przeniesiony na zewnątrz komórki, aby uruchomić ją przed niekontrolowaną aktywacją wielu biochemicznych procesów, które zachodzą w obecności ponadprogowego stężenia Ca^{2+} .

Transport Ca^{2+} z zakończeń neuronalnych zachodzi najprawdopodobniej na drodze wymiany $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (jako jeden z możliwych mechanizmów), a usuwanie tego kationu z organeli neuronalnych stanowi na razie zagadnienie całkowicie niewyjaśnione.

VI-1. Ogólna charakterystyka pomp wapniowych

Zmiany w stężeniu Ca^{2+} w zakończeniach komórek nerwowych uznaje się za jeden z podstawowych czynników regulujących czynności neuroprzekazników i procesy synaptycznej transmisji. Poziom Ca^{2+} z kolei jest odbiciem sprawności wielu mechanizmów odpowiedzialnych za przemieszczanie tego kationu. ATPaza transportująca głównie Ca^{2+} z synaptosomów mózgowia wykazuje wyraźne różnice w kinetyce reakcji w porównaniu z ATPazą transportującą Ca^{2+} z retikulum sarkoplazmatycznego (81). Znaczną aktywność ATPazy zależnej głównie od Ca^{2+} stwierdzono w nieuszkodzonych synaptosomach, w ich błonach zewnętrznych, a także w błonach pęcherzyków wewnątrzsynaptycznych. Najwyższą natomiast aktywność ATPazy — Ca^{2+} , Mg^{2+} udało się zaobserwować w pęcherzykach pochodzących z zewnętrznych błon synaptosomalnych i pęcherzykach synaptycznych, a znacznie mniejszą aktywność tego enzymu w nieuszkodzonych synaptosomach (82).

Enzym ten zidentyfikowano jako pompę wymienną — $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ stymulowaną jonami Mg^{2+} (83, 84, 47). Niezależnie od tego opisano przynajmniej dwa „rodzaje” ATPazy występującej w mikrotubulach mózgowych stymulowanych tubuliną lub inhibowanych Ca^{2+} (85, 86, 87, 88).

Synaptosomalny, zależny od ATP układ przenośnikowy Ca^{2+} okazał się dobrze rozpuszczalny w kwasach, natomiast jego „odbudowa” zachodzi sprawnie w obecności fosfolipidów w stężeniach przewyższających znacznie stężenie białka.

Analiza frakcji pęcherzyków synaptycznych na żelu poliakryloamidowym wykazała, że układ transportowy Ca^{2+} składa się z dwu białek o masie cząsteczkowej 94 000 i 140 000 (83, 89). Białko o masie 140 000 izolowane z synaptosomów okazało się identyczne co do masy cząsteczkowej z Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPazą otoczek krwinek czerwonych oraz wykazywało znaczne podobieństwo z innymi ATPazami zależnymi od Ca^{2+} i Mg^{2+} otrzymanymi z innych tkanek (90).

Wykazano następnie, że aktywność tego neuronalnego białka jest silnie stymulowana przez kalmodulinę, co może być wykorzystane w próbach oczyszczania tego enzymu. Chromatografii opartej o powinowactwo do kalmoduliny nie udaje się zastosować do izolowania neuronalnego transportera Ca^{2+} o masie cząsteczkowej ok. 94 000. Badania immunologiczne wykazały, że białko to może być specyficznym transporterem Ca^{2+} w układzie nerwowym (84). Obecnie zakłada się, że zakończenia nerwowe posiadają przynajmniej dwa układy przenośnikowe dla Ca^{2+} , zależne bezpośrednio od ATP oraz inne, zależne od gradientu stężeń jonów (26). Ca^{2+} , który podczas potencjału czynnościowego wnika do cytoplazmy i jest z niej usunięty przez właściwe wewnątrzkomórkowe organele, zanim ulegnie wydzieleniu z komórki.

VI-2. Regulacja Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPazy w zakończeniach neuronalnych

Ostatnio pojawiają się dość liczne i nierzadko kontrowersyjne doniesienia dotyczące regulacji aktywności ATPaz zależnych od Ca^{2+} i Mg^{2+} , izolowanych z różnych frakcji subkomórkowych mózgowia, zwłaszcza zakończeń neuronalnych. Badania dotyczą wpływu mono- i dwuwartościowych kationów, anionów, amin biogennych, szeregu środków farmakologicznych, jak również związków endogennych wchodzących w skład błon komórkowych na aktywność ATPazy synaptosomów, pęcherzyków synaptycznych i błon pre- i postsynaptycznych.

Inną grupę badań stanowią prace nad określeniem stopnia powinowactwa tych enzymów (Km) do różnych form stosowanych substratów; jest to ATP wolny od wanadu, z wanadem, w postaci soli sodowej, wapniowej czy magnezowej. Uzyskane rezultaty pozwoliły na zebranie pewnych informacji, z których wynika, że występują wyraźne różnice w aktywności badanych ATPaz zależne od obszaru mózgowia, bądź frakcji subkomórkowej, lub od różnorodności związków stosowanych w badaniach. Nie udało się na razie ustalić, które z badanych związków mają charakter wyłącznie dodatnich efektorów, a które inhibitorów aktywności ATPaz neuronalnych. Wykazano np., że dopamina, noradrenalina, chlorek litu podnoszą aktywność Mg^{2+} -ATPazy i Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPazy w zakończeniach synaptycznych, a chlorpromazyna i trifluoperazyna redukują aktywność wyłącznie Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPazy (55, 91, 92, 93). Stwierdzono również, że tzw. „dwuwartościowe”, „kationowe” ATPazy izolowane z frakcji synaptosomów i błon synaptosomalnych są intensywniej stymulowane przez jony Mn^{2+} niż przez jony Mg^{2+} czy Ca^{2+} (94, 55). Niezależnie od tego wykazano wyraźne różnice w odporności na hipoksję Na^+ , K^+ i Ca^{2+} Mg^{2+} -ATPaz mózgowia (48). Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPaza błon synaptosomalnych jest również bardziej „wrażliwa” *in vitro* na substancję P, jej analogi fragmentów (SP_{5-11} i SP_{6-11}), także wobec trójpeptydu TRN i L-glutaminianu, niż ATPaza zależna od Na^+ i K^+ .

Wzrost bądź zahamowanie aktywności enzymów okazał się zależny ponadto od obszarów mózgowia, z których izolowano błony synaptosomalne (95, 96). Stwierdzono równocześnie, że egzogenny cAMP moduluje działanie wybranych peptydów wobec Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPazy błon synaptosomalnych, a nasila zmiany w aktywności enzymu spowodowane L-glutaminianem. Na razie trudno jest przedstawić mechanizm stymulacji neuronalnych ATPaz przez katecholaminy i peptydy. Wydaje się, że proces ten może pojawiać się jako zjawisko niespecyficzne, polegające na usunięciu inhibitorowego efektu „ponadprogowego” stężenia dwuwartościowych jonów w stosunku do ATPazy. Stosowane peptydy zależne od struktury i ładunku elektrycznego mogą spełniać rolę chelatorów jonów dwuwartościowych, lub być wobec nich kompetycyjne. W ten sposób byłyby znoszony hamujący efekt nadmiaru tych jonów, co mogłoby się przejawiać jako

niespecyficzna stymulacja. Jest to jedna z możliwości wyjaśnienia tego zjawiska. Być może podobne zjawisko odgrywa rolę *in vivo*, kiedy w wyniku fluktuacji stężeń jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , uwarunkowanych poprzednio omawianymi procesami, stężenie jonów osiągnie określoną wartość ponadprogową. Warto bowiem nadmienić, że aktywność ATPaz neuronalnych, jak wykazały doświadczenia *in vitro*, może być hamowana przez określony nadmiar wapnia czy magnezu (91).

VII. Rola wapnia w zakończeniach komórek nerwowych — uwagi końcowe

Zmiany w stężeniu cytoplazmatycznego Ca^{2+} , jak pokrótce przedstawiłam powyżej, powodują określone i złożone konsekwencje dla czynności synaptycznej. Poziom Ca^{2+} w cytoplazmie odpowiedzialny jest za stymulację procesów egzo- i endocytozy (97, 50, 98, 99). Duża wrażliwość jaką wykazują oba procesy na inhibitory kalmoduliny sugeruje, że właśnie kalmodulina — białko wiążące Ca^{2+} , może być pośrednikiem w działaniu wapnia w tych zjawiskach. Związek Ca^{2+} -kalmodulina stymuluje aktywność wielu neuronalnych pomp wapniowych, dzięki którym następuje np. redukcja stężenia cytoplazmatycznego Ca^{2+} . Kalmodulina aktywuje kinazy białkowe, które następnie stymulują działanie aktywnego transportera Ca^{2+} w pęcherzykach synaptycznych. Intensywność procesów oddychania komórkowego i glikogenolizy w zakończeniach komórek nerwowych rośnie pod wpływem Ca^{2+} . Wykazano między innymi, że kompleks Ca^{2+} -kalmodulina aktywuje kinazę fosforylasy b glikogenu. Cytoplazmatyczne stężenie Ca^{2+} wpływa na „modulowanie” syntezy neuroprzekaźników poprzez wzrost aktywności układów transportujących prekursor neuroprzekaźników, lub enzymów odpowiedzialnych za podstawowe reakcje biosyntezy neuroprzekaźników. Jony Ca^{2+} aktywują transport choliney w neuronach cholinergicznym, hydroksylazę tyrozyny w neuronach katecholaminergicznym i hydroksylazę tryptofanu w neuronach serotonergicznym. Aktywacja enzymów może być wynikiem fosforylacji zachodzącej z udziałem kinaz białkowych wrażliwych na Ca^{2+} -kalmodulinę. Wszystkie te „działania” mają fundamentalne znaczenie dla utrzymania puli ATP, neuroprzekaźników i Ca^{2+} na poziomie podstawowym, co zapewnia homeostazę funkcjonowania procesów neuronalnych (100, 101).

Należy wspomnieć, że Ca^{2+} wykazuje również działania na poziomie neuronalnym, lecz ich efekty są na razie mniej znane. Jest to np. interakcja kompleksu Ca^{2+} -kalmodulina z różnymi formami cykazy adenylanowej i fosfodwuesterazy o wysokim powinowactwie do cAMP (102, 103).

Poziom cytoplazmatycznego Ca^{2+} może redukować również aktywność niektórych kanałów Ca^{2+} , a aktywować „efektywność” kanałów K^{+} zależnych od Ca^{2+} , powodując w rezultacie wzrost lub obniżenie efektywnego

przewodzenia synaptycznego. Godne podkreślenia jest, że w procesie LTP (long-term-potential) — potencjalizacji transmisji synaptycznej w hipokampie niezbędny jest udział Ca^{2+} . Pozwala to wnioskować, że kation ten bierze udział w zmianach tzw. plastyczności synaptycznej, które leżą u podstaw procesów pamięci.

Zdaję sobie sprawę, że część problemów niniejszej pracy przedstawiona jest ramowo. Nie sposób jednak w jednym artykule omówić wszystkich zagadnień dotyczących procesów transportu głównych kationów w zakończeniach komórek nerwowych. Zwłaszcza, że w literaturze tego przedmiotu pewne zagadnienia są zbyt słabo udokumentowane i przedstawione w formie nierzadko kontrowersyjnych hipotez.

Opracowanie materiałów wykonano w ramach tematu węzłowego 10.4.04.4., koordynowanego przez C.M.D. i K. PAN.

Zaakceptowano do druku 7.09.1984 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Hodgkin A. L., Huxley A. F., (1952), *J. Physiol.*, **117**, 500—544.
2. Ritchie J. M., (1979), *Ann. Rev. Neurosci.*, **2**, 341—362.
3. Hille B., (1976), *Ann. Rev. Physiol.*, **38**, 139—152.
4. Rogart R., (1981), *Ann. Rev. Physiol.*, **43**, 711—725.
5. Harsthorne R. P., Catterall W. A., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4620—4624.
6. Harsthorne R. P., Messner D. J., Coppersmith J. C., Catterall W. A., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 13889—13891.
7. Weigele J. B., Barchi R. L., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3951—3955.
8. Talvenheime J. A., Tamkun M. M., Catterall W. A., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 11868—11871.
9. Wong R. K. S., Prince D. A., Basbaum A. J., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 986—990.
10. Connor J. A., Stevens C. F., (1971), *J. Physiol.*, **213**, 21—30.
11. Connor J. A., Stevens C. F., (1971), *J. Physiol.*, **213**, 31—53.
12. Kethoe J., Marty A., (1980), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **9**, 437—465.
13. Siegelbaum S. A., Camardo J. S., Kandel E. R., (1982), *Nature*, **299**, 413—416.
14. Kaczmarek L. K., Strumwasser F., (1981), *J. Neurosci.*, **1**, 626—634.
15. Adams P. R., Brown D. A., Constanti A., (1982), *J. Physiol.*, **330**, 537—572.
16. Ascher P., Chesnoy-Marchais D., (1982), *J. Physiol.*, **324**, 67—92.
17. Brown D. A., Adams P. R., (1980), *Nature*, **283**, 673—676.
18. Constanti A., Adams P. R., Brown D. A., (1981), *Brain Res.*, **206**, 244—250.
19. Kaczmarek L. K., Strumwasser F., (1981), *Soc. Neurosci. Abstr.*, **7**, 932.
20. Salkoff L., (1983), *Nature*, **302**, 249—251.
21. Salkoff L., Wyman R., (1981), *Nature*, **293**, 228—230.
22. Adams P. R., Smith S. J., Thompson S. H., (1980), *Ann. Rev. Neurosci.*, **3**, 141—167.
23. Kandel E. R., Schwartz J. H., (1982), *Science*, **218**, 433—442.

24. Cottrell G. A., (1982), *Nature*, **296**, 87—89.
25. Chiu S. Y., Ritchie J. M., (1981), *J. Physiol.*, **313**, 415—437.
26. Doherty J. A., (1979), *Pharmac. Ther.*, **7**, 123—151.
27. Baker P. F., Blaustein M. P., Hodgkin A. L., Steinhardt R. A., (1969), *J. Physiol.*, **200**, 431—458.
28. Baker P. F., (1977), *FEBS Symp.*, **42**, 430—431.
29. Schon F., Iverson L. L., (1974), *Life Sci.*, **15**, 157.
30. Suszkiw J. B., Pilar G., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 1133—1138.
31. Thomas R. C., (1972), *J. Physiol.*, **220**, 55—71.
32. Thomas R. C., (1969), *J. Physiol.*, **210**, 495—514.
33. Zubay G., (1983), *Biochemistry*, **17**, 626—632 Addison-Vesley Publishing Company.
34. Zubay G., (1983), *Biochemistry*, **10**, 390—394 Addison-Vesley Publishing Company.
35. Hobbs A. S., Albers R. W., (1980), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **9**, 259—271.
36. Peterson G. L., Hokin L. E., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 3751—3761.
37. Trachtenberg M. C., Packey D. J., Sweeney T., (1981), *Eur. Top. Cell. Regul.*, **19**, 159—217.
38. Cantley L. C., (1981), *Curr. Top. Bioenerg.*, **11**, 200—240.
39. Sweadner K. J., Goldin S. M., (1980), *N. Engl. J. Med.*, **302**, 777—783.
40. Sweadner K. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6060—6067.
41. Askari A., Wu-Hsiung H., McCormie P. W., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 3453—3460.
42. Ottolenghi P., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **99**, 113—131.
43. Forbush B., Hoffman J. F., (1979), *Biochemistry*, **18**, 2308—2315.
44. Forbush B., Kaplan J. H., Hoffman J. H., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3667—3676.
45. Carilli C. T., Farley R. A., Perlman D. M., Cantley L. C., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5601—5606.
46. Hansen D., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **568**, 265—269.
47. Jamaguhi J., Matsumura F., Kadous A. A., (1979), *Pesticide Biochem. Physiol.*, **11**, 285—293.
48. Mourek J., Trojanowa M., Stastny F., (1981), *Physiol. bohemslov*, **30**, 335—339.
49. Ceccarelli B., Grohovaz F., Hurlbut W. P., (1979), *J. Cell Biol.*, **81**, 163—177.
50. Ceccarelli B., Hurlbut W. P., (1980), *J. Cell Biol.*, **87**, 297—303.
51. Dreyer F., Peper K., Ahert K., Sandri C., Moor H., (1973), *Brain. Res.*, **62**, 373—380.
52. Banghler J. M., Corder C. N., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **524**, 455—465.
53. Spector M., O'Neal S., Racker E., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 5504—5507.
54. Lee S. L., Phillis J. W., (1977), *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **55**, 961—964.
55. Sawas A. H., Gilbert J. C., (1982), *Biochemical Pharmacology*, **31**, 1531—1533.
56. Janiszewska G., Lachowicz L., (1984), *Int. J. Biochem.*, praca w druku.
57. Breese G. R., Mueller R. A., Mailman R. B., Fryc G. D., (1981), *Role of Peptides and Amino Acids as Neurotransmitters*, **45**, 99—116.
58. Chan P. H., Kerlan R., Fishman R. A., (1983), *J. Neurochem.*, **40**, 309—316.
59. Klodos I., Norby J. G., Plesner I. W., (1981), *Biochem. Biophys. Acta*, **643**, 463—482.

60. Hagiwara S., Byerly L., (1981), *Ann. Rev. Neurosci.*, **4**, 69—125.
61. Llinas R., Steinberg I. Z., Walton K., (1981), *Biophys. J.*, **33**, 289—322.
62. Shapiro E., Castellucci V. F., Kandel E. R., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1185—1189.
63. Llinas R., Sugimori M., Simon S. M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2415—2419.
64. Reichard L. F., Kelly R. B., (1983), *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 871—926.
65. Kretz R., Shapiro E., Kandel E. R., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5430—5434.
66. Shapiro E., Castellucci V. F., Kandel E. R., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1185—1189.
67. Dunlap K., Fischbach G. D., (1981), *J. Physiol.*, **317**, 519—535.
68. Shapiro E., Castellucci V. F., Kandel E. R., (1980), *Proc. Natl. Sci. USA*, **77**, 629—633.
69. Charlton M. R., Smith S. J., Zucker R. S., (1982), *J. Physiol.*, **323**, 173—193.
70. Kandel E. R., (1981), *Nature*, **293**, 697—700.
71. Yatani A., Tsuda Y., Akaike N., Brown A. M., (1982), *Nature*, **296**, 169—171.
72. Gill D. L., Grollman E. F., Kohn L. D., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 184—192.
73. Ball M. R., McLean P., (1982), *Enzyme*, **28**, 368—374.
74. Wikström M., Krab K., Saraste M., (1981), *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 623—632.
75. Glaser E., Norling B., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **11**, 333—339.
76. McGraw C. F., Somlyo A. V., Blanstein M. P., (1980), *J. Cell Biol.*, **85**, 228—241.
77. Schmidt R., Zimmerman H., Whittaker V. P., (1980), *Neuroscience*, **5**, 625—638.
78. Raphaeli A., Parsons S. M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5783—5787.
79. Kanner B. J., Sharon I., Maron R., Schuldiner S., (1980), *FEBS Lett.*, **111**, 83—86.
80. Anderson D. C., King S. C., Parsons S. M., (1982), *Biochemistry*, **13**, 3037—3043.
81. Javors M. S., Bowden C. L., Ross D. H., (1981), *J. Neurochem.*, **37**, 381—387.
82. Schnapp B. J., Reese T. S., (1982), *J. Cell Biol.*, **94**, 667—679.
83. Papazian D. M., Rahamimoff H., Goldin S. M., (1982), *Soc. Neurosci. Abstr.*, **8**, 692.
84. Papazian D. M., Rahamimoff H., Goldin S. M., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3708—3712.
85. Tominaga S., Kaziro Y., (1982), *Biological Function of Microtubules and Related Structures*, **2**, 11—22 ISBN.
86. Tominaga S., Kaziro Y., (1983), *J. Biochem.*, **93**, 1085—1092.
87. Adams R. J., (1982), *Nature*, **297**, 327—329.
88. Hirokawa N., (1982), *J. Cell Biol.*, **94**, 129—142.
89. Hakim G., Itano T., Verma A. K., Penniston J. T., (1982), *Biochem. J.*, **207**, 225—231.
90. Niggli V., Adunyah E. S., Penniston J. T., Carafoli E., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 395—401.

91. van der Krogt J. A., Belford R. D. M., (1980), *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 857—867.
92. Hesketh J. E., Kinloch N., Reading H. W., (1977), *J. Neurochem.*, **29**, 883—894.
93. Nagy A., Shuster T. A., Rosenberg M. D., (1983), *J. Neurochem.*, **40**, 226—234.
94. Doherty J. D., Salem N., Lauter C. J., Trams E. G., (1983), *Neurochem. Res.*, **8**, 493—500.
95. Lachowicz L., Janiszewska G., Wojtkowiak R., (1984), *Int. J. Biochem.*, **16**, 337—340.
96. Lachowicz L., Janiszewska G., Wojtkowiak R., Wojtkowiak Z., (1983), *Int. J. Biochem.*, **15**, 164—165.
97. Llinas R., Steinberg I. Z., Walton K., (1981), *Biophys. J.*, **33**, 323—351.
98. Knight D. E., Baker P. F., (1982), *J. Membr. Biol.*, **68**, 107—140.
99. Salisbury J. L., Condeelis J. S., Satir P., (1980), *J. Cell Biol.*, **87**, 132—141.
100. DeLangen C. D. J., Mulder A. H., (1980), *Brain Res.*, **185**, 399—408.
101. Moskowitz N., Schook W., Beckenstein K., Puszkis S., (1983), *Brain Res.*, **263**, 243—250.
102. Hathaway D. R., Adelstein R. S., Klee C. B., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8183—8189.
103. Shrama R. K., Wang T. H., Wirch E., Wang J. H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 5916—5923.

ANDRZEJ KOZIK *

Białka wiążące ryboflawinę

Riboflavin-Binding Proteins.

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Białka wiążące ryboflawinę w normalnym osoczu
- III. Białka wiążące ryboflawinę z krwi i jaj ptaków
 - III-1. Białko wiążące ryboflawinę z białka i żółtka jaja — właściwości chemiczne po wyodrębnieniu
 - III-2. Właściwości antygenowe
 - III-3. Fizykochemiczny mechanizm oddziaływania ryboflawina — białko
 - III-4. Właściwości biologiczne flawoproteiny żółtkowej oraz jej osoczewego prekursora — biosynteza, transport, katabolizm
 - III-5. Właściwości biologiczne flawoproteiny białka jaja
- IV. Osocze białka wiążące ryboflawinę występujące w stanie ciąży
- V. Podsumowanie

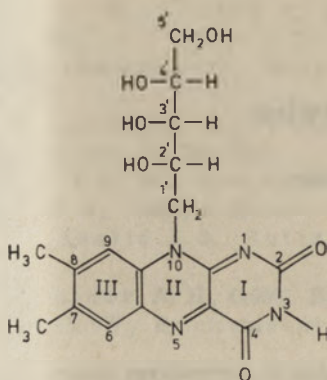
Contents

- I. Introduction
- II. Riboflavin-binding proteins in normal plasma
- III. Riboflavin-binding proteins from blood and eggs of birds
 - III-1. Egg-white and egg-yolk riboflavin-binding proteins — chemical properties after isolation
 - III-2. Antigenic properties
 - III-3. Physicochemical mechanism of riboflavin-protein interaction
 - III-4. Biological properties of egg-yolk flavoprotein and its plasma precursor — biosynthesis, transport, catabolism
 - III-5. Biological properties of egg-white flavoprotein
- IV. Pregnancy-specific plasma riboflavin-binding proteins
- V. Conclusions

* Dr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków.

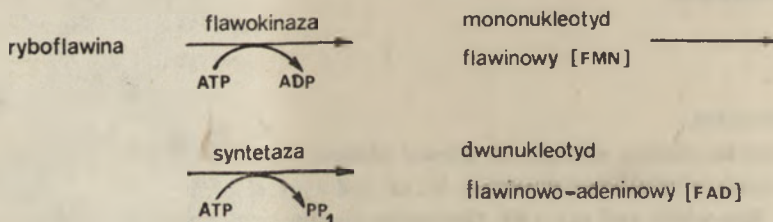
I. Wstęp

W pożywieniu ssaków i ptaków występuje, jako jeden z niezbędnych egzogennych składników, witamina B₂ — ryboflawina (Ryc. 1). W komór-



Rys. 1. Wzór strukturalny ryboflawiny. Podano numerację atomów w cząsteczce. Poszczególne pierścienie noszą następujące nazwy: I — pirymidynowy; II — pirazyńowy; III — o-ksylenowy; I+II+III — dwumetyloizooalloksazyńowy.

kach pod działaniem enzymów flawokinazy (1) oraz syntetazy FAD (2) ulega on przekształceniu w koenzymy flawinowe, zaangażowane w wielu bardzo ważnych biologicznie reakcjach oksydacyjno-redukcyjnych:



Zanim jednak ryboflawina dotrze do tkanek o wysokiej aktywności flawokinazy, może tworzyć mniej lub bardziej trwałe kompleksy z wieloma białkami. Białka wiążące ryboflawinę występują w osoczu, przeciwdziałając niezwłóznemu wydalaniu tej witaminy przez nerki oraz kierując ją do docelowych tkanek (3). Szczególnie interesujące są białka, odgrywające specyficzną rolę w procesach rozrodu, z których najlepiej poznana jest flawoproteina krążąca w krwi kur niosek, odkładana następnie w żółtku jaja. Analogiczna ryboflawinowa flawoproteina występuje również w białku jaja. Ostatnio, dzięki wprowadzeniu chromatografii powinowactwa na nieruchomionych flawinach (4), wykazano występowanie analogicznych białek wiążących ryboflawinę w osoczu ssaków w stanie ciąży.

W niniejszym artykule omówiono poszczególne białka wiążące ryboflawinę, na tyle szczegółowo na ile pozwala na to dostępna literatura.

II. Białka wiążące ryboflawinę w normalnym osoczu

Oszacowano, że 42% ryboflawiny krążącej w osoczu ssaków występuje w postaci kompleksów z białkami (5). Za wiązanie to niemal w całości odpowiedzialna jest albumina, której wysokie stężenie kompensuje stosunkowo niskie powinowactwo do ryboflawiny — stała dysocjacji odpowiedniego kompleksu wynosi ok. 0.7 mM (5). Wbrew wcześniejszym sugestiom (6) wykazano ostatnio, że wszystkie subfrakcje albuminy, różniące się punktem izoelektrycznym, posiadają zbliżoną zdolność wiązania tej witaminy (3). Wprawdzie szczegółowy mechanizm wiązania nie był badany, należy jednak oczekiwać zgodności z ogólnym mechanizmem oddziaływania albuminy z wieloma związkami o charakterze hydrofobowym lub amfipatycznym (7, 8), które to oddziaływanie warunkuje ogólną transportową funkcję tego białka.

Powinowactwo ryboflawiny wobec innych frakcji białkowych osocza, głównie wszekże β - i γ -globulin, wykazano stosując metody elektroforetyczne (9), a także oznaczenia zdolności wiązania tej witaminy (5) oraz jej zawartości w poszczególnych frakcjach (10). W wyniku frakcjonowania osocza bydłęcego na żelach zawierających unieruchomione flawiny (11) potwierdzono wiązanie ryboflawiny przez β -globuliny, a także wykryto drobne ilości białka wiążącego o masie cząsteczkowej około 37 000; ilościowo przeważającą frakcją wiążącą ryboflawinę okazały się jednak γ -globuliny o masie cząsteczkowej 150 000. Stałą dysocjacji kompleksów tych białek z ryboflawiną oszacowano na około 1 μ M. Wyizolowane podobną metodą z krwi ludzkiej γ -globuliny wiążące ryboflawinę (12) zidentyfikowano jako immunoglobuliny IgG. Występując w stężeniu około 7 mg/100 ml osocza stanowią one około 1% wszystkich immunoglobulin IgG. Immunoglobuliny wiążące ryboflawinę okazały się frakcją niejednorodną pod względem właściwości elektroforetycznych oraz powinowactwa do ryboflawiny. Oszacowano, że udział immunoglobulin w wiązaniu ryboflawiny przez białka osocza wynosi tylko 5—6% (12).

Poznano kilka szczegółów dotyczących mechanizmu wiązania ryboflawiny przez patologiczną immunoglobulinę, określaną jako IgG^{Gar}, wyizolowaną z surowicy pacjentów z mięśniakiem rozsianym (13). Jest to IgG2, z lekkim łańcuchem typu λ . W odróżnieniu od wszystkich innych przeciwciał, IgG^{Gar} występuje *in vivo* ze związanym haptenem (ryboflawiną), który ponadto pozostaje mocno związany w trakcie przebiegu wyodrębniania i oczyszczania. Ryboflawina związana jest z fragmentem Fab, a jej zawartość w preparatach IgG^{Gar} wynosi około 1.5 mola/mol białka (13). W kolejnych badaniach (14) białko to rozdzielono na dwie subfrakcje,

których charakterystyka podana jest w tabeli 1. W tabeli 2 zestawiono kinetyczne i termodynamiczne dane dotyczące odwracalnego wiązania ryboflawiny przez subfrakcję B (15). Stała dysocjacji kompleksu jest znacznie niższa niż w przypadku innych układów haptenu — przeciwnie. Z wartości entalpii, sprzyjającej asocjacji, można przypuszczać, że w wiązaniu odgrywają rolę mostki wodorowe i oddziaływania elektrostatyczne (15). Spektralne właściwości ryboflawiny związanej odwracalnie i nieodwracalnie są podobne — charakteryzują się całkowitym wygaszeniem fluorescencji flawinowej (15) oraz strukturą wibronową w pasmie przy 450 nm

Tabela 1

Właściwości dwóch subpopulacji immunoglobuliny wiążącej ryboflawinę IgG^{G_{ar}} (wg 14).

| Parametr lub właściwość | subfrakcja A | subfrakcja B |
|--|--|--------------------------|
| Względna masa cząsteczkowa | 160 000 | 160 000 |
| Punkt izoelektryczny | 6.4—6.5 heterogenność | 6.0—6.4 heterogenność |
| Zawartość ryboflawiny (mole/mol białka) | 2.0 | ok. 0.2 |
| Maksymalna zdolność wiązania (mole/mol białka) | 2 | 2 |
| Charakter wiązania | nieodwracalne, dysocjacja kompleksu w środowisku denaturującym | w pełni odwracalne |

Tabela 2

Charakterystyka odwracalnego wiązania ryboflawiny przez subfrakcję immunoglobuliny IgG^{G_{ar}} (głównie wg 15).

| Równowaga | miejsce wiążące + ryboflawina $\frac{k_1}{k_{-1}}$ / miejsce wiążące · ryboflawina |
|---|--|
| Parametry termodynamiczne (20°C) | $K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = 0.6 \text{ nM}$ $-\Delta H^\circ = 15 \text{ kcal/mol}$ $\Delta S^\circ = -9.5 \text{ kcal/mol}$ |
| Parametry kinetyczne (20°C) | $k_1 = 1.7-4.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $k_{-1} = 2.8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ |
| Zależność wiązania od pH | obniżenie powinowactwa przy pH < 6 lub > 8.5 |
| Kompetycja względem naturalnego ligandu | FMN > FAD > inne związki heteroaromatyczne (wg 13) |

w widmie absorpcyjnym oraz CD (14). Z jednej strony sugeruje to oddziaływanie ryboflawiny z resztami aromatycznymi w miejscu wiążącym, podobnie jak w przypadku innych flawoprotein (rozdz. III-3), z drugiej natomiast wskazuje na ogólne podobieństwo otoczenia ryboflawiny w centrach wiążących obu frakcji (14). Natura wiązania nieodwracalnego nie jest jasna; prawdopodobnie nie występuje wiązanie kowalencyjne ryboflawiny z białkiem, gdyż kompleks rozpada się po nieodwracalnej denaturacji białka w 3 M moczniku (15). Autorzy sugerują zachodzenie „po-translacyjnej zmiany konformacyjnej, która zamykałaby raz związaną ryboflawinę w miejscu wiążącym i sprawiałaby, że jej usunięcie z natywnego białka byłoby kinetycznie zabronione” (15).

Inną patologiczną immunoglobuliną wiążącą ryboflawinę ($K_d = 36 \mu M$) jest monoklonalna IgA produkowana przez mysia plazmocytomę MOPC — 315 (16).

Nie wiadomo na razie, czy dane dotyczące patologicznych immunoglobulin mogą stanowić wskazówkę co do mechanizmu oddziaływania ryboflawiny z immunoglobulinami normalnego osocza. Dla niektórych przynajmniej immunoglobulin wiążących ryboflawinę oddziaływanie to może wynikać z istnienia hydrofobowego centrum, przypadkowo (tj. niespecyficzenie) przyłączającego pierścień flawinowy (3).

III. Białka wiążące ryboflawinę z krwi i jaj ptaków

III-1. Białko wiążące ryboflawinę z białka i żółtka jaja — właściwości chemiczne po wyodrębnieniu

Występowanie w jajach kurzych flawoproteiny związanej z ryboflawiną, wykazane po raz pierwszy przez Rhodesa i wsp. (17), potwierdzono badając wiele innych gatunków ptaków (18—20). W postaci homogennych preparatów flawoproteinę tą wyizolowano zarówno z białka (18, 21—27) jak i żółtka (24, 27—31) jaj kurzych. Podano skład aminokwasowy oczyszczonych białek (21, 32) oraz szereg właściwości molekularnych, z których najważniejsze zebrano w tabeli 3. Kontrowersyjne są dane na temat struktury podjednostkowej — podawano, że cząsteczka białka zbudowana jest z dwóch identycznych podjednostek (32), z dwóch podjednostek o M_r 24 000 i 8000, połączonych dwoma lub trzema mostkami dwusiarczkowymi (39—41) lub z pojedynczego łańcucha polipeptydowego (34, 37, 42, 43). 1 mol białka może wiązać 1 mol ryboflawiny (np. 18, 21, 29, 34, 35, 43), wiązanie jest w pełni odwracalne i nie powoduje zmiany podstawowych parametrów molekularnych białka (18, 33, 37, 44). Ryboflawinowa flawoproteina zawiera również fosfor w ilości 7—8 reszt fosforanowych na cząsteczkę (18, 33, 45, 46) oraz składnik oligosacharydowy, którego skład jest jednak przedmiotem pewnych kontrowersji (21, 26, 30,

Tabela 3

Właściwości molekularne białka wiążącego ryboflawinę z jaj kurzych.

| Parametr | Wartość parametru (pozycja piśmiennictwa) |
|--|---|
| Względna masa cząsteczkowa | 32 000 (18, 30, 33, 34) lub 36 000 (18, 31, 32, 35, 36) |
| Współczynnik sedymentacji $s_{20,w}^0$ (S) | 2.76—3.16 (18, 32, 33, 37) |
| Współczynnik dyfuzji, $D_{20,w}^0$ ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) | 5.9—7.45 (18, 32, 33) |
| Cząstkowa objętość właściwa (ml/g) | 0.70 (18, 32) |
| Stosunek tarcia f/f_0 | 1.30—1.73 (33, 37) |
| Zawartość wody hydratacyjnej (g wody/g białka) | 0.27 (37) |
| Przybliżone rozmiary i kształt (półosie a i b modelowej elipsoidy obrotowej) | a/b = 1.77 a = 34.6 Å (37) b = 19.6 Å |
| Punkt izoelektryczny | 3.9—4.1 (18, 38) |

32, 33). Ostatnio opublikowane dane podano w tabeli 4; uwidacznia ona zarazem jedyną niepodważalną różnicę w podstawowych właściwościach flawoprotein z żółtka i białka. W odróżnieniu od flawoproteiny żółtkowej we flawoproteinie białkowej końcowe grupy karboksylowa i aminowa są prawdopodobnie zablokowane (33), a zawartość fosforu może być nieco niższa (46).

Dzięki prostocie i wysokiej wydajności metod izolowania, ryboflawinowa flawoproteina stała się obiektem intensywnych modelowych badań

Tabela 4

Składnik oligosacharydowy białek wiążących ryboflawinę z jaj kurzych (wg 36).

| Monosacharyd | Liczba reszt w cząsteczce flawoproteiny | |
|----------------------|---|----------|
| | z białka | z żółtka |
| Mannoza | 6.2 | 5.9 |
| Galaktoza | 2.1 | 4.9 |
| N-Acetyloglucozamina | 14.9 | 12.0 |
| Kwas sialowy | 1.1 | 4.2 |
| Fukoza | — | 1.1 |

oddziaływania flawina — białko (rozdz. III-3) oraz zyskała pewne zastosowanie analityczne: do oznaczania ryboflawiny (47, 48) oraz rozdzielów różnych flawin (49).

III-2. Właściwości antygenowe

Oczyszczone preparaty białka wiążącego ryboflawinę z jaja kurzego indukują powstanie swoistych przeciwciał w surowicy królika (26, 50, 51). Flawoproteiny z żółtka i białka są immunologicznie identyczne (50, 51). W natywnej makrocząsteczce główne determinanty antygenowe związane są z częścią białkową (30, 50, 52). Całkowita redukcja mostków dwusiarczkowych (53), intensywne utlenianie reszt tryptofanowych (53, 54) oraz łagodna, specyficzna modyfikacja grup ϵ -aminowych lizyny (53, 55) powoduje utratę przez flawoproteinę zdolności reakcji z przeciwciałem. Wykazano, że determinanty antygenowe są przestrzennie oddzielone od miejsca wiążącego ryboflawinę (54, 55).

Przeciwciała specyficzne wobec oligosacharydowego składnika białka wiążącego ryboflawinę można wytworzyć używając do immunizacji glikopeptydu, otrzymanego w wyniku trawienia natywnej flawoproteiny pronazą (56). Słabe własności antygenowe tego glikopeptydu uwarunkowane są końcową resztą β -galaktozylową (56).

III-3. Fizykochemiczny mechanizm oddziaływania ryboflawina — białko

W wielu pracach poświęconych białku wiążącemu ryboflawinę nie nawiązuje się bezpośrednio do jego roli biologicznej, lecz traktuje się je jako modelowy układ flawina — białko. Stąd np. zainteresowanie zredukowanymi formami związanej ryboflawiny (57—64), które nie mają znaczenia biologicznego w białku transportującym, nie wykazującym właściwości enzymatycznych.

Niektóre podstawowe fizykochemiczne właściwości kompleksu ryboflawina — białko wiążące przedstawiono w tabeli 5. Apoproteina wiąże również wiele analogów strukturalnych ryboflawiny, przy czym z reguły stała dysocjacji odpowiedniej holoproteiny jest wyższa niż w przypadku ligandu naturalnego (27, 43, 44, 58, 65—67, 69—73), głównie z powodu wzrostu stałej szybkości dysocjacji, k_{-1} (43). Z termodynamicznych badań nad oddziaływaniem apoproteiny z różnymi flawinami, uzupełnionych wieloma metodami spektroskopowymi oraz chemiczną modyfikacją reszt aminokwasowych białka, stopniowo wyłania się coraz bardziej szczegółowy obraz struktury miejsca, odpowiedzialnego za wiązanie ryboflawiny.

Miejsce to ma charakter hydrofobowy, o czym świadczą m.in. zmiany w widmie absorpcyjnym ryboflawiny po związaniu z białkiem (44, 65)

Tabela 5

Podstawowa fizykochemiczna charakterystyka kompleksu ryboflawiny z białkiem wiążącym z jaja kurzego (w nawiasie podano odpowiednie pozycje piśmiennictwa).

| Równowaga | Apoproteina + ryboflawina $\xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1}$ Apoproteina · ryboflawina |
|---|---|
| Parametry termodynamiczne (25°C) | $K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = 1.3\text{--}5.0 \text{ nM}$ (23, 31, 35, 43, 44, 65, 66, 67) $-\Delta G^\circ = 11.3\text{--}12.3 \text{ kcal/mol}$ (43, 65—67) $-\Delta H^\circ = 18.3\text{--}20.3 \text{ kcal/mol}$ (43, 66, 67) $\Delta S^\circ = 23\text{--}27 \text{ cal/K} \cdot \text{mol}$ (43, 66, 67) |
| Parametry kinetyczne (25°C) | $k_1 = 4.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (43) $k_{-1} = 0.061 \text{ s}^{-1}$ |
| Zmiany w widmie absorpcyjnym ryboflawiny | Pasma ok. 450 nm: przesunięcie batochromowe 445 → 455 nm, hipochromizm, struktura wibronowa. Pasma ok. 370 nm: hipochromizm. (43, 57, 58, 65, 68) |
| Stopień wygaszenia fluorescencji flawinowej | 100% (18, 34, 35, 43, 44, 58, 65) |
| Stopień wygaszenia fluorescencji białkowej | 86% (44, 65) 65% (58) |
| Produkt jednoelektronowej redukcji holoproteiny | Obojętny, „niebieski” semichinon (57, 58, 61, 63) |
| Wpływ pH na trwałość holoproteiny | Środowisko kwaśne: utrata zdolności wiązania, pK ok. 3.8 (21, 34, 58) Środowisko zasadowe: powyżej pH 9 wzrost K_d (43) |

oraz oddziaływanie miejsca wiążącego z różnymi hydrofobowymi substancjami organicznymi nie wykazującymi ścisłego podobieństwa strukturalnego do flawin (74—76). Miejsce wiążące jest sterycznie dopasowane do wielkości grupy karbonylowej przy C4 (43, 65), podstawników w pozycjach C7 — C9 pierścienia o-ksylenowego (65, 71, 73), zwłaszcza jednak C8 (43, 66, 67, 69, 73), w pozycji C1' (65) oraz do specyficznego przestrzennego układu grup hydroksylowych D-rybitolu (65, 73). Grupy hydroksylowe, z których najważniejsza jest grupa przy C2' (65, 73), tworzą wiązania wodorowe z resztami na powierzchni białka, natomiast pozostałe wyliczone pozycje uważa się za szczególnie ważne dla oddziaływania hydrofobowego flawiny z apoproteiną (77—79). Pierścień o-ksylenowy jest ukryty w głębi centrum wiążącego (66, 67, 69, 71, 75, 80) i wraz z pierścieniem pirazynowym (65) oddziałuje z wykrytymi w tym obszarze resztami tryptofanowymi (21, 54, 55, 74, 81), a ściślej z 1—2 resztami tego aminokwasu (34, 75, 82). Interakcja ta, odpowiedzialna za wygaszenie fluorescencji flawinowej w holoproteinie (65, 82), polega na ścisłym kontakcie płaskich

wielopierścieniowych cząsteczek ryboflawiny i tryptofanu z utworzeniem kompleksów $\pi - \pi$ (58, 65, 77, 78, 82), takich jakie demonstrowano w flawodoksynie (83) i modelowych układach chemicznych (84), a które występują prawdopodobnie w wielu innych flawoproteinach (85). Prawdopodobnie w tym właśnie obszarze centrum wiążącego, być może w bezpośrednim sąsiedztwie grupy metylowej przy C8 (66), zlokalizowano ostatnio pojedynczą grupę karboksylową (86), której znaczenie w oddziaływaniu ryboflawina — białko przypuszczano od dawna (21, 34, 87).

Z różnych fragmentów cząsteczki ryboflawiny największy udział w energii jej wiązania przez apoproteinę wnoszą łańcuch rybitolu oraz pierścień o-ksynowy (43, 65).

Odwracalność dysocjacji kompleksu ryboflawina-apoproteina pod wpływem wyskich stężeń mocznika (88) i chlorowodoru guanidyny (21, 89), wysokich ciśnień rzędu 5—8 kbarów (82), a także odporność omawianego białka na wysokie temperatury, do 100°C (18), wskazują na dużą trwałość natywnej struktury jego makrocząsteczki. Wieloma różnymi metodami wykazano, że konformacja holoproteiny jest trwalsza i bardziej zwarta w porównaniu z apoproteiną (58, 81, 89—91). Przejście konformacyjne w procesie wiązania ryboflawiny przez białko objawia się m.in. zmianami uporządkowania i ekspozycji reszt tryptofanowych (44, 58, 74), jednakże do zakresu zmian w strukturze drugorzędowej zdania są podzielone. Przy użyciu metod spektropolarymetrycznych nie wykazano różnic w zawartości struktur drugorzędowych między apoproteiną a holoproteiną z białka (33, 44) natomiast w przypadku flawoproteiny z żółtka stwierdzono niemal dwukrotny wzrost zawartości α -heliksu (58). Podobnie sprzeczne są doniesienia o zmianach ekspozycji reszt aminokwasowych (58 *versus* 81).

Ostatnio wyazano (37), że dysocjacja kompleksu ryboflawina — apoproteina w środowisku kwaśnym spowodowana jest przejściem konformacyjnym w makrocząsteczce białka, przejawiającym się mierzalnymi zmianami podstawowych parametrów molekularnych, m.in. współczynnika sedymentacji $s_{2,w}$, stosunku współczynników tarcia f/f_0 , powierzchni cząsteczkowej, stoncia hydratacji i innych. Zawartość struktur drugorzędowych nie ulega wprawdzie zmianom, następuje jednak zmniejszenie uporządkowania reszt aromatycznych, co z kolei sugeruje otwieranie się szczeliny wiążącej ryboflawinę.

Redukcja wiązań dwusiarczkowych białka, pociągająca za sobą zaburzenie natywnej struktury makrocząsteczki, powoduje utratę zdolności wiązania ryboflawiny (33, 34, 53). Ostatnio przedstawiono hipotezę, że pojedynczy mosek dwusiarczkowy jest konieczny dla utrzymania prawidłowej konformacji obszaru odpowiedzialnego za wiązanie (42).

Wprawdzie mechanizmy oddziaływania ryboflawina — białko w flawoproteinach z białka i żółtka są bardzo podobne, jednak w bezpośrednich porównaniach wykryto pewne różnice w wartościach parametrów

termodynamicznych kompleksów flawina — apoproteina (66, 67). Prawdopodobnie zatem topografie miejsc wiążących obu flawoprotein różnią się w szczegółach (67). Ponadto wykazano, że ogólna konformacja makrocząsteczki flawoproteiny żółtkowej jest trwalsza niż flawoproteiny z białka (75).

Wiele dodatkowych, bardziej szczegółowych, ale czasem również kontrowersyjnych informacji o strukturze obszaru wiążącego ryboflawinę oraz konformacyjnych właściwościach samego białka, dostarczyły badania z zastosowaniem metod magnetycznego rezonansu jądrowego (92, 93), rezonansowej spektroskopii ramanowskiej (94—100), spektroskopii w podczerwieni (90) oraz chemicznej modyfikacji reszt aminokwasowych (53, 55, 75, 81, 101).

III-4. Właściwości biologiczne flawoproteiny żółtkowej oraz jej osoczowego prekursora — biosynteza, transport, katabolizm

Podobnie jak wszystkie białka żółtka (102), żółtkowe białko wiążące ryboflawinę jest syntezowane w wątrobie nosiciela i wydzielane do krwi, skąd następnie wbudowywane jest do żółtka (103—105). Krążąc we krwi, ulega ono wysyceniu ryboflawiną, przenikającą tu z pokarmu poprzez ścianę jelita (51). W ten sposób przebiega efektywny transport ryboflawiny do rozwijającego się oocytu. Analogiczną funkcję w stosunku do innych substancji odżywczych spełniają transferyna (106, 107), foswityna (108) oraz białka wiążące biotynę (109—111), tiaminę (112), cholekalcyferol (113), witaminę A, retinol (114) i witaminę B₁₂ (115).

Jeżeli funkcjonalne białko wiążące ryboflawinę nie może być syntezowane, witamina ta wydalana jest w dużych ilościach przez nerki (ryboflawinuria), natomiast brak jej w składanych jajach, wskutek czego embriony giną przed upływem trzynastego dnia rozwoju. Dziedziczną patologię wylęgu białych leghornów, charakteryzującą się takimi właśnie objawami i uwarunkowaną pojedynczym recesywnym genem *rd*, opisali w 1954 roku M a w i wsp. (116). W wyniku intensywnych badań nad fizjologią mutantowego szczepu (117—123) wykazano m.in., że normalny allel *Rd* odpowiedzialny jest za syntezę zarówno osoczowego jak i żółtkowego białka wiążącego ryboflawinę (41, 105).

Opracowano kilka metod oczyszczania białka wiążącego ryboflawinę z osocza (27, 36, 104, 124). Wydawało się ono identyczne z flawoproteiną z żółtka (125), m.in. pod względem masy cząsteczkowej (36, 38, 124), zawartości fosforu (46), właściwości immunologicznych (51). Ostatnio wykazano jednak (36), że skład części cukrowej białka osoczowego jest odmienny (Tab. 6).

Syntezę i wydzielanie białka wiążącego ryboflawinę zaprezentowano w skrawkach wątroby (124) oraz w kulturach hepatocytów (126). Wyizo-

Tabela 6

Składnik cukrowy osoczowego białka wiążącego ryboflawinę (wg 36).

| Węglowodan | Liczba reszt w cząsteczce flawoproteiny |
|-----------------------|---|
| Mannoza | 5.8 |
| Galaktoza | 6.8 |
| N-Acetyloglukozoamina | 15.6 |
| Kwas sjałowy | 5.4 |
| Fukoza | 1.1 |

lowane z wątroby metodą chromatografii powinowactwa (38) białko to miało tę samą masę cząsteczkową co flawoproteina osoczowa, lecz nieco niższy punkt izoelektryczny. Być może zatem białko syntezowane w wątrobie zawiera nieco większą liczbę reszt fosforanowych lub kwasu sjałowego, a te „nadmiarowe” grupy są usuwane w trakcie wydzielania białka do krwiobiegu (38). Prawdopodobnie gen *Rd* koduje strukturę pierwszorzędową samego białka wiążącego ryboflawinę (126), niewiele jednak wiadomo o przebiegu potranslacyjnej fazy biosyntezy. Białko nie wykazujące zdolności wiązania ryboflawiny, krzyżowo reagujące z antysurowicą przeciw flawoproteinie żółtkowej, wyizolowano z wątroby normalnych niosek (127—129). Była to glikoproteina o masie cząsteczkowej 31—32 000 i antygenowości identycznej z funkcjonalnym białkiem żółtkowym (129). Analogiczna glikoproteina z mutantów *rdrd* (130) wykazywała wielokrotnie niższą antygenowość, a nawet niższą masę cząsteczkową, 27 500 (129). Rzuca to światło na charakter omawianej mutacji, ale hipoteza, że krzyżowo reagujące białko jest rzeczywistym prekursorem funkcjonalnego białka wiążącego ryboflawinę (127—129), wymaga jeszcze potwierdzenia.

W krwi dorosłych kogutów oraz niedojrzałych kurcząt obu płci białko wiążące ryboflawinę normalnie nie występuje, jednak jego synteza może być indukowana przez podanie estrogenów (51, 124, 132, 133). Średnie stężenie tej flawoproteiny w osoczu niosek ocenia się na około 30 mg/100 ml (105, 123). Podając dożylnie radioizotopowo znakowane preparaty oczyszczonego białka wiążącego ryboflawinę, próbowano oszacować czas jego życia w krwiobiegu (36, 46, 134—136) oraz określić miejsca wykorzystania i degradacji (36, 136). Kinetyka zaniku radioaktywności z osocza okazała się złożona, nawet w przypadku kontrolnego białka — albuminy surowicy; wydaje się, że 27% osoczowej flawoproteiny jest usuwane z $t_{1/2} = 13$ min, a 83% z $t_{1/2} = 120$ min (36). W specyficznym wychwytywaniu i degradacji tego białka najważniejszą rolę spełnia wątroba, a także jajowód, nerki, jelito (36, 136).

Podobną metodą wykazano rzeczywisty transport białka wiążącego ryboflawinę z osocza do żółtka (134). Około 12% z wprowadzonej do krwioobiegu znakowanej flawoproteiny osoczowej odnaleziono w składanych jajach (36). Początkowo przypuszczano, że w mechanizmie transportu mogą być zaangażowane reszty jej kwasu sjałowego (135, 136), ostatnio przedstawiono jednak dane przemawiające za decydującą rolą reszt fosforanowych (46, 137). Reszty te, związane z resztami serynowymi i skoncentrowane na stosunkowo niewielkim obszarze na powierzchni białka, tworzą strefę anionową odpowiedzialną za transport przez błonę pęcherzyków jajnika (137). W procesie przeniesienia z osocza do żółtka następuje modyfikacja składnika oligosacharydowego (36).

Wykazano, że białko wiążące tiaminę, wyizolowane z białka jaja (138) oraz żółtka (112), tworzy specyficzny kompleks z flawoproteiną ryboflawinową. Ponieważ nie jest ono glikoproteiną, postulowano sprzężony transport obu białek do rozwijającego się jaja. Ta dodatkowa, niejako uboczna rola biologiczna białka wiążącego ryboflawinę, nie została jednak ostatnio potwierdzona (139) — stanowi to kolejny kontrargument na wcześniejsze hipotezy o roli składnika cukrowego w transporcie flawoproteiny.

Dalsze losy białka transportującego ryboflawinę, już w czasie rozwoju embrionalnego, badano tylko fragmentarycznie. We wczesnych stadiach rozwoju, gdy zapotrzebowanie embrionu na ryboflawinę jest niewielkie, następuje synteza netto niewielkich ilości białka wiążącego (140, 141). W późniejszej fazie szybkiego wzrostu embrionu (142), białko to ulega szybkiej degradacji (140). Prawdopodobnie degradacja ta przebiega dopiero w tkankach embrionu (141, 143).

III-5. Właściwości biologiczne flawoproteiny białka jaja

Wiadomo, że wszystkie białkowe składniki białka jaja, a więc również ryboflawinowa flawoproteina, syntezowane są przez jajowód, odcinek *magnum* (144). Flawoproteina krążąca z krwią nie jest transportowana do białka (134), jest jednak wychwytywana i degradowana w jajowodzie (36), prawdopodobnie niespecyficznie wraz z innymi białkami (amino-kwasy zużywane są do syntezy białek *de novo*; ryboflawina tworzy kompleks z nowo syntezowaną apoproteiną). Wskutek takiego mechanizmu syntezy flawoproteina białka jest wysycona ryboflawiną tylko częściowo, zwykle w około 35% (105, 145). Częściowe wysycenie substancjami odżywczymi specyficznych białek wiążących występujących w tej komponentce jaja okazało się niemal regułą (146, 147); prawdopodobnie zatem ich rola biologiczna polega na ochronie embrionu przed atakiem mikroorganizmów, które wymagają tych substancji odżywczych do wzrostu (148).

Ostatnio wykazano, że proces potranslacyjnej fosforylacji białka wiążącego ryboflawinę przebiega identycznie lub prawie identycznie w wątrobie i w jajowodzie (137).

IV. Osoczowe białka wiążące ryboflawinę występujące w stanie ciąży

Wiadomo, że błony łożyska nie są przepuszczalne ani dla wolnej ryboflawiny ani dla koenzymów flawinowych (149), jednak mechanizm przenoszenia tej witaminy do krążenia płodowego pozostaje słabo poznany. Stosunkowo niedawno wykazano, że w krwi ciężarnych szczurzy występują białka krzyżowo reagujące z przeciwciałami przeciw opisanej w rozdziale III ryboflawinowej flawoproteinie ptaków (150, 151). Co więcej, dożylnie podanie tych przeciwciał ciężarnym samicom powoduje całkowite poronienie (152, 153). W krytycznej fazie ciąży, charakteryzującej się szybkim wzrostem embrionu i organogenezą (154), stężenie omawianego specyficznego białka utrzymuje się na maksymalnym i mniej więcej stałym poziomie wynoszącym około $6 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ osocza (152). Istotnie jest to białko wiążące ryboflawinę — stosując technikę chromatografii na lumiflawnie sprzężonej z Sepharose oczyszczono je do homogenności oraz podano jego podstawową charakterystykę (155). Ma masę cząsteczkową 90 000, wiąże ryboflawinę w stosunku molowym 1:1, ze stałą dysocjacji kompleksu $0.42 \mu\text{M}$. W środowisku kwaśnym traci zdolność wiązania ryboflawiny, ale proces ten jest tylko częściowo odwracalny. W osoczu krwi szczurów — samów oraz zwierząt niedojrzałych białko to nie występuje (151), jednak jego synteza może być indukowana przez podanie estroge-
nu (156).

Podobne techniki chromatografii powinowactwa pozwoliły wykazać obecność białek ilnie wiążących ryboflawinę w krwi pobranej z ciężarnych krów (11), ciężarnych małp *Macaca radiata* (cytowane za 152), oraz ciężarnych kobiet (157) i płodu ludzkiego (12). Brakuje najprostszej nawet charakterystyki tych białek. W osoczu płodu ludzkiego ich stężenie jest stosunkowo wysokie i wynosi około $200 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ (12), co może stanowić klucz do zrozumienia znanego wcześniej faktu, że stężenie witaminy B₂ w krążeniu płowym jest kilkakrotnie wyższe niż w krążeniu matki (158—160).

V. Podsumowanie

Jak wynika z przedstawionego przeglądu, stan zaawansowania badań nad różnymi białkami wiążącymi ryboflawinę jest bardzo nierównomierny. Obszerniejsze piśmiennictwo poświęcone ryboflawinowym flawoproteinom z krwi i jaj ptaków obejmuje nie tylko biologiczne aspekty transportu ryboflawiny, ale również wiele szczegółów o fizykochemii oddziaływania ryboflawina — białko oraz o strukturze samego białka. Konieczne

jest natomiast rozpoczęcie intensywnych badań nad białkami transportującymi ryboflawinę, występującymi w osoczu ssaków, w szczególności tymi, które wydają się odgrywać ważną rolę w prawidłowym odżywianiu rozwijającego się płodu. Zapewne inne jeszcze białka, wykazujące specyficzne powinowactwo do witaminy B₂, a które mogłyby być zaangażowane w wielu procesach biologicznych, np. w transporcie przez błony, oczekują na wyodrębnienie i charakteryzację.

Zaakceptowano do druku 10.10.1984 r.

PIŚMIENNICTWO

1. McCormick D. B., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 950—962.
2. DeLuca C., Kaplan N. O., (1958), *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 6—11.
3. Merrill A. H. Jr., Shapira G., McCormick D. B., (1982), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Massey V., Williams C. H., str. 508—513, Elsevier North Holland.
4. Merrill A. H. Jr., McCormick D. B., (1980), w *Methods in Enzymology*, red. McCormick D. B., Wright L. D., t. 66, str. 338—344, Academic Press, New York.
5. Jusko W. J., Levy G., (1969), *J. Pharm. Sci.*, **58**, 58—62.
6. Cavalli—Sforza L. L., Daiger S. P., Rummel D. P., (1977), *Ann. J. Hum. Genet.*, **29**, 581—592.
7. Spector A. A., (1975), *J. Lipid. Res.*, **16**, 165—179.
8. Jones M. W., (1975), *Biological Interfaces*, str. 64—134, Elsevier, Amsterdam.
9. Schubert R., (1947), *Z. Vitamforsch.*, **19**, 119—179.
10. Frank O., Luisada—Opper A. V., Feingold S., Baker H., (1970), *Nutr. Rep. Int.*, **1**, 161—168.
11. Merrill A. H. Jr., Froehlich J. A., McCormick D. B., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9362—9364.
12. Merrill A. H. Jr., Froehlich J. A., McCormick D. B., (1981), *Biochem. Med.*, **25**, 198—206.
13. Farhangi M., Osserman E. F., (1976), *N. Engl. J. Med.*, **294**, 177—183.
14. Chang M. Y., Friedman F. K., Beychok S., Shyong J. S., Osserman E. F., (1981), *Biochemistry*, **20**, 2916—2921.
15. Chang M. Y., Friedman F. K., Beychok S., (1981), *Biochemistry*, **20**, 2922—2926.
16. Eisen M. N., Michaelides M. C., Undertown B. J., Schulenburg E. P., Simms E. S., (1970), *Fed. Proc.*, **29**, 78—84.
17. Rhodes M. B., Azari P. R., Feeney R. E., (1958), *J. Biol. Chem.*, **230**, 399—408.
18. Rhodes M. B., Bennett N., Feeney R. E., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 2054—2060.
19. Osuga D. T., Feeney R. E., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 560—574.
20. Muniyappa K., Adiga P. R., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **623**, 339—347.
21. Farrell H. M. Jr., Mallette M. F., Buss E. G., Claggett C. O., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **194**, 433—442.
22. Becvar J., (1973), Praca doktorska, University of Michigan.
23. Blankenhorn G., Osuga D. T., Lee H. S., Feeney R. E., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **386**, 470—478.
24. Nishina Y., (1977), *Osaka Daigaku Igaku Zasshi*, **29**, 261—269.
25. Hidaka Y., Matsuoka Y., (1977), *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **51**, 165—166.

26. Murthy U. S., Adiga P. R., (1977), *Indian J. Biochem. Biophys.*, **14**, 118—124.
27. Merrill A. H. Jr., McCormick D. B., (1978), *Anal. Biochem.*, **89**, 87—102.
28. Ostrowski W., Skarzyński B., Żak Z., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 515—517.
29. Żak Z., Ostrowski W., (1963), *Acta Biochim. Polon.*, **10**, 427—441.
30. Miller M. S., (1976), Praca doktorska, Pennsylvania State University.
31. Murthy U. S., Sreerkrishna K., Adiga P. R., (1979), *Anal. Biochem.*, **92**, 345—350.
32. Ostrowski W., Żak Z., Krawczyk A., (1968), *Acta Biochim. Polon.*, **15**, 241—260.
33. Phillips J. W., (1969), Praca doktorska, Pennsylvania State University.
34. Murthy U. S., Podder S. K., Adiga P. R., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **434**, 69—81.
35. Ostrowski W., Krawczyk A., (1963), *Acta Chem. Scand.*, **17**, suppl. 241—249.
36. Miller M. S., Bruch R. C., White H. B. III, (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **715**, 126—136.
37. Kumosinski T. F., Pessen H., Farrell H. M. Jr., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 714—725.
38. Froehlich J. A., Merrill A. H. Jr., Clagett C. O., McCormick D. B., (1979), *Comp. Biochem. Physiol.*, **66B**, 397—401.
39. Phillips J. W., Mallette M. F., Clagett C. O., (1969), *Fed. Proc.*, **28**, 880.
40. Cotner R. C., Clagett C. O., (1972), *Fed. Proc.*, **31**, 851.
41. Clagett C. O., (1971), *Fed. Proc.*, **30**, 127.
42. Kozik A., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **121**, 395—400.
43. Becvar J., Palmer G., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5607—5617.
44. Nishikimi M., Kyogoku Y., (1973), *J. Biochem.*, **73**, 1233—1242.
45. Bingham E. W., Farrell H. M. Jr., Dahl K. J., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 448—460.
46. Miller M. S., Benore—Parsons M., White H. B. III, (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6818—6824.
47. Tillotson J. A., Bashor M. M., (1980), *Anal. Biochem.*, **107**, 214—219.
48. Lotter S. E., Miller M. S., Bruch R. C., White H. B. III, (1982), *Anal. Biochem.*, **125**, 110—117.
49. Kozik A., Żak Z., (1982), *Anal. Biochem.*, **121**, 224—226.
50. Weber M., Żak Z., Ostrowski W., (1966), *Folia Biologica (Kraków)*, **14**, 357—367.
51. Farrell H. M., Buss E. G., Clagett C. O., (1970), *Int. J. Biochem.*, **1**, 168—172.
52. Żak Z., Weber M., Ostrowski W., (1968), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **50**, 795—808.
53. Cotner R. C., (1972), Praca doktorska, Pennsylvania State University.
54. Weber M., Żak Z., Steczko J., (1976), *Acta Biochim. Polon.*, **23**, 277—284.
55. Ramanathan L., Guyer R. B., Buss E. G., Clagett C. O., (1980), *Molec. Immunol.*, **17**, 267—274.
56. Ramanathan L., Guyer R. B., Karakawa W. W., Buss E. G., Clagett C. O., (1979), *Molec. Immunol.*, **16**, 935—941.
57. Żak Z., Steczko J., Ostrowski W., (1969), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **51**, 1065—1074.
58. Żak Z., Ostrowski W., Steczko J., Weber M., Gizler M., Morawiecki A., (1972), *Acta Biochim. Polon.*, **19**, 307—323.

59. Spencer R., Fisher J., Walsh C., (1977), *Biochemistry*, **16**, 3586—3594.
60. Massey V., Hemmerich P., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5612—5614.
61. Massey V., Stankovich M., Hemmerich P., (1978), *Biochemistry*, **17**, 1—8.
62. Massey V., Hemmerich P., (1978), *Biochemistry*, **17**, 9—16.
63. Nishina Y., Shiga K., Horiike K., Tojo H., Kasai S., Matsui K., Watari H., Yamano T., (1980), *J. Biochem.*, **88**, 411—416.
64. Klapper M. H., Faraggi M., (1983), *Biochemistry*, **22**, 4067—4071.
65. Choi J.-D., McCormick D. B., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **204**, 41—51.
66. Matsui K., Sugimoto K., Kasai S., (1982), *J. Biochem.*, **91**, 469—475.
67. Matsui K., Sugimoto K., Kasai S., (1982), *J. Biochem.*, **91**, 1357—1362.
68. Nishikimi M., Yagi K., (1969), *J. Biochem.*, **66**, 427—429.
69. Matsui K., Sugimoto K., Kasai S., (1982), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Massey V., Williams C. H., str. 504—507, Elsevier North Holland.
70. Massey V., Gishla S., Moore E. G., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9640—9650.
71. Walsh C., Fisher J., Spencer R., Graham D. W., Ashton W. T., Brown J. E., Brown R. D., Rogers F., (1978), *Biochemistry*, **17**, 1942—1951.
72. Nowak H. P., Langerman N., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 231—238.
73. Mifflin T. E., Langerman N., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **224**, 319—325.
74. Steczko J., Ostrowski W., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **393**, 253—266.
75. Blankenhorn G., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **82**, 155—160.
76. Fisher J., Ramakrishnan K., McLane K. E., (1982), *Biochemistry*, **21**, 6172—6180.
77. Lubas B., Soltysik M., Steczko W., Ostrowski W., (1977), *FEBS Letters*, **79**, 179—182.
78. Ostrowski W., Żak Z., (1977), w *Flavins and Flavoproteins. Physicochemical Properties and Function*, red. Ostrowski W., str. 135—149, PWN, Warszawa—Kraków.
79. Yagi K., Ohishi N., Takai A., Kawano K., Kyogoku Y., (1976), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Singer T. P., str. 775—781, Elsevier, Amsterdam—Oxford—New York.
80. Shopfer L. M., Massey V., Claiborne A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7329—7337.
81. Kozik A., (1981), Praca doktorska, Uniwersytet Jagielloński.
82. Li T. M., Hook J. W. III, Drickamer H. G., Weber G., (1976), *Biochemistry*, **15**, 3205—3211.
83. Watenpaugh K. D., Sieker L. C., Jensen L. H., (1976), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Singer T. P., str. 405—410, Elsevier, Amsterdam.
84. Inoue M., Shibata M., Kondo Y., Ishida T., (1981), *Biochemistry*, **20**, 2936—2945.
85. McCormick D. B., (1977), *Photochem. Photobiol.*, **26**, 161—182.
86. Kozik A., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 542—545.
87. Blankenhorn G., (1980), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Yagi K., Yamano T., str. 405—411, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, University Park Press, Baltimore.
88. Żak Z., (1973), *Folia Medica Cracoviensia*, **XV**, **2**, 175—186.
89. Nishina Y., Horiike K., Shiga K., Yamano T., (1977), *J. Biochem.*, **82**, 1715—1721.
90. Żak Z., Małkiewicz I., Pytasz G., (1977), w *Flavins and Flavoproteins*.

- Physicochemical Properties and Function, red. Ostrowski W., str. 39—50, PWN, Warszawa—Kraków.
91. Blicharska B., Sagnowski S., Steczko J., Ostrowski W., (1977), *Ibidem*, str. 51—61.
 92. Müller F., Van Schagen C. G., Van Berkel W. J. H., (1980), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Yagi K., Yamano T., str. 359—371, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, University Park Press, Baltimore.
 93. Miura R., Kasai S., Horiike K., Sugimoto K., Matsui K., Yamano T., Miyake Y., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 406—411.
 94. Dutta P. K., Nestor J., Spiro T. G., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 209—216.
 95. Dutta P. K., Spencer R., Walsh C., Spiro T. G., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **623**, 77—83.
 96. Nishina Y., Kitagawa T., Shiga K., Horiike K., Matsumura Y., Watari H., Yamano T., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 925—932.
 97. Kitagawa T., Nishina Y., Kyogoku Y., Yamano T., Ohishi N., Takai-Suzuki A., Yagi K., (1979), *Biochemistry*, **18**, 1804—1808.
 98. Nishina Y., Shiga K., Horiike K., Tojo H., Kasai S., Yanase K., Matsui K., Watari H., Yamano T., (1980), *J. Biochem.*, **88**, 403—409.
 99. Kitagawa T., Nishina Y., Shiga K., Matsumura Y., Yamano T., (1980), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Yagi K., Yamano T., str. 395—404, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, University Park Press, Baltimore.
 100. Schmidt J., Lee M.-Y., McFarland J. T., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **215**, 22—27.
 101. Cotner R. C., Clagett C. O., (1973), *Anal. Biochem.*, **54**, 170—177.
 102. Schjeide O. A., Wilkens M., McCandless R. G., Munn R., Peterson M., Carlsen E., (1963), *Am. Zoolog.*, **3**, 167—184.
 103. Blum J. C., Jacquot-Armand Y., (1965), *Ann. Nutr. Alim.*, **19C**, 599—610.
 104. Blum J. C., (1967), *Le Métabolisme de la Riboflavine Chez la Poule pondeuse*, F. Hoffmann-La Roche et Cie, Paris.
 105. Winter W. P., Buss E. G., Clagett C. O., Boucher R. V., (1967), *Comp. Biochem. Physiol.*, **22**, 897—906.
 106. Willims J., (1962), *Biochem. J.*, **83**, 355—364.
 107. Williams J., (1968), *Biochem. J.*, **108**, 57—67.
 108. Christmann J. L., Grayson M. J., Huang R. C. C., (1977), *Biochemistry*, **16**, 3250—3256.
 109. White H. B. III, Dennison B. A., Della-Fera M. A., Whitney C. J., McGuire J. C., Meslar H. W., Sammelwitz H., (1976), *Biochem. J.*, **157**, 395—400.
 110. Meslar H. M., Camper S. A., White H. B. III, (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6979—6982.
 111. Mandella R. D., Meslar H. M., White H. B. III, (1978), *Biochem. J.*, **175**, 629—633.
 112. Muniyappa K., Adiga P. R., (1981), *Biochem. J.*, **193**, 679—685.
 113. Fraser D. R., Emtage J. S., (1976), *Biochem. J.*, **160**, 671—682.
 114. Heller J., (1976), *Dev. Biol.*, **51**, 1—9.
 115. Kidroni G., Grossowicz N., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **188**, 113—123.
 116. Maw A. J. G., (1954), *Poultry Sci.*, **33**, 216—217.
 117. Buss E. G., Boucher R. V., Maw A. J. G., (1959), *Poultry Sci.*, **38**, 1190—1192.

118. Boucher R. V., Cowan J. W., Buss E. G., (1964), *Poultry Sci.*, **43**, 169—172.
119. Cowan J. W., Boucher R. V., Buss E. G., (1964), *Poultry Sci.*, **43**, 172—174.
120. Cowan J. W., Boucher R. V., Buss E. G., (1965), *Poultry Sci.*, **44**, 536—538.
121. Cowan J. W., Boucher R. V., Buss E. G., (1966), *Poultry Sci.*, **45**, 538—541.
122. Winter W. P., Buss E. G., Clagett C. O., Boucher R. V., (1967), *Comp. Biochem. Physiol.*, **22**, 889—897.
123. Farrell H. M. Jr., Buss E. G., Clagett C. O., (1970), *Int. J. Biochem.*, **1**, 157—167.
124. Murthy U. S., Adiga P. R., (1978), *Biochem. J.*, **170**, 331—335.
125. Blum J. C., Gaudin-Harding F., (1966), *C. Y. Acad. Sci. Paris*, **262D**, 1299—1301.
126. Niu M. C., Niu L. C., Shih Y., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 399.
127. Guyer R. B., Clagett C. O., (1975), *Fed. Proc.*, **34**, 666.
128. Ramanathan L., (1979), Praca doktorska, Pennsylvania State University.
129. Ramanathan L., Guyer R. B., Buss E. G., Clagett C. O., Listwak S., (1980), *Biochem. Genetics*, **18**, 1131—1148.
130. Hammer C. H., Buss E. G., Clagett C. O., (1976), *Genetics*, **82**, 467—473.
131. Clagett C. O., Buss E. G., Saylor E. M., Girsh S. J., (1970), *Poultry Sci.*, **49**, 1468—1472.
132. Murthy U. S., Adiga P. R., (1977), *Biochem. J.*, **166**, 647—650.
133. Murthy U. S., Adiga P. R., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **538**, 364—375.
134. Hammer C., McDonald K., Saylor E. M., Buss E. G., Clagett C. O., (1971), *Poultry Sci.*, **50**, 938—944.
135. Miller M. S., Buss E. G., Clagett C. O., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **677**, 225—233.
136. Miller M. S., Buss E. G., Clagett C. O., (1981), *Comp. Biochem. Physiol.*, **69B**, 681—686.
137. Miller M. S., Mas M. T., White H. B. III, (1984), *Biochemistry*, **23**, 569—576.
138. Muniyappa K., Adiga P. R., (1979), *Biochem. J.*, **177**, 887—894.
139. Miller M. S., Buss E. G., Clagett C. O., (1981), *Biochem. J.*, **198**, 225—226.
140. Hammer C. H., Buss E. G., Clagett C. O., (1973), *Poultry Sci.*, **52**, 520—530.
141. Słomczyńska M., Żak Z., (1984), *Bull. Sci. Acad. Polon.*, w druku.
142. Lerner I. M., (1939), *Science*, **89**, 16—17.
143. Tarhay S. L., Buss E. G., Clagett C. O., (1975), *Poultry Sci.*, **54**, 562—571.
144. Mandeles S., Ducay E. D., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 3196—3199.
145. Feeney R. E., Allison R. G., (1969), *Evolutionary Biochemistry of Proteins*, str. 66—67, Wiley-Interscience, New York.
146. Gilbert A. B., (1971), w *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*, red. Bell D. J., Freeman B. M., t. 3, str. 1291—1329, Academic Press, London.
147. Green N. M., (1975), *Adv. Prot. Chem.*, **29**, 85—133.
148. Board R. G., Fuller R., (1974), *Biol. Rev.*, **49**, 15—49.
149. Dancis J., (1962), *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **84**, 1749—1753.
150. Adiga P. R., (1977), *Abst. 43rd Ann. Meet. Ind. Acad. Sci. Calcutta*, str. 20—21.
151. Adiga P. R., Muniyappa K., (1978), *Abstr. J. Steroid Biochem.*, **9**, 829.

152. Muniyappa K., Adiga P. R., (1980), *FEBS Letters*, **110**, 209—212.
153. Murthy C. V. R., Adiga P. R., (1981), *FEBS Letters*, **135**, 281—285.
154. Takahashi Y. I., Smith J. E., Goodman D. S., (1977), *Am. J. Physiol.*, **233E**, 263—272.
155. Muniyappa K., Adiga P. R., (1980), *Biochem. J.*, **187**, 537—540.
156. Murthy C. V. R., Adiga P. R., (1982), *J. Biosciences*, **4**, 227—238.
157. Murthy C. V. R., Adiga P. R., (1982), *Biochem. Int.*, **5**, 289—292.
158. Baker M., Frank O., Thomson A. D., Langer A., Munves E. D., DeAngelis B., Kaminetsky H. A., (1975), *Am. J. Clin. Nutr.*, **28**, 59—65.
159. Clarke H. C., (1977), *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **47**, 361—363.
160. Dancis J., Schneider H., (1975), w *The Placenta and Its Maternal Supply Line*, red. Gruenwald P., str. 98—124, MTP, Lancaster.

JERZY RYŃCA *)

Udział witaminy K w modyfikacji białek

The role of vitamin K in protein modification

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Rola witaminy K w procesie krzepnięcia krwi
- III. Mechanizm karboksylacji kwasu glutaminowego
 - III-1. Formy aktywne witaminy K
 - III-2. Cykl witaminy K
 - III-3. Enzymy procesu karboksylacji
 - III-4. Rola kwasu γ -karboksyglutaminowego w krzepnięciu krwi
- IV. Udział witaminy K w procesie glikozylacji
- V. Białka zależne od witaminy K wykryte w ostatnich latach
 - V-1. Białko C
 - V-2. Białko S
 - V-3. Osteokalcyna
 - V-4. Inne białka

Contents

- I. Introduction
- II. The role of vitamin K in blood clotting
- III. Mechanism of glutamic acid carboxylation
 - III-1. Active forms of vitamin K
 - III-2. Vitamin K cycle
 - III-3. The enzymes of carboxylation process
 - III-4. The role of γ -carboxyglutamic acid in blood clotting
- IV. The role of vitamin K in glycosylation process
- V. Vitamin K-dependent proteins recently discovered
 - V-1. Protein C
 - V-2. Protein S
 - V-3. Osteocalcin
 - V-4. Other proteins

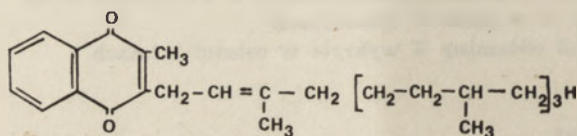
*) Dr., Katedra Biochemii Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR. 02-766 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166.

Wykaz stosowanych skrótów: AMP-P/NH/-P — adenozyne 5'-[β , γ -imido] pirofosforan; FDTA — sól sodowa kwasu etylenodiaminocztveroctowego; DTT — ditiotreitól; Gla — kwas γ -karboksyglutaminowy; UDP — N-acetylogalaktozoamina — urydynodifosfo-N-acetylogalaktozoamina.

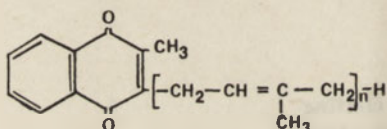
I. Wstęp

Witamina K występuje w przyrodzie w dwóch odmianach 2-metylo-naftochinonu różniących się charakterem łańcucha bocznego przy węglu trzecim. Pierwsza z tych odmian, filochinon, oznaczona jako K_1 występuje w zielonych częściach roślin, głównie w lucernie i posiada łańcuch fitylowy, jest więc 2-metylo,3-fitylo-1,4-naftochinonem. Druga natomiast forma to menachinon czyli witamina K_2 . Jest ona syntetyzowana przez florę bakteryjną przewodu pokarmowego zwierząt, powstaje również podczas rozkładu gnilnego ryb. Witamina ta charakteryzuje się obecnością wielonienasyconego łańcucha bocznego powstającego przez połączenie od 2 do 13 cząsteczek izoprenu. Najczęściej spotykana odmiana, oznaczana jako $K_{2(20)}$ lub menachinon-4, jest 2-metylo-1,4-naftochinonem o łańcuchu bocznym 20-to węglowym, a więc powstałym przez polimeryzację 4 jednostek izoprenu. Rzadziej występuje farnochinon, czyli witamina $K_{2(30)}$ o łańcuchu 30-to węglowym, utworzonym z 6 cząsteczek izoprenu.

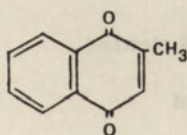
Poza naturalnymi witaminami K znamy obecnie wiele związków otrzymywanych syntetycznie o działaniu przeciwkrwotocznym i zbliżo-



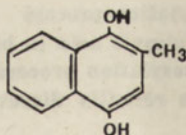
Witamina K_1 - filochinon



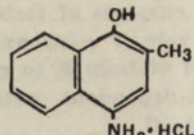
Witamina K_2 - menachinon



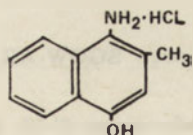
Witamina K_3



Witamina K_4



Witamina K_5



Witamina K_7

Ryc. 1. Wzory naturalnych i najważniejszych syntetycznych witamin K.

nych budową chemiczną do naturalnych witamin i objętych z tego powodu wspólną nazwą witamin K. Wśród tych związków najczęściej spotykany jest menadion czyli 2-metylo-1,4-naftochinon, różniący się od poprzednio opisanych jedynie brakiem łańcucha bocznego w pozycji 3. Związek ten określany jest jako witamina K₃.

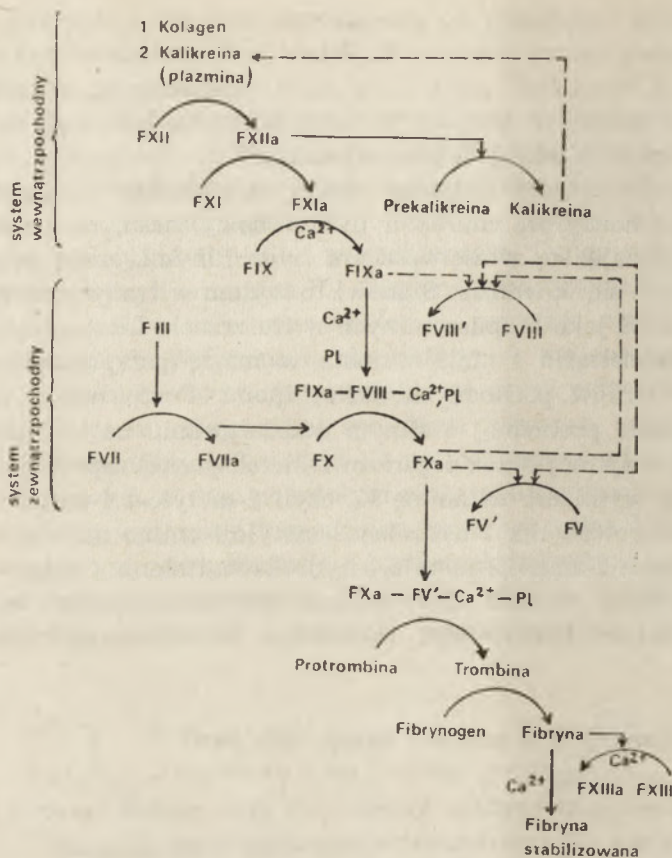
W przeciwieństwie do wyżej opisanych związków mających budowę apolarną, co nadaje im charakter hydrofobowy, następne formy tej witaminy odznaczają się właściwościami hydrofilnymi, mają więc zdolność rozpuszczania się w wodzie. Stanowi to wyłom w tradycyjnym traktowaniu witamin K jako rozpuszczalnych w tłuszczach. Liczba tych substancji sięga kilkudziesięciu i stale wzrasta w miarę przeprowadzania syntez nowych związków pochodnych naftochinonu. Poszukiwania te mają na celu uzyskanie pochodnej o silnym oddziaływaniu na krzepliwość krwi, łatwo przyswajalnej przez organizm i nietoksycznej. Spośród tych związków należy wymienić witaminę K₄ czyli 2-metylo-1,4-naftohydrochinon, K₅ czyli chlorowodorek 1-hydroksy,2-metylo,4-amino naftalenu i K₇ czyli chlorowodorek 1-amino,2-metylo,4-hydroksynaftalenu. Oprócz tych związków otrzymano również wiele pochodnych zawierających w cząsteczce reszty kwasu ortofosforowego, siarkowego, bursztynowego czy glukozy.

II. Rola witaminy K w procesie krzepnięcia krwi

Ogólny schemat procesu krzepnięcia krwi można zgodnie z Davie i Fujikawą (1) przedstawić następująco (Ryc. 2):

Badania ostatnich lat wykazały, że rola witaminy K sprowadza się do przeprowadzenia w formę aktywną czterech czynników krzepnięcia krwi: a) czynnika II czyli protrombiny, b) czynnika VII czyli prekonwertyny, c) czynnika IX czyli czynnika Chrismasa i X czyli czynnika Stuarta-Prowera. Czynniki II, IX i X zostały wyizolowane z osocza, oczyszczone i scharakteryzowane pod względem budowy chemicznej, natomiast czynnik VII jedynie wyosobniony, natomiast jego budowy nie udało się ustalić ze względu na zbyt małe jego stężenie we krwi.

Zgodnie z wynikami badań prowadzonych w różnych laboratoriach (2, 3, 4, 5, 6) obecnie powszechnie przyjmuje się, że rola tej witaminy sprowadza się do postrybosomalnej modyfikacji polipeptydowego łańcucha wyżej wymienionych czynników krzepnięcia krwi, to jest II, VII, IX i X, dzięki czemu uzyskują one zdolność wiązania wapnia, a przez to również aktywnego uczestnictwa w przemianie fibrynogenu do fibryny. Pozostaje jeszcze sprawą otwartą, czy witamina ta oddziałuje jedynie na konwersję prekursora białkowego do formy aktywnej czynnika krzepnięcia, czy też jest ona niezbędna do regulacji syntezy tych białek *de novo*. Dane dotychczasowe raczej przeczą roli tej witaminy jako czynnika uczestniczącego w translacji prekursora białkowego, przypisuje się jej jednak rolę w pro-



Ryc. 2. Schemat procesu krzepnięcia krwi.

cesie posttranslacyjnym. Zgodnie z dotychczasową wiedzą, rola witaminy K sprowadza się do modyfikacji postrybosomalnej łańcucha polipeptydowego, dzięki czemu zyskuje on zdolność wiązania wapnia. Po podaniu szczyrom kumaryny, udało się Suttie mu (7) wyizolować peptyd nazwany przez niego protrombiną nienormalną, będącą prekursorem protrombiny (stąd dzisiejsza nazwa: preprotrombina) i charakteryzujący się brakiem aktywności biologicznej, czyli zdolności wiązania wapnia, co z kolei jest niezbędne do zainicjowania krzepnięcia krwi. Peptyd ów charakteryzuje się jednocześnie nie zmienionymi właściwościami immunologicznymi w stosunku do aktywnej protrombiny. Ta nienormalna protrombina powstaje w organizmie zwierzęcym w wyniku podawania inhibitorów witaminy K, między innymi dikumarolu. Zaobserwowano jednak, że po podaniu witaminy K następowała in vivo przemiana preprotrombiny do postaci aktywnej. Jedną z oznak tej przemiany była zdolność protrombiny do adsorbowania się na siarczanie baru. Cechy tej natomiast nie miała nieaktywna biologicznie preprotrombina.

Wkrótce podobne zjawisko aktywacji prekursorów czynników krzep-

nięcia krwi zachodzące w obecności witaminy K zaobserwowano w przypadku czynników VII, IX i X. Kulminacyjnym punktem badań nad biochemiczną rolą tej witaminy było wykrycie przez Stenfla (8), że zdolność wiązania wapnia przez protrombinę jest uzależniona od obecności nowego, do tej pory nie znanego aminokwasu — kwasu γ -karboksylutaminowego. Stwierdzono przy tym, że rola witaminy K polega na indukowaniu karboksylacji kwasu glutaminowego w preprotrombinie. Oznacza to, że aktywacja biologiczna zachodząca w obecności witaminy K polega na wytworzeniu nowego aminokwasu z kwasu glutaminowego, bogatszego o grupę karboksylową, dzięki czemu aktywna protrombina może wiązać wapń. Odkrycia tego dokonano przez porównanie heptapeptydów otrzymanych podczas hydrolizy aktywnej i nieaktywnej protrombiny, prowadzonej od końca z wolną grupą aminową, przy użyciu pepsyny, BrCN i egzopeptydaz. Otrzymane w ten sposób heptapeptydy różniły się masami cząsteczkowymi i ruchliwościami elektroforetycznymi, przy czym peptyd otrzymany z aktywnej protrombiny posiadał większą masę i większą ruchliwość elektroforetyczną. Dalsza hydroliza prowadzona przy pomocy aminopeptydazy i karboksypeptydazy pozwoliła otrzymać tetrapeptyd: Leu-Glu-Glu-Val, badania którego prowadzone za pomocą rezonansu jądrowego i spektroskopii masowej potwierdziły przypuszczenie, że w natywnym tetrapeptydzie dodatkowe grupy karboksylowe są umieszczone przy węglu γ -glutamylu, a więc strukturę tego tetrapeptydu można przedstawić następująco: Leu-Gla-Gla-Val, gdzie Gla oznacza rodnik nowego aminokwasu — kwasu γ -karboksylutaminowego. Jest to kwas 3-amino-1,1,3-propano trikarboksylowy. Ogrzewanie natywnego peptydu w temperaturze 150°C w formie kwaśnej doprowadziło do jego karboksylacji, w wyniku której otrzymano tetrapeptyd identyczny z zsyntetyzowanym z czterech aminokwasów Leu-Glu-Glu-Val. Dalsze badania mające na celu potwierdzenie struktury tego aminokwasu (9) polegające na redukcji przy pomocy diboranu doprowadziło do otrzymania 5,5'-dihydroksyleucyny o masie cząsteczkowej 171 — aminokwasu faktycznie wywodzącego się z kwasu γ -karboksylutaminowego, którego masa sięga 229. Redukcja diboranem protrombiny i czynnika X pochodzących z krwi bydłowej, ujawniła obecność 5,5'-dihydroksyleucyny w obu badanych białkach. Ich identyfikacja świadczy o obecności kwasu γ -karboksylutaminowego w obu czynnikach krzepnięcia krwi zależnych od witaminy K, a także, że karboksylacja kwasu glutaminowego jest reakcją zależną od tej witaminy (10).

Jak podano poprzednio, od witaminy K zależą 4 białka biorące udział w krzepnięciu krwi. Przypuszcza się, że trzy z nich, to jest: protrombina, czynnik Christmasy i czynnik Stuarta-Prowera pochodzą z jednego genu. Są one wszystkie glikoproteidami, do swojej aktywacji potrzebują jonu wapniowego i fosfolipidów, a ponadto mają podobne sekwencje aminokwa-

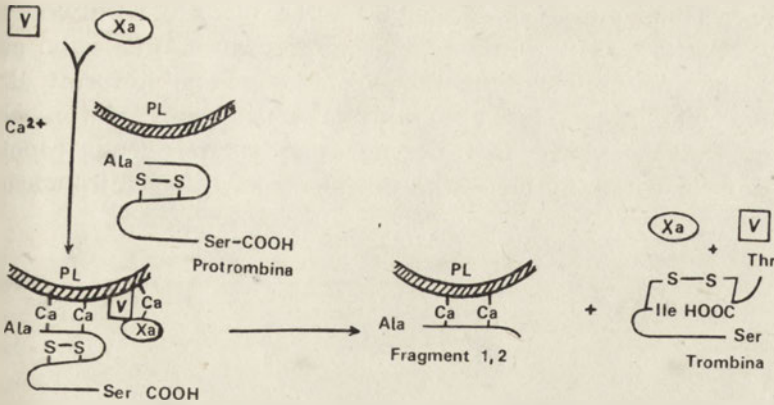
sowe. Różnica pomiędzy nimi polega na różnych masach cząsteczkowych, różnej zawartości cukrowców i odmiennej immunoaktywności (11).

Warto podkreślić, że wszystkie białkowe czynniki krzepnięcia krwi z wyjątkiem XIII, czyli czynnika stabilizującego fibrynę, są zymogenami. W trakcie aktywacji ulegają one przemianom do form czynnych enzymatycznie. Przemiany te sprowadzają się do proteolitycznego odszczepienia od nich pewnych fragmentów polipeptydowych, dzięki czemu stają się one proteazami serynowymi. Proteazy z kolei hydrolizują wiązania arginylowe i lizylowe kolejnych czynników kaskady układu krzepnięcia krwi prowadzącej w ostatecznym efekcie do przemiany fibrynogenu w fibrynę.

Spśród białek krzepnięcia krwi najdokładniej została przebadana protrombina składająca się u człowieka z 579 reszt aminokwasowych i 582 u bydła. Wśród tych aminokwasów w pozycjach 7, 8, 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30 i 33 znajduje się 10 reszt kwasu γ -karboksylglutaminowego (10). Również 10 reszt tego kwasu zawierają pozostałe białka krzepnięcia krwi zależne od witaminy K. Podobnie jak w przypadku protrombiny, są one zlokalizowane w końcu z wolną grupą aminową i na ogół występują parami. Jest przy tym rzeczą charakterystyczną, że sekwencje aminokwasowe wielu fragmentów tej części peptydu w wielu przypadkach są identyczne lub prawie identyczne.

Nie jest jeszcze całkowicie wyjaśnione w jaki sposób następuje wiązanie wapnia przez ten aminokwas. Zgodnie z sugestią Howarda (11), nie jest to chelatowanie jak w przypadku EDTA, ale raczej tworzenie specyficznej „klatki”, do której wnikają jony Ca^{2+} . Wykazano przy tym, że wiązanie wapnia przez protrombinę nie jest hamowane przez EDTA, co świadczy o innym charakterze tego połączenia, a przy tym i mocniejszym wiązaniu aniżeli chelatowe. Wiadomo również, że w łączeniu się z jonem wapniowym i powierzchnią fosfolipidową odgrywają rolę struktury drugo- i trzeciorzędowa czynników krzepnięcia. Wysunięto również sugestię, że połączenie białko-fosfolipid może odbywać się na jeszcze innej, nie wyjaśnionej drodze. Niezależnie jednak od charakteru tego wiązania, połączenie białkowego czynnika krzepnięcia przez jon wapniowy z fosfolipidową błoną jest niezbędne do aktywacji tego czynnika. Schematycznie proces ten można przedstawić następująco (Ryc. 3):

Jak wynika z ryciny, wiązanie wapnia przez poszczególne czynniki krzepnięcia krwi ułatwia ich łączenie się z powierzchnią fosfolipidową płytek krwi, na której zachodzi aktywacja protrombiny i przemiana do trombiny odłączającej się od powierzchni fosfolipidowej. Jak wynika z tego co podano wyżej, dodatkowa karboksylacja dziesięciu reszt kwasu glutaminowego w protrombinie służy wytworzeniu połączenia przez wapń z powierzchnią fosfolipidową, na której zachodzi przemiana jej do trombiny przy udziale czynnika Xa. Wykazano, że przemiana protrombiny do trombiny pod wpływem samego czynnika Xa zachodzi z szybkością nie



Ryc. 3. Udział czynników V, Xa, fosfolipidów (PL) i jonów wapniowych w powstawaniu trombiny.

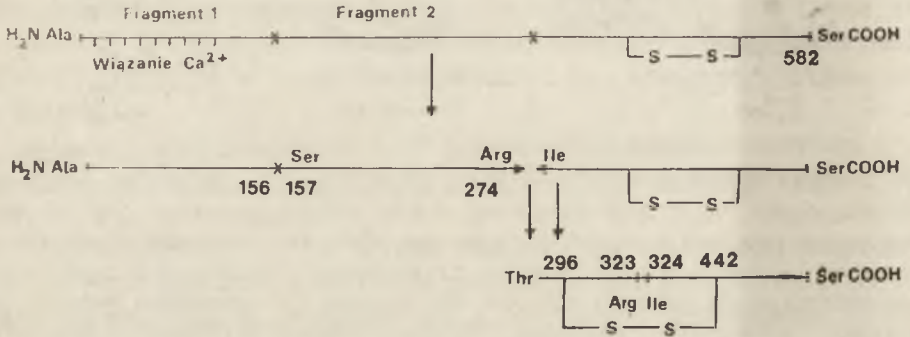
Protrombina i czynnik Xa wiążą się przez jony Ca^{2+} z powierzchnią fosfolipidową, w obecności czynnika V jako kofaktora utrzymującego protrombinę w konfiguracji najdogodniejszej do działania czynnika Xa. Czynniki Xa odszczepia fragment 1,2 związany z fosfolipidem i następnie hydrolizuje wiązanie peptydowe w produkcie pośrednim, określanym jako pretrombina 2. W wyniku tej przemiany powstaje trombina składająca się z dwóch łańcuchów polipeptydowych połączonych mostkiem siarczkowym.

wystarczającą do zapewnienia prawidłowej krzepliwości krwi. Fizjologiczna szybkość jest osiągnięta dopiero w obecności jonów wapniowych i fosfolipidów. Zamiast tych ostatnich w układzie *in vitro* stosowana była kefalina pochodząca z mózgu krowy. Jej dodatek wraz z czynnikiem Xa i jonami Ca^{2+} przyspieszał przemianę protrombiny do trombiny około 50 razy. Wiązanie z fosfolipidem zachodzi przy udziale końca łańcucha polipeptydowego z wolną grupą aminową, natomiast wiązanie z czynnikiem V prawdopodobnie odbywa się w innym obszarze cząsteczki białkowej protrombiny.

Funkcjonalne uszkodzenie protrombiny przez antywitamina K uniemożliwiające przyłączenie dodatkowych grup karboksylowych do reszt kwasu glutaminowego prowadzi w konsekwencji do utraty zdolności wiązania się z fosfolipidem w obecności jonu wapniowego. Natomiast proces aktywacji protrombiny przez czynnik Xa i przyspieszony przez V nie zależy od obecności zmodyfikowanych cząsteczek tego aminokwasu. Proces aktywacji protrombiny można więc za Mannem (14) przedstawić następująco (Ryc. 4):

Jeżeli witaminie K przypisuje się udział w tworzeniu polipeptydowego łańcucha protrombinowego, to powstaje pytanie czy również może ona oddziaływać na powstanie cząsteczki mRNA, od której synteza preprotrombiny jest zależna. Przeprowadzone do tej pory doświadczenia wykluczają jednak sugestię aby witamina K oddziaływała na kontrolę syntezy preprotrombiny na poziomie transkrypcji DNA albo sekrecji komórkowej.

Odnosnie mechanizmu jej działania, Suttie i wsp. (7) utworzyli dwie hipotezy: 1. witamina reguluje poziom syntetyzowanej *de novo* protrombiny, 2. witamina wpływa na metaboliczną konwersję do formy aktywnej prekursora białkowego, który może być wytwarzany pod nieobecność witaminy. Dotychczasowe dane potwierdzają jedynie drugą hipotezę, to znaczy, że rola witaminy polega na udziale w karboksylacji kwasu gluta-



Ryc. 4. Kolejne etapy przemiany protrombiny do trombiny.

Przy udziale czynnika Xa od protrombiny odłącza się fragment 1,2 zawierający 10 reszt kwasu γ -karboksylglutaminowego. W drugim etapie, w odłączonej od fosfolipidu pretrombinie czynnik Xa hydrolizuje wiązanie między Arg₃₂₃ i Ile₃₂₄.

minowego. Brak natomiast jakichkolwiek wyników doświadczalnych potwierdzających oddziaływanie tej witaminy na przebieg biosyntezy preprotrombiny. Czy więc rola witaminy K sprowadza się jedynie do udziału w utworzeniu dodatkowej grupy karboksylowej w kwasie glutaminowym? Pewne dane doświadczalne wskazują na jej udział w kolejnym etapie syntezy protrombiny, to jest jej glikozylacji. Będzie o tym mowa w dalszej części artykułu.

III. Mechanizm karboksylacji kwasu glutaminowego

III-1. Formy aktywne witaminy K

Badania prowadzone ze znakowanym węglanem $H^{14}CO_3^-$ wykazały, że w obecności witaminy K następuje w mikrosomach włączanie radioaktywnego węgla do preprotrombiny (15). Węgiel ten był następnie odnajdywany w nowoutworzonej grupie karboksylowej kwasu γ -karboksylglutaminowego (16, 17).

System karboksylacji umiejscowiony w mikrosomach komórek wątrobowych wymaga oprócz witaminy K zredukowanej formy NADP lub NAD, tlenu cząsteczkowego, CO_2 w postaci wodorowęglanu oraz ditioneitolu (DTT), nie wymaga natomiast karboksybiotyny — aktywnej po-

staci dwutlenku węgla, niezbędnej do pozostałych procesów karboksylacyjnych zachodzących w organizmie ludzkim. W przypadku awitaminozy K, gdy dochodzi do zahamowania reakcji karboksylacji, następuje gromadzenie preprotrombiny w mikrosomach (18).

W procesie syntezy kwasu γ -karboksylglutaminowego uczestniczą prawdopodobnie dwie formy czynne witaminy K: hydrochinon i epoksyd (19).

Hydrochinon powstaje z postaci chinonowej tej witaminy w wyniku oddziaływania NADPH lub NADH, DTT i tlenu cząsteczkowego (20, 21). Wykazano, że czynniki te nie są konieczne do karboksylacji gdy do komórki wprowadzi się hydrochinon witaminy K. Potwierdzeniem tezy, że w powstawaniu czynnej formy witaminy K czyli hydrochinonu biorą udział zredukowane nukleotydy adeninowe, DTT i tlen, było wykazanie, że użycie gotowej formy chinonowej znacznie przyspieszało przebieg procesu syntezy nowej grupy karboksylowej na skutek wyeliminowania reakcji redukcji witaminy przez NADPH lub NADH (22). Wykazano również, że wydajność procesu karboksylacji była dwukrotnie większa po zastosowaniu hydrochinonu aniżeli chinonu witaminy K oraz NADPH i DTT (23). Potwierdzono przy tym, że zarówno NADH jak i DTT nie mają wpływu na przebieg karboksylacji gdy podaje się formę hydrochinonową tej witaminy. Hamowanie procesu karboksylacji obserwuje się przy braku tlenu pod warunkiem podawania witaminy K w postaci chinonowej, natomiast jego brak nie odgrywał roli, gdy witamina występowała jako hydrochinon. Rezultaty te wykazują jednoznacznie, że zarówno zredukowany koenzym nukleotydowy jak i tlen cząsteczkowy są niezbędne do wytworzenia aktywnej formy witaminy K — hydrochinonu. Proces ten zachodzi przy udziale reduktazy filochinonowej (EC 1.6.99.2.), enzymu zredukowanego przez NADH lub NADPH i przenoszącego następnie wodory na chinon witaminy K (24, 25).

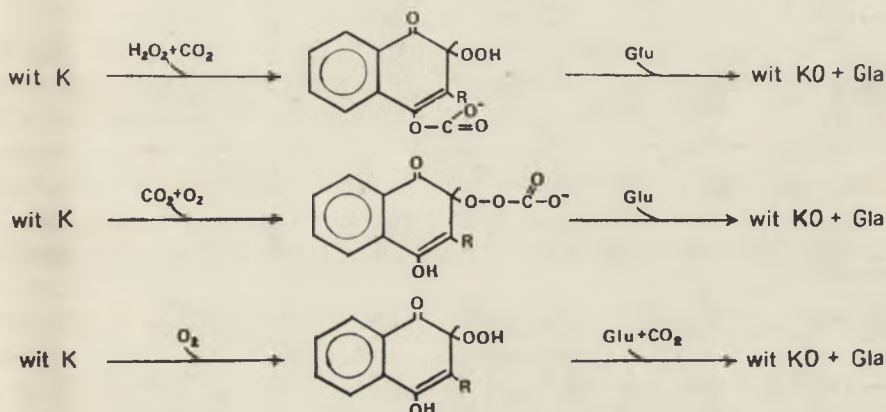
Przemiana witaminy K₁ do formy aktywnej, jak i cały proces karboksylacji kwasu glutaminowego, wymaga do swego przebiegu nakładu energii. Wykazano jednak brak oddziaływania ATP-azy i układu fosforylacji oksydacyjnej na przebieg tego procesu; dodatek ATP lub fosfokreatyny powodował spadek produkcji protrombiny. Wskazuje to na brak wpływu egzogennych związków wysokoenergetycznych na ten proces, który prawdopodobnie zależy od endogennego ATP. Silnym inhibitorem karboksylacji okazał się AMP-P(NH)-P. Dodatek ATP znosił jego hamujące działanie (17).

Drugą czynną formą witaminy K poza hydrochinonem jest epoksyd filochinonu. Strukturę tego związku ustalił Fischer w 1940 r. Badania prowadzone później za pomocą spektroskopu masowego potwierdziły jego strukturę jako metabolitu witaminy K, biorącego udział w syntezie protrombiny (26). Reakcji epoksydacji filochinonu w homogenacie wątrobowym w przeciwieństwie do redukcji do hydrochinonu, nie stymulują kofaktory oksydacji jak NADP, NAD, DTT, Fe²⁺, kwas askorbinowy czy

hematyna. Również słabo hamowały syntezę epoksydu CO, KCN i EDTA. Inhibitorem okazał się kwas taurocholowy w obecności CO. Jego działanie spowodowało obniżenie natężenia procesu o 50—75%. Niezbędnym warunkiem do powstania epoksydu była obecność frakcji mikrosomalnej i cytosolowej oraz tlenu (27, 28). W atmosferze azotu wydajność utleniania spada o 75%, natomiast całkowite zahamowanie procesu obserwowano po gotowaniu przez 5 minut. Aktywność epoksydazy filochinonu uzależniona jest od poziomu witaminy: obniżenie jej stężenia zwiększało aktywność enzymu przez co kompensacyjnie wzrastał poziom epoksydu.

Otrzymane dane świadczą o występowaniu dwóch form czynnych witaminy K — hydrochinonu powstałego przez redukcję postaci chinonowej tej witaminy, i 2,3-epoksydu wytwarzanego prawdopodobnie w dalszym etapie przemiany tej witaminy. Prawdopodobnie filochinon zredukowany do hydrochinonu reaguje z tlenem cząsteczkowym tworząc nadtlenek, ten zaś reagując z CO₂ wytwarza aktywny produkt pośredni o charakterze węglanowym, zdolny do wchodzenia w reakcję karboksylacji (29). Proces syntezy aktywnego dwutlenku węgla przy udziale hydrochinonu witaminy K₁ wiąże się z powstaniem nadtlenu tej witaminy, co potwierdzone zostało obserwacją, że dysmutaza ponadtlenkowa znacznie hamuje wbudowanie ¹⁴CO₂ do kwasu glutaminowego. Wykazano jednocześnie, że mikrosomy wątrobowe są zdolne do wytwarzania nadtlenu w procesie uzależnionym od obecności NADPH i stymulowanym jednocześnie przez witaminę K (30). Wiele danych przemawia za ścisłym powiązaniem pomiędzy poziomem syntetyzowanego epoksydu witaminy, a ilością wytwarzanego jednocześnie jonu O₂⁻, co nasuwa przypuszczenie, że anion ten jest albo produktem ubocznym procesu powstawania tego związku, albo też wchodzi w skład produktu pośredniego, z którego w dalszym etapie powstaje epoksyd. To drugie przypuszczenie wydaje się o tyle prawdopodobne, że dysmutaza ponadtlenkowa rozkładająca jon O₂⁻ jednocześnie hamuje tworzenie epoksydu. Podobnie działa inny enzym z klasy oksydoreduktaz — peroksydaza glutationowa, która hamuje nie tylko reakcję epoksydacji, ale i przemiany filochinonu w hydrochinon, co świadczy o prawdopodobnym udziale nadtlenu wodoru w syntezie obu form czynnych witaminy K, a także, że formą pośrednią jest związek o charakterze nadtlenkowym (28, 31). Natomiast przeciw udziałowi nadtlenu w procesie karboksylacji świadczy brak wpływu katalazy na syntezę epoksydu. Nie udało się przy tym do tej pory wykazać obecności H₂O₂ w układzie karboksylacyjnym. Nasuwa się więc wniosek, że wprawdzie jednym z metabolitów jest nadtlenek, ale ma on raczej charakter organiczny i jest bardziej trwały od H₂O₂. Przemawiają za tym wyniki doświadczenia polegającego na zastosowaniu w układzie karboksylacyjnym t-butylo-OOH. Nadtlenek ten wprowadzony z zewnątrz spowodował wzrost o 62% aktywności tego procesu (32).

Według Suttie'go i wsp. (33) istnieją trzy możliwości przebiegu tego procesu. Schemat przedstawia rycina 5. Pierwsza możliwość pomija tworzenie hydrochinonu, natomiast zakłada udział nadtlenku wodoru w utlenianiu witaminy K w obecności CO_2 do nadtlenku karboksyfilochinonu. Związek ten z kolei przenosząc aktywny CO_2 na kwas glutaminowy, przemienia się w 2,3-epoksyd. Schemat ten wydaje się raczej mało prawdopodobny ze względu na brak w nim hydrochinonu, którego obecność została stwierdzona ponad wszelką wątpliwość. Dwa pozostałe ciągi reakcji są do siebie bardzo podobne i różnią się jedynie charakterem nadtlenku i czasem przyłączenia CO_2 : w jednym przypadku reaguje on z hydrochinonem tworząc nadtlenek, w drugim natomiast wchodzi do reakcji już po utworzeniu nadtlenku. Zgodnie z sugestią autorów tego modelu działania witaminy w procesie karboksylacji, najbardziej prawdopodobna jest trzecia możliwość.

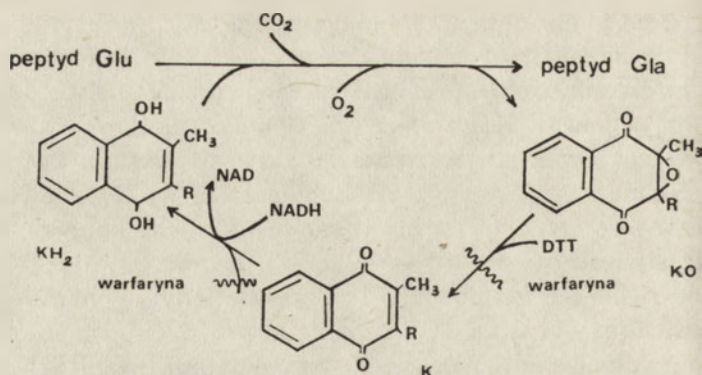


Ryc. 5. Udział witaminy K w syntezie kwasu γ -karboksyglutaminowego (Gla).

Objaśnienia: Glu — kwas glutaminowy, Gla — kwas γ -karboksyglutaminowy, wit KO — epoksyd witaminy K.

III-2. Cykl witaminy K

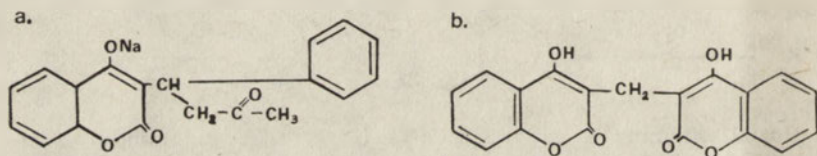
Jakie jest więc powiązanie obu aktywnych form witaminy K z procesem karboksylacji reszt kwasu glutaminowego w czynnikach krzepnięcia krwi? Według Gallopa i wsp. (34) jest to proces cykliczny, nazwany przez nich cyklem witaminy K (Ryc. 6). W I etapie witamina K jest redukowana do hydrochinonu (KH_2), a w II etapie utlenia się do epoksydu, co wiąże się z karboksylacją reszty kwasu glutaminowego. Rolę utleniacza w tym procesie odgrywa prawdopodobnie rodnik KH' lub $\text{K}-\text{OOH}$. W III etapie zachodzi enzymatyczna redukcja epoksydu (KO) do witaminy K. Nie zostało do końca rozstrzygnięte sprawa mechanizmu dwukrotnej redukcji epoksydu. W pierwszym przypadku *in vitro* odbywa



Ryc. 6. Cykl witaminy K.

Objaśnienia: DTT — ditiotreitol, KH_2 — hydrochinon witaminy K, Peptyd Glu — peptyd z resztami kwasu glutaminowego, Peptyd Gla — peptyd z resztami kwasu γ -karboksylglutaminowego.

się to przy udziale grupy tiolowej zawartej w ditiotreitolu (DTT). Nie jest jednak znane naturalne źródło tej grupy. Pewne dane wskazują na możliwość udziału w tym procesie kwasu tiooktanowego (liponowego), ale ostatecznych dowodów brak. Więcej wiadomo natomiast o drugim procesie redukcji, w wyniku którego powstaje hydrochinon. Reakcja ta zachodzi *in vivo* przy udziale reduktazy, której koenzymem jest NAD lub NADP. Obie reakcje hamowane są przez warfarynę (Ryc. 7a), która prawdopo-

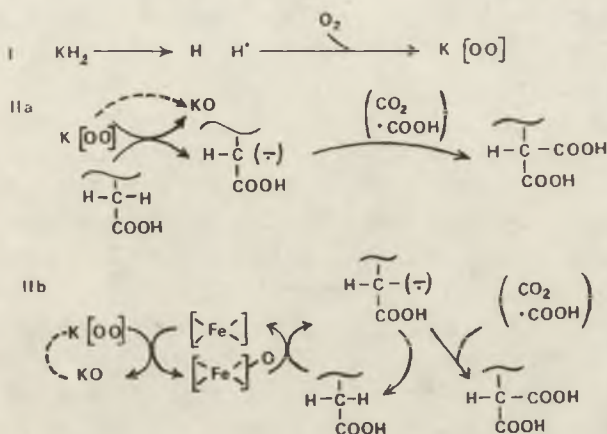


Ryc. 7. Wzory antywitamin K a) warfaryna, b) dikumarol.

dobnie współzawodniczy z witaminą K o grupy tiolowe (35, 36). Stwierdzono ponadto, że pochodne dikumarolu (Ryc. 7b) hamują redukcję KO do K powodując przez to wzrost stężenia epoksydu. Mechanizm tego procesu polega na kompetycyjnym hamowaniu reduktazy epoksydowej (37).

Poczynione w ostatnich czasach badania nad molekularnym mechanizmem procesu karboksylacji kwasu glutaminowego (38), zdają się świadczyć, że odpowiedzialny za ten proces nadtlenek witaminy K powstaje w wyniku wytworzenia z semichinonu, który atakując tlen cząsteczkowy tworzy nadtlenek (Ryc. 8 reakcja I). Z kolei nadtlenek redukując się do epoksydu atakuje atom węgla γ reszty glutaminianu, w wyniku czego powstaje karboksyanion reagujący następnie z CO_2 i tworzący w ten sposób dodatkową grupę karboksylową. Autor tej hipotezy Suttie uważa, że istnieje ponadto alternatywny mechanizm tego procesu, zgod-

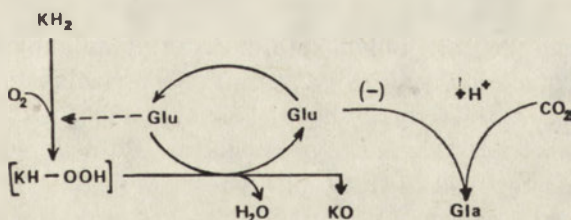
nie z którym nadtlenek nie bierze udziału bezpośrednio w ataku na atom węgla γ , ale czyni to za pośrednictwem aktywnego hemu lub innego centrum aktywnego (reakcje IIa i IIb). Nie jest jednak wykluczone, że proces ten może przebiegać według innych mechanizmów, tym bardziej, że obecny stan wiedzy jest niedostateczny do wyjaśnienia czy tworzenie rodników oraz karboanionu na węglu γ reszty glutaminianu faktycznie zachodzi, ani



Ryc. 8. Model procesu karboksylacji według Suttie'go (38).

też jaka jest konfiguracja elektronowa atakowanego związku. W tym ujęciu można rolę witaminy K sprowadzić do „aktywacji” lub przeniesienia CO_2 na aminokwas bez udziału biotyny. Podobny mechanizm sugerują Larson i wsp. (39), według których początkowe włączenie tlenu w tej reakcji zachodzi przez atak semichinonu witaminy K na tlen cząsteczkowy, a nie przez atak anionu ponadtlenkowego O_2^- na witaminę K (32).

Na podstawie dalszych badań Larson i wsp. (40) zaproponowali hipotezę mechanizmu karboksylacji (Ryc. 9), zgodnie z którą wodoronadtlenek witaminy K oddziałując na resztę kwasu glutaminowego odszczepia od niego wodór w pozycji γ i jednocześnie tworzy formę epoksydową. Potwierdzeniem zajścia tej reakcji jest stechiometryczna zależność między ilością wytworzonego epoksydu i ilością odszczepionego wodoru



Ryc. 9. Model procesu karboksylacji według Larsona i wsp. (40).

w pozycji γ reszty kwasu glutaminowego. Następnie do powstałego w ten sposób karboanionu reszty aminokwasowej zostaje dołączony dwutlenek węgla tworząc w ten sposób dodatkową grupę karboksylową.

W ostatnich latach powstało wiele koncepcji próbujących wyjaśnić szczegóły procesu karboksylacji kwasu glutaminowego. Wykazano między innymi, że 5'fosfopirydoksal *in vitro*, ale nie *in vivo* przyspiesza dwukrotnie szybkość tego procesu (41) prawdopodobnie na skutek interakcji z jonem manganawym zawartym w karboksylazie glutaminianowej. Powstała również koncepcja udziału witaminy K w hydroksylacji alaniny do seryny w białkach zależnych od tej witaminy: protrombinie, czynnika X i białku C, jak w przypadku karboksylacji: hydrochinon atakując atom węgla w obecności tlenu cząsteczkowego, doprowadza do oderwania od niego wodoru. Do powstałego w ten sposób karboanionu przyłącza się CO_2 lub $1/2 \text{O}_2$ w zależności od celu reakcji, a witamina K przechodzi jednocześnie w epoksyd (42). Dokładniejszy przegląd tych hipotez znajdzie czytelnik w pracy przeglądowej Johnsona (41).

Przedstawione tu wyniki zdają się całkowicie odrzucać wcześniejszą hipotezę o udziale biotyny w procesie karboksylacji (43). Niemniej jednak kilku badaczy podjęło próby wyjaśnienia ewentualnego udziału biotyny w tym procesie. Między innymi Friedman i Shia (44) przeprowadzili badania z użyciem awidyny odznaczającej się zdolnością wiązania biotyny. Okazało się jednak, że awidyna nie była w stanie obniżyć aktywności systemu karboksylacji reszty kwasu glutaminowego, co definitywnie zaprzecza tezie o udziale karboksybiotyny w procesie posttranslacyjnej karboksylacji preprotrombiny.

III-3. Enzymy procesu karboksylacji

1. Reduktaza filochinonu redukuje witaminę K do hydrochinonu. Enzym ten (EC 1.6.99.2.) występuje co najmniej w dwóch postaciach: jako reduktaza menadionowa i chinonowa (45). Jej masa cząsteczkowa wynosi około 55 000 i zawiera 1 mol FAD/mol enzymu. Cząsteczka reduktazy składa się z dwóch monomerów o masach cząsteczkowych wynoszących około 27 000 każdy. Źródłem wodoru służącego do redukcji witaminy są *in vitro* NAD i NADP oraz ditiotreitól, a *in vivo* prawdopodobnie tylko oba wyżej wymienione nukleotydy.

2. Oksydaza hydrochinonowa katalizuje utlenianie hydrochinonu witaminy K do postaci epoksydowej. Została ona wyizolowana z szorstkiego *retikulum* komórek wątroby bydłcej (46, 47) jako fosfolipid składający się w 72% z białka i 28% z fosfatydylocholiny. Po usunięciu komponenty fosfolipidowej następowała utrata aktywności biologicznej, natomiast dodanie mieszaniny egzogennych fosfolipidów przywracało aktywność enzymu.

3. Reduktaza epoksydowa redukująca 2,3-epoksyd witaminy K do chinonu, jest najslabiej poznanym enzymem cyklu witaminy K. Jest ona wrażliwa na antymetabolity witaminy K: warfarynę i dikumarol. Związki te blokują enzym zatrzymując przez to przemianę epoksydu, co z kolei doprowadza do zahamowania karboksylacji reszty kwasu glutaminowego.

Wyżej wymienione trzy enzymy tworzą spójny kompleks wieloenzymatyczny (48, 49, 50) połączony z białkiem zawartym w wewnętrznej błonie szorstkiego *retikulum* (51).

III-4. Rola kwasu γ -karboksylglutaminowego w krzepnięciu krwi

Jak podano poprzednio, obecność kwasu γ -karboksylglutaminowego w protrombinie jest niezbędna do połączenia jej z wapniem, co z kolei jest warunkiem kontaktu z powierzchnią fosfolipidową płytek krwi, na której w obecności czynników krzepnięcia Xa i V następuje przemiana protrombiny w trombinę. Obecnie uważa się, że rola dodatkowych grup karboksylowych sprowadza się jedynie do wytworzenia połączenia z powierzchnią płytek krwi przez jon wapnia, co z kolei ułatwia kontakt z wyżej wymienionymi czynnikami krzepnięcia, w obecności których dochodzi do aktywacji protrombiny. Grupom tym natomiast odmawia się jakiegokolwiek roli w biologicznej funkcji tych czynników krzepnięcia, w których kwas γ -karboksylglutaminowy występuje. Jest to o tyle uzasadnione, że wszystkie reszty tego aminokwasu pozostają w peptydzie odłączonym od protrombiny w trakcie jej przemiany do trombiny.

Przemiana protrombiny do trombiny odbywa się na skutek działania formy aktywnej czynnika X określanej jako Xa, przy jednoczesnym udziale czynnika Va, fosfolipidów oraz trombiny. Czynniki X ma masę cząsteczkową 55 000 i zawiera 10% węglowodanów, w tym 3,8% kwasu neuraminowego, 2,9% heksoz i 3,6% heksozoamin. Wiadomo ponadto, że składa się z dwóch łańcuchów polipeptydowych połączonych ze sobą mostkiem siarczkowym. Cięższy łańcuch o masie cząsteczkowej 38 000 związany jest ze wszystkimi węglowodanami zawartymi w tym czynniku. Lżejszy łańcuch ma masę 17 000 i nie zawiera żadnych składników o charakterze niebiałkowym. Aktywacja czynnika X polega na odszczepieniu peptydu od aminowego końca cięższego łańcucha, a następnie odłączeniu glikopeptydu od drugiego końca, czyli od strony wolnej grupy karboksylowej. Powstały w ten sposób czynnik Xa tworzy kompleks z czynnikiem V, charakteryzującym się masą cząsteczkową 280 000 i dużym powinowactwem do wapnia. Sam czynnik V nie ma zdolności aktywowania protrombiny o ile działa pojedynczo, natomiast aktywność biologiczną wykazuje dopiero w obecności czynnika Xa, przyspieszając jego oddziaływanie na protrombinę.

Według współczesnych poglądów, rola czynnika V i trombiny polega

na wytworzeniu odpowiedniej struktury przestrzennej protrombiny i aktywującego ją czynnika Xa w celu umożliwienia reakcji między nimi. W tak utworzonym kompleksie zachodzi z kolei reakcja polegająca na odłączeniu od protrombiny długiego łańcucha polipeptydowego, zawierającego 274 reszty aminokwasowe z dołączonymi doń dwoma łańcuchami cukrowymi. Warto zaznaczyć, że odłączony od trombiny polipeptyd zawiera wszystkie reszty kwasu γ -karboksylglutaminowego. Efektem tego jest szybkie odłączenie od powierzchni fosfolipidowej trombiny, która nie zawierając reszt tego aminokwasu, nie posiada zdolności łączenia się z tą powierzchnią. Uwolniona trombina zbudowana jest z dwóch łańcuchów: A — liczącego 49 reszt aminokwasowych i B — 256. Łańcuchy te łączą się ze sobą mostkiem siarczkowym. Bardziej szczegółowe dane dotyczące przemian czynników krzepnięcia krwi znajdzie czytelnik w pracy przeglądowej prof. M. K o p e ć (52) oraz dr habil. Cz. C i e r n i e w s k i e g o i prof. T. K r a j e w s k i e g o (53).

IV. Udział witaminy K w procesach glikozylacji

Przemiana prekursorów polipeptydowych w aktywne formy czynników krzepnięcia krwi II, VII, IX i X polega na opisanym wyżej dołączeniu dodatkowych grup karboksylowych do reszty kwasu glutaminowego oraz na przyłączeniu komponenty cukrowcowej (zatem czynniki te są glikoproteinami (7)). Owe łańcuchy węglowodanowe zbudowane są z reszt glukozaminy i galaktozaminy. Glukozamino-6 P powstaje z kolei w nieodwracalnej reakcji z frutozo-6 P i glutaminy. Z glukozamino-6 P po wielu reakcjach towarzyszących urydynodifosfo-N-acetyloglukozamina i UDP-N-acetylogalaktozamina, które uczestniczą w biosyntezie kwaśnych mukopolisacharydów wchodzących w skład węglowodanowych cząsteczek glikoprotein stanowiących wyżej wymienione czynniki krzepnięcia krwi.

Kilku badaczy podjęło prace nad wyjaśnieniem czy witamina K odgrywa rolę również i w procesie glikozylacji (54, 55, 56). Okazało się bowiem, że witamina ta oddziałuje na biosyntezę mukopolisacharydów i glikoproteidów przez aktywację syntezy heksozoamin i kwasu heksozouronowego, a ponadto zwiększa aktywność enzymów biorących udział w syntezie komponenty glikozylowej, między innymi aminotransferazy glutamina-glukozy 6-P.

Witamina K oraz jej analogi stosowane były z pozytywnymi skutkami przy likwidowaniu zwiększonej przepuszczalności błon biologicznych, spowodowanej spadkiem poziomu mukopolisacharydów i glikoproteidów. Poziom tych substancji, jak wykazał S z a r e w (54) wzrastał po podaniu witaminy K. Podawanie jednak dużych dawek tej witaminy doprowadzało z kolei do wzrostu zawartości kwasu heksozouronowego i heksozoamin w wielu tkankach, między innymi w aorcie. Odwrotnie działały

antymetabolity witaminy K — po ich zastosowaniu obserwowano zmniejszenie biosyntezy glukozaminy w śluzówce żołądka. Między innymi warfaryna (substancja blokująca przemianę epoksydu do witaminy K) hamowała proces glikozylacji protrombiny, natomiast podanie witaminy K przywracało glikozylację (57).

V. Białka zależne od witaminy K wykryte w ostatnich latach

V-1. Białko C

W ostatnich latach wykryto dalsze białka modyfikowane posttranslacyjnie przy udziale witaminy K. Należą do nich białka C i S występujące w osoczu i biorące udział w procesie krzepnięcia krwi oraz osteokalcyna, wykryta między innymi w kościach embrionów, szklawie zębów itp.

Białko C zostało wykryte i scharakteryzowane przez Stenflo'ego (58), który wykazał, że składa się ono z dwóch podjednostek o masach cząsteczkowych 21 000 i 35 000, będących łańcuchami polipeptydowymi połączonymi mostkami siarczkowymi (59, 60). Podobnie jak i pozostałe białka krzepnięcia krwi zależne od witaminy K, również i białko C zawiera komponenty cukrowcowe o charakterze N-acetyloglukozaminy. Ogólny poziom sacharydów w tym białku wynosi 14,9⁰%. Skład aminokwasowy białka C jest podobny do składu pozostałych białek krzepnięcia, różni się jedynie wyższym poziomem cysteiny i waliny. Lekki łańcuch zawiera reszty kwasu γ -karboksylglutaminowego w pozycjach 6 i 7. Warto podkreślić przy tym, że sekwencja tego łańcucha licząc od końca aminowego jest homologiczna do protrombiny oraz czynników VII, IX i X. Badania ilościowe wykazały, że białko to występuje w osoczu w ilościach około 80 razy większych aniżeli czynnik VII. W przeciwieństwie do pozostałych białek osocza zależnych od witaminy K, jest ono antykoagulantem (61, 62, 63). Jako zymogen krążąc we krwi nie oddziałuje na układ krzepnięcia, ale po aktywacji zyskuje zdolność trawienia czynników Va i VIII, które w wyniku tego tracą aktywność biologiczną.

Badania sekwencji aminokwasowej wykazały duże podobieństwo pomiędzy czynnikiem X i białkiem C, co nasuwa przypuszczenie, że oba te enzymy wiążą się kompetycyjnie z tym samym miejscem czynnika Va. Sugerowałoby to możliwość oddziaływania ochronnego czynnika Xa, który osłaniałby czynnik Va przed inaktywacją przez białko C. Hipoteza o zdolności czynnika Xa do osłony Va przed niszczeniem przez białko C znalazła dalsze potwierdzenie w literaturze. Jednocześnie wykazano, że białko to oddziałuje na stabilizację błon biologicznych (64).

V-2. Białko S

Białko to zostało opisane przez Di Scipia i wsp. (65, 66). Ma ono masę cząsteczkową wynoszącą około 69 000, z czego na składnik białkowy

(pojedynczy łańcuch peptydowy) przypada około 68 000, a na cukrowcowy około 1000. Dokładna charakterystyka tego białka nie została jeszcze przeprowadzona, ustalono jedynie procentową zawartość poszczególnych aminokwasów, a także, że jednym ze składników komponenty cukrowcowej jest N-acetyloheksozoamina. Nie jest znana również funkcja biologiczna białka S. W przeciwieństwie do pozostałych białek osocza zależnych od witaminy K, prawdopodobnie nie posiada ono aktywności koagulacyjnej, jest jednak prawdopodobnie prekursorem proteazy serynowej.

V-3. Osteokalcyna

Do białek zawierających kwas γ -karboksylglutaminowy należy osteokalcyna wykryta w kościach embrionów kurzych (67, 68). Następnie obecność tego białka stwierdzono między innymi w zębach, mikrosomach kory nerek, łożysku, trzustce, śledzionie, płucach i fibroblastach. Szczególnie dużo jednak występuje osteokalcyny w kościach, w których jak wykazały badania prowadzone z zastosowaniem $^{14}\text{CO}_2$, występuje kilka form tego białka. Nie stwierdzono natomiast z całą pewnością, czy białko to występuje również w tych kościach, w których proces kostnienia został zakończony. Zgodnie z badaniami Hauschka (69) stanowi ono 8% całkowitego białka niekolagenowego w kościach i różni się zdecydowanie masą cząsteczkową i sekwencją aminokwasów od białek osocza zawierających Gla. Białko to syntetyzowane jest w mikrosomach komórek kostnych w okresie embrionalnym, a jego synteza zaczyna się już w 8 dniu rozwoju płodu.

Osteokalcyna otrzymana z kości kurcząt ma masę cząsteczkową 6500. Łańcuch białkowy zawiera 57 aminokwasów z czego 4 stanowią reszty Gla. Dzięki nim cząsteczka białka może wiązać 2 jony Ca^{2+} z powinowactwem $K_d = 0,83 \text{ mM}$, a więc mocno zbliżonym do powinowactwa protrombiny. Białko to ma dwa centra wiążące wapń, które przy stężeniu równym $0,8 \text{ mM Ca}^{2+}$ ulegają połowicznemu wysyceniu jonem wapniowym. Ponadto białko to ma jeszcze dwa centra o mniejszym powinowactwie do tego jonu. Synteza osteokalcyny, a przede wszystkim możliwość wykonywania funkcji biologicznej uzależniona jest od działania antywitamin K. Podanie dikumarolu w okresie embrionalnego tworzenia kości obniża syntezę Gla do 80%, a warfaryny do 75%, co jednak nie wpływa na zdolność wiązania wapnia i fosforu przez kości. Oddziaływanie tych antymetabolitów sprowadza się do obniżenia wydajności syntezy Gla, tak że zamiast 4 reszt tego aminokwasu powstają 3 lub 2. Nie obserwuje się jednocześnie zmian w morfologii kości, ani też zawartości w nich popiołu czy suchej masy.

Rola biochemiczna osteokalcyny nie jest znana. Istnieje wiele sprzecz-

nych doniesień odnośnie roli tego białka w procesie kostnienia w okresie embrionalnym, jak i jego udziału w metabolizmie jonowym kości u zwierząt dorosłych. Według H a u s c h k a (69) białko to raczej nie bierze udziału w wiązaniu przez zrąb kostny jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-} dlatego, że po pierwsze poziom tych jonów, jak wspomniano poprzednio, nie zmienia się po zastosowaniu antywitamin K, a po drugie ze względu na to, że jest to białko o charakterze niekolagenowym. Istnieją jednak dane literaturowe świadczące o zaburzeniu w kostnieniu płodu we wczesnym etapie ciąży po zastosowaniu antywitamin K. Zgodnie z tymi danymi osteokalcyna uczestniczy w wiązaniu wapnia w hydroksyapatycie, przy czym jeden mol tego białka przypada na 10^4 jonów Ca^{2+} , co odpowiada jednemu mikrokryształowi hydroksyapatytu.

Zahamowanie syntezy osteokalcyny na skutek podawania antywitamin K doprowadziło do hamowania przemiany prekursora kolagenowego do postaci ostatecznej. Na tej podstawie H a u s c h k a (68) przypuszcza, że białko to jest aktywnym polipeptydem biorącym udział w syntezie minerałów kostnych, usuwanym proteolitycznie z prokolagenu kostnego w momencie jego kostnienia. Według L i a n' a (64) funkcja osteokalcyny może polegać na udziale w homeostazie wapnia, na przenoszeniu go w zależności od stanu fizjologicznego przez błony komórkowe osteoblastów do środka lub na zewnątrz, a także na udziale w resorpcji Ca^{2+} w nerkach. Świadczą o tym obserwacje zdolności tego białka do hamowania precypitacji hydroksyapatytu w roztworze fosforanu wapnia (70). Białko to ma zdolność hamowania spontanicznego kostnienia przez zmniejszenie ilości aktywnych jąder tego procesu. Przypuszcza się ponadto, że osteokalcyna reguluje poziom wapnia w tkankach oddziałując na przekształcenie proenzymów do form aktywnych.

V-4. Inne białka

W literaturze biochemicznej pojawiły się ostatnio doniesienia o wykryciu w osoczu kolejnych białek zależnych od witaminy K: białka Z (71) i M (72). Nie wiadomo jednak czy chodzi tu faktycznie o różne białka, czy też jest to jedno i to samo białko.

Białka zawierające kwas γ -karboksylglutaminowy zostały ostatnio wykryte w mikrosomach nerek. Przypuszcza się, że odgrywają one rolę w utrzymaniu homeostazy wapnia. Obecność ich stwierdzono także w łożysku, trzustce, śledzionie, płucach i fibroblastach. W narządach tych prawdopodobnie odgrywają rolę w regulacji poziomu jonu wapniowego, który z kolei uczestniczy w przekształcaniu proenzymów do form aktywnych (73).

PIŚMIENICTWO

1. Davie E. W., Fujikawa K., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 799—824.
2. Stenflo J., (1977), *New Engl. and J. Med.*, **296**, 624—625.
3. Esmon Ch. T., Suttie J. W., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6238—6243.
4. Hauschke P. V., Friedman P. A., Traverso H. P., Gallop P. M., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 1207—1209.
5. Sadowski J. A., Esmon Ch. T., Suttie J. W., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2770—2776.
6. Magnusson S., Sottrup-Jensen L., Petersen T. E., Morris H., Dell A., (1974), *FEBS Lett.*, **44**, 189—193.
7. Suttie J. W., Grant G. A., Esmon Ch. T., Shah D. V., (1974), Symposium on Vitamin K, Mayo Clinic Proceedings dec 49 no 12, 912—929.
8. Stenflo J., Fernlund P., Eganand W., Roepstorff P., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 2730—2733.
9. Zytkovicz T. H., Nelsestuen G. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2968—2972.
10. Bucher D., Nebelin E., Thomsen J., (1976), *FEBS Lett.*, **68**, 292—296.
11. Howard J. B., Nelsestuen G. L., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 1281—1285.
12. Goldenbaum P. E., Keyser P. D., White D. C., (1975), *J. Bacteriol.*, **121**, 442—449.
13. Esmon Ch. T., Suttie J. W., Jackson C. M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4095—4099.
14. Mann K. G., (1974), Symposium on Vitamin K, Mayo Clinic Proceedings 49 no 12, 929—932.
15. Mack D. O., Suen E. T., Girardot J. M., Miller J. A., Delaney R., Johnson B. C., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3269—3276.
16. Girardot J. M., Mack D. O., Floyd R. A., Johnson B. C., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 655—662.
17. Suttie J. W., Hageman J. M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5827—5830.
18. Esmon Ch. T., Suttie J. W., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6238—6243.
19. Goodman S. R., Houser R. M., Olson R. E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 250—257.
20. Willingham A. K., Matschiner J. T., (1974), *Biochem. J.*, **140**, 435—441.
21. Caldwell P. T., Ren P., Bell R. G., (1974), *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 3353—3358.
22. Mack D. O., Suen E. T., Girardot J. M., Miller J. A., Delaney R., Johnson B. C., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 269—276.
23. Friedman P. A., Shia M., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 647—652.
24. Martinus C., Stufe R., (1954), *Biochem. Z.*, **324**, 24—25.
25. Wellin R., Gebhardt O., Prydz H., (1978), *Biochem. J.*, **169**, 95—101.
26. Matschiner J. T., Bell R. G., Amelotti M. J., Knauer T. E., (1970), *Biochem. Biophys. Acta*, **201**, 309—315.
27. Carlisle T. L., Suttie J. W., (1980), *Biochemistry*, **19**, 1161—1167.
28. Esnouf M. P., Green M. R., Hill H. A. D., Walter S. J., (1979), *FEBS Letters*, **1**, 146—150.
29. Cadenas E., Boveris A., Ragan C., Stoppani A. O. M., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 248—257.
30. Esnouf M. P., Green M. R., Hill H. A. O., Irvine G. B., Walter S. J., (1978), *Biochem. J.*, **174**, 345—348.

31. Larson A. E., Whitlon D. S., Suttie J. W., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 876—881.
32. Suttie J. W., Larson A. E., Canfield L. M., Carlisle T. L., (1978), *Fed. Proc.* **37**, 2605—2609.
33. Larson A. E., Suttie J. W., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 5413—5416.
34. Gallop P. M., Lian J. B., Hauschke P. V., (1980), *Biochemistry*, **19**, 1161—1167.
35. Walz D. A., Kipfer R. K., Olson R. E., (1975), *J. Nutr.*, **105**, 972—981.
36. Ren P., Stark P. V., Johnson R. L., Bell R. G., (1977), *Pharmacol. Exp. Ther.*, **201**, 541—546.
37. Whitlom D. S., Sadowski J. A., Suttie J. W., (1978), *Biochemistry*, **17**, 1371—1377.
38. Suttie J. W., (1980), *Fed. Proc.*, **39**, 2730—2735.
39. Larson A. E., Whitlom D. S., Suttie J. W., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 876—881.
40. Larson A. E., Friedman P., Suttie J. W., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 11032—11035.
41. Johnson B. C., (1981), *Mol. Cell Biochem.*, **11**, 77—121.
42. Mathese K. L., (1975), *Die Med. Welt*, **26**, 1777—1782.
43. Chander K. S., Gaudry M., Marquet A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **673**, 157—162.
44. Friedman P. A., Shia M. A., (1977), *Biochem. J.*, **163**, 39—43.
45. Metz de M., Vetmeer C., Soute B. A., Hemker H. C., (1981), *J. Biol. Chem.*, **10**, 10843—10846.
46. Friedman P. A., Mitch W. E., Silva P., (1982), *J. Biol. Chem.*, **25**, 11037—11040.
47. Egeberg K., Helgeland L., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **7**, 225—229.
48. Wallin R., Suttie J. W., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 155—163.
49. Suttie J. W., (1980), Vitamin K metabolism, Univ. Park, Press Baltimore.
50. Votila L., Suttie J. W., (1982), *Med. Biol.*, **60**, 16—24.
51. Hildebrandt E. F., Suttie J. W., (1982), *Biochemistry*, **21**, 2406—2411.
52. Kopeć M., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 3—23.
53. Cierniewski Cz. S., Krajewski T., (1981), *Post. Biochem.*, **27**, 81—105.
54. Sharaew P. N., Bogdanow N. G., Nurkajewa A. T., (1977), *Cor. Vese* **19**, 151—155.
55. Sharaew P. N., Bogdanow N. G., (1979), *Bull. Exp. Biol. Med.*, **88**, 53—55.
56. Sharaew P. N., (1981), *Vopr. Pitan.*, **5**, 25—27.
57. Meeks R. G., Couri D., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **544**, 634—637.
58. Stenflo J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 355—363.
59. Di Scipio R. G., Hermodson M. A., Yates S. G., Davie E. W., (1977), *Biochemistry*, **16**, 698—706.
60. Seegers W. M., Noroa E., Henry R. L., Hassouna H. I., (1976), *Thrombosis Res.*, **8**, 543—552.
61. Kisiel W., Canfield W. M., Ericsson L. H., Davie E. W., (1977), *Biochemistry*, **16**, 5824—5831.
62. Vehar G. A., Davie E. W., (1980), *Biochemistry*, **19**, 401—410.

63. Walker F. J., Sexton P. W., Esmon Ch. T., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **571**, 333—342.
64. Lian J. B., Hauschka P. V., Gallop P. M., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 2615—2620.
65. Radcliffier R., (1975), *J. Biol. Chem.*, **259**, 388—395.
66. Nelsestuen G. L., Kisiel W., Di Scipio R. G., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2134—2138.
67. Hauschke P. V., Lian J. B., Gallop P. M., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, **72**, 3925—3931.
68. Hauschke P. V., Reid M. L., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 9063—9069.
69. Hauschke P. V., Reid M. L., (1978), *Dev. Biol.*, **65**, 426—434.
70. Searcey M. T., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6260—6267.
71. Prowers Z., (1977), *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 255—256.
72. Segers W. M., (1980), Vitamin K metabolism. Univ. Park. Press Baltimore.
73. Gallop P. M., Lian J. B., Hauschka P. V., (1980), *N. Engl. J. Med.*, **26**, 1460—1466.

ELŻBIETA BIESIADA *)

Acetylacja histonów

Histone acetylation

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Charakterystyka acetylacji histonów
- III. Metody badania acetylacji histonów
- IV. Enzymy biorące udział w acetylacji i deacetylacji histonów
- V. Wpływ acetylacji histonów na funkcję i strukturę chromatyny
 - V-1. Obecność acetylowanych histonów w aktywnych domenach DNA
 - V-2. Znaczenie acetylacji histonów w aktywacji genów
 - V-3. Wpływ acetylacji histonów na strukturę nukleosomu

Contents

- I. Introduction
- II. Characteristics of histone acetylation
- III. Methods for investigation of histone acetylation
- IV. Enzymes involved in acetylation and deacetylation of histones
- V. Effect of histone acetylation of function and structure of chromatin
 - V-1. Presence of acetylated histones in active DNA domains
 - V-2. Role of histone acetylation in activation of genes
 - V-3. Effect of histone acetylation on structure of nucleosome

I. Wstęp

Do lat sześćdziesiątych uważano, że histony są białkami nieaktywnymi metabolicznie. W roku 1963 stwierdzono, że histony ulegają acetylacji (1), a w następnych latach zaobserwowano obecność w histonach grup metylo-
wych (2) i fosforylowych (3). Obecnie wiadomo, że struktura histonów
wszystkich klas ulega wtórnym modyfikacjom, występującym w regionie

*) Mgr biochemii, Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, 44-100 Gli-
wice, Wybrzeże Armii Czerwonej 15.

łańcucha polipeptydowego, który — jak się przypuszcza — oddziałuje z DNA.

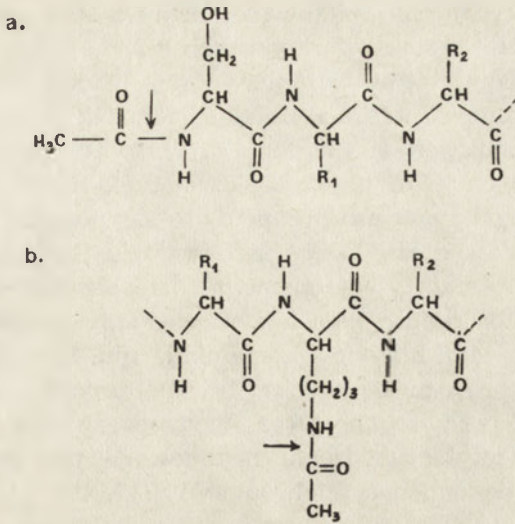
Posyntetyczne modyfikacje histonów mogą być jednym z elementów wpływających na ekspresję genów, obok, czy łącznie z metylacją DNA (4, 5) i białkami niehistonowymi (6). Posyntetyczne modyfikacje histonów (acetylacja, metylacja, fosforylacja, poli(ADP — rybozylacja)) są obszernie opisane w pracach dotyczących metabolizmu chromatyny (7—10).

Acetylacja histonów wydaje się być najbardziej prawdopodobnym mechanizmem wpływającym na oddziaływanie w nukleosomie typu histon-histon czy histon-DNA. Obserwuje się uderzającą współzależność pomiędzy wzrostem poziomu acetylacji histonów a wzrostem syntezy RNA w wielu systemach biologicznych (7, 8). Regiony chromatyny, w których zachodzi synteza RNA (11) charakteryzują się wysokim stopniem acetylacji histonów (8, 12, 13) i są preferencyjnie trawione DNazą I (14). Prawdopodobnie odczyt matrycy przez polimerazę RNA jest możliwy tylko wówczas, gdy nukleosomy aktywnych genów zawierają acetylowane histony (8, 15).

II. Charakterystyka acetylacji histonów

Grupy acetylowe w histonach grascicy cielęcej wykrył w 1963 roku Phillips (1), który następnie wykazał, że acetylacji ulegają końcowe grupy — NH_2 łańcucha polipeptydowego histonów (16). Te obserwacje zapoczątkowały serię doświadczeń. W izolowanych jądrach, w których nie zachodzi synteza białek histonowych wykazano wbudowywanie w histony znakowanego octanu oraz pojawianie się w nich poprzednio nieznanego aminokwasu $-\epsilon\text{-N}$ -acetylolizyny (17, 18). Obecnie wiadomo, że acetylacji mogą ulegać grupy α -aminowe seryny stanowiącej N-końcowy aminokwas łańcucha polipeptydowego i grupy ϵ -aminowe lizyny wewnątrz łańcucha polipeptydowego.

N-końcowe acetylacje histonów badano wykorzystując jądra regenerującej wątroby szczura (19). Stwierdzono, że synteza histonów pojawia się około 16-tej godziny, a osiąga szczyt w 24-tej godzinie po hepatektomii. Stosując [^3H]-octan, jako prekursor histonowych grup acetylowych, i [^{14}C]-serynę, jako markera nowosyntetyzowanych histonów wykazano, że [^3H]-acetylo-N-[^{14}C]-seryna może być odzyskiwana na drodze proteolitycznego trawienia białek histonowych najwcześniej po 16-tej godzinie cyklu komórkowego po hepatektomii. Po zadziałaniu puromycyną i cykloheksimidem nie stwierdzono produkcji cząsteczek histonowych zawierających [^3H]-acetylo-N-[^{14}C]-serynę w ich końcu aminowym (19, 20). Na podstawie tych danych wysunięto wniosek, że acetylacja NH_2 -końcowych miejsc seryny zachodzi równocześnie z syntezą histonów. Acetylacja seryny jest trwała (21, 22) i dlatego histony niezdelających się komórek wykazują nis-



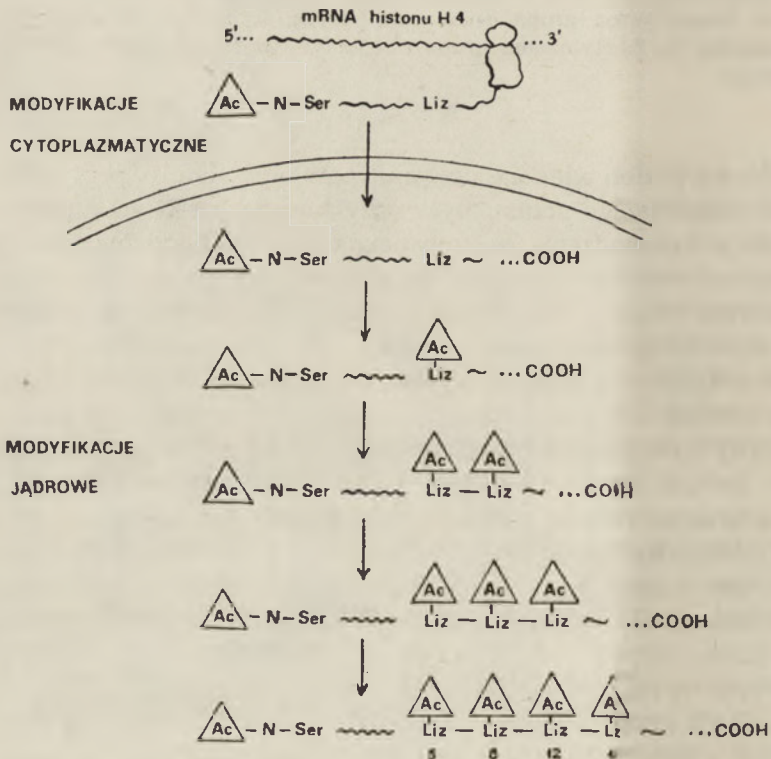
Ryc. 1. Fragmenty łańcucha polipeptydowego zawierające zmodyfikowane aminokwasy. A. Zacetylowana grupa α -aminowa seryny stanowiąca N-końcowy aminokwas łańcucha. B. Zacetylowana grupa ϵ -aminowa lizyny wewnątrz łańcucha polipeptydowego.

ki lub zerowy poziom włączania octanu w aminowy koniec peptydu; ogromna część znakowanego octanu była odzyskiwana z ϵ -N-acetylolizyny (17, 19). Reakcja wprowadzenia znakowanego octanu do histonów niedzielących się jąder erytrocytów ptasich była niewrażliwa na cykloheksimid (23), na podstawie czego można wnioskować, że acetylacja grup ϵ -aminowych lizyny zachodzi po zakończeniu syntezy łańcucha polipeptydowego histonu. ϵ -N-acetylolizynę zidentyfikowano w histonach kiełków grochu (24), jądrach pstrąga (25), komórkach linii HeLa (21) i drożdżach (26). Acetylacja lizyny była głównie obserwowana w histonach bogatych w argininę (18, 27). Jednak następne badania wykazały, że wszystkie histony, które wchodzi w skład rdzenia nukleosomu podlegają enzymatycznej acetylacji (28—30). Mogą być acetylowane: jedna pozycja histonu H2a (lizyna w pozycji 5), cztery pozycje histonu H2b (lizyna w pozycji 5, 10, 13, 18), cztery pozycje histonu H3 (lizyna w pozycji 9, 14, 18, 23) i cztery pozycje histonu H4 (lizyna w pozycji 5, 8, 12, 16). Nie zaobserwowano obecności grup acetylowych w histonie H1 (30).

Acetylacja grup ϵ -aminowych lizyny w histonach jest nietrwała i acetylolizyna ulega szybkiemu obrotowi metabolicznemu (21, 31—36). W wielu różnych histonach półokres trwania grup acetylowych nie przekracza kilku minut (2, 3, 10, 21, 32, 37, 38). Najszybciej i w najwyższym stopniu ulegają modyfikacji histony H3 i H4, które odgrywają kluczową rolę w organizacji nukleosomu (39, 41). Histony każdej z tych klas stanowią mieszaninę łańcuchów polipeptydowych zawierających do 4 grup

ϵ -N-acetylolizynowych. Zmodyfikowane formy histonów izolowano przy użyciu różnych technik elektroforetycznych (42).

Dokładnie zbadano modyfikacje histonów z jąder pstrąga i stwierdzono, że synteza histonów i ich modyfikacje zachodzą równolegle z syntezą DNA podczas spermatogenezy (28, 29, 43). W zsynchronizowanej hodowli komórek jajowych chomika najwięcej cząsteczek histonu H4 zawierających wewnętrzne grupy acetylowe pojawia się podczas interfazy — w okresie intensywnej syntezy DNA, czyli w fazie S cyklu komórkowego (41, 44). Wewnętrzne acetylacje pojawiają się we wszystkich cząsteczkach histonów bezpośrednio po ich syntezie. Gdy komórki wchodzi w mitozę stopień acetylacji histonów ulega obniżeniu. Sugeruje się, że obecność acetylowych grup może mieć wpływ na proces kondensacji chromatyny w trakcie spermatogenezy (42), erytropoezy (45), i mitozy (7, 44). Prawdopodobnie acetylacja rdzenia histonowego powoduje rozwinięcie nukleosomu (46) i dekondensację chromatyny (47, 48).



Ryc. 2. Synteza histonu H4 i jego strukturalne modyfikacje w dzielących się erytroblastach ptaka (zmodyfikowane wg (9)).

NH_2 -końcowe grupy acetylowe przyłączone zostają podczas syntezy histonów w cytoplazmie, podczas gdy wewnętrzne modyfikacje nowosyn-

tetyzowanych histonów zachodzą na terenie jądra (1, 8). Dane charakteryzujące acetylację histonów na terenie cytoplazmy i jądra zebrano w Tabeli 1.

Tabela 1

Charakterystyka acetylacji histonów

| | Modyfikacja aminoterminalnych grup peptydu | Modyfikacja grup wewnętrznych peptydu | Piśmiennictwo |
|---|---|--|------------------------|
| Modyfikowane aminokwasy | seryna | lizyna | 1, 14, 15 |
| Obrót metaboliczny | wolny | szybki | 19, 27, 29, 34 |
| Miejsce i czas acetylacji histonów na terenie komórki | w cytoplazmie równocześnie z syntezą histonów | w jądrze po zakończeniu syntezy histonów | 9, 16, 17, 97, 98, 106 |
| Enzymy modyfikujące | acetylotransferaza B | acetylotransferaza A | 97, 102, 104—106 |

III. Metody badania acetylacji histonów

Ze względu na niski stopień acetylacji histonów w warunkach fizjologicznych badano przebieg ich acetylacji na drodze chemicznej (49—54). Jako nośników grup acetylowych używano znakowanego octanu sodu, bezwodnika kwasu octowego, octanu adenylu lub acetylo-CoA (13, 17, 29, 41, 49, 52—68).

Inkubacji z nośnikami grup acetylowych poddawano izolowane histony, chromatynę, jądra, komórki czy skrawki tkanek. Stwierdzono jednak, że po wyizolowaniu można acetylować także te frakcje histonów, w których *in vivo* acetylacja nie jest obserwowana (np. histonu H1 (52—54)). Uzyskuje się także dużo wyższy, niż *in vivo*, stopień acetylacji histonów H2a i H2b. Poza tym w trakcie acetylacji izolowanych histonów ulegały także modyfikacji aminokwasy w innych, niż *in vivo*, pozycjach łańcucha polipeptydowego histonu (53, 54).

W komórkach hodowanych *in vitro* w obecności milimolowego roztworu maślanu sodu obserwuje się znaczny wzrost stopnia acetylacji histonów. To spostrzeżenie Riggs'a i wsp. (69) stało się podstawą powszechnie stosowanej metody badania acetylacji histonów. Po 24-godzinym działaniu maślanem sodu na komórki HeLa, w formie acetylowanej występowało około 80% histonu H4 i H3 (31, 46, 70—72). W późniejszych badaniach wykazano, że maślan sodu działa jako inhibitor deacetylazy histonowej oraz prawdopodobnie hamuje tempo obrotu metabolicznego grup

acetylowych lizyny, które w normalnych warunkach jest wysokie (31, 38, 70, 71, 73—78). Należy jednak pamiętać, że maślan sodu w stężeniu milimolowym wpływa na biochemię komórki (7, 79). Po działaniu maślanem sodu obserwowano zmiany w tempie wzrostu i morfologii komórki (77, 80—86) oraz w zahamowaniu syntezy DNA i podziału komórkowego (77, 87—89). Stwierdzono, że chromatyna acetylowana w obecności maślanu sodu jest bardziej podatna na trawienie nukleazami (90—92). Poza tym, po działaniu na komórki maślanem sodu jęwna liczba enzymów wyraźnie zwiększa swą aktywność (80, 90, 93, 94) i obserwuje się produkcję nowych białek (83, 95—98), na przykład niehisonowego białka IP₂₅ w komórkach mysich linii Friend (70).

IV. Enzymy biorące udział w acetylacji i deacetylacji histonów

Acetylacja reszt lizynowych w cząsteczce histonu jest katalizowana przez acetylotransferazy, które używają acetylo-CoA jako donora grup acetylowych (99, 100). Wyizolowano i częściowo oczyszczono wiele form acetylotransferaz specyficznych wobec histonów, o różnej masie cząsteczkowej, różnych punktach izoelektrycznych i swoistości substratowej. Opisano enzymy pochodzące z wątroby szczura (99, 101, 102), z wątroby świnki morskiej (103, 104), cielęcia (105, 106), z grasicy cielęcej (107, 108), z komórek HTC (109, 113), z *Drosophila melanogaster* (110) oraz z larw *Artemia salina* (111).

Z jądrem komórek ssaków związana jest acetylotransferaza A, która katalizuje *in vitro* z różną wydajnością acetylację wszystkich histonów rdzenia nukleosomalnego (101, 105, 107—109). Masa cząsteczkowa acetylotransferaz A wynosi 120 000—150 000 (105, 107). Drugą formą tego enzymu jest acetylotransferaza B występująca w cytoplazmie komórek ssaków (12, 41, 100, 107, 109, 112). Enzym ten acetyluje wybiórczo wolny (niezwiązany z DNA histon H3 (109) i histon H4 (12, 100, 107)). Wyizolowano i oczyszczono acetylotransferazę z *D. melanogaster*, która prawdopodobnie pełni funkcję analogiczną do funkcji acetylotransferazy B z komórek ssaków (110). Acetylotransferaza *D. melanogaster* acetyluje tylko histon H4 w postaci wolnej, natomiast nie modyfikuje histonu związanego z chromatyną.

Uwalnianie z cząsteczki histonu grup acetylowych jest katalizowane przez enzymy, które atakują amidowe wiązane pomiędzy grupą ε-aminoową zmodyfikowanej lizyny a grupą karbonylową reszty acetylowej (114). Deacetylaza histonowa jąder grasicy cielęcej jest białkiem o masie cząsteczkowej 150 000—160 000 i optimum aktywności w pH 7.5—8.5 (115). Wykazuje ona selektywne działanie w stosunku do histonu H3 i H4. W prawidłowych komórkach występuje niskocząsteczkowy inhibitor deacetylaz histonowych (14, 116) związany z regionami chromatyny aktywnej

transkrypcyjnie (117). Dwa białka niehistonowe HMG14 i HMG17 (por. rozdz. V-2), mogą działać jako inhibitory deacetylazy histonowej (118). Efekt wydaje się być swoistym dla białek komórek linii Friend, ponieważ podobne białka innych komórek nie wykazywały analogicznego efektu hamującego. Poza tym stwierdzono, że niehistonowe białko H₄ z jąder pstrąga o właściwościach podobnych do właściwości HMG14 i HMG17 grasicy cielecej, nie hamuje aktywności deacetylazy histonowej komórek mysich (119). Są dane wskazujące na funkcjonalne powiązanie deacetylacji histonów ze zmianami aktywności transkrypcyjnej komórek. I tak deacetylaza histonowa obecna jest w wysokocząsteczkowych frakcjach chromatyny komórek HeLa, których wrażliwość na trawienie mikrokokalną nukleazą sugeruje obecność w nich sekwencji aktywnych transkrypcyjnie (120). Poza tym stwierdzono, że podczas wczesnej embriogenezy (121), jak i podczas późniejszych etapów różnicowania komórkowego (115, 118) aktywność deacetylazy zmienia się wraz z szybkością syntezy RNA różnicujących się komórek. Prawdopodobnie deacetylaza histonowa poprzez modulowanie stopnia acetylacji histonów rdzenia nukleosomalnego bierze udział w regulacji syntezy RNA.

Stopień zacetylowania histonów chromatyny *in vivo* wynika ze stanu równowagi procesów katalizowanych przez acetylotransferazy i deacetylazy.

V. Wpływ acetylacji histonów na funkcję i strukturę chromatyny

V-1. Obecność acetylowanych histonów w aktywnych domenach DNA

Chromatyna w komórkach eukariotycznych ma strukturę nukleosomalną (40), występującą w chromatynie aktywnej jak i w nieaktywnej (122—124). Aby określić wpływ stopnia acetylacji histonów na strukturę i funkcję chromatyny badano wrażliwość związanego z nimi DNA na trawienie nukleazami. Pierwsze pytanie stawiane w wielu laboratoriach brzmiało: czy wysoki poziom acetylacji chromatyny w wyniku traktowania komórek maślanem sodu powoduje wzrost wrażliwości na trawienie DNazą I? Wrażliwość na DNazę I wykazują aktywne transkrypcyjnie sekwencje DNA (14, 125—130), a także potencjalnie aktywne geny, które były lub będą aktywnie transkrybowane na pewnym etapie rozwoju komórki (127). Po trawieniu DNazą I w standardowych warunkach (125) obserwowano wzrost początkowego poziomu trawienia w jądrach traktowanych maślanem sodu (47, 131, 133). Obserwowano również wzrost wrażliwości na działanie DNazy I sekwencji DNA w chromatynie acetylowanej chemicznie (52, 64).

Sekwencje aktywne są także wybiórczo uwalniane przez ograniczone trawienie nukleazą mikrokokalną, która trawi chromatynę w regionach

sąsiadujących z sekwencjami aktywnymi transkrypcyjnie (134, 137). Wykazano, że w chromatynie jąder pstrąga sekwencje uwalniane po działaniu nukleazą mikrokokalną są powiązane z acetylowanymi histonami (33). Stwierdzono jednak, że większą dostępność zmodyfikowanej chromatyny dla nukleazy obserwuje się tylko we wczesnej (1—2 minuty) fazie trawienia (91) i dlatego prawdopodobnie w niektórych laboratoriach po dłuższym trawieniu tym enzymem otrzymano monomery nieznacznie wzbogacone w acetylowane histony (47, 92, 132, 138).

Występowanie acetylowanych histonów w aktywnych transkrypcyjnie regionach chromatyny zostało także potwierdzone w eksperymentach z zastosowaniem trawienia DNazą II. Enzym ten wycina preferencyjnie regiony chromatyny aktywnej, którą można oddzielić od pozostałej części chromatyny, wykorzystując jej rozpuszczalność w obecności jonów magnezu (140, 142). Frakcje chromatyny uwolnionej przez DNazę II są wzbogacone w acetylowane histony (130, 139, 143).

Powyższe wyniki sugerują, że acetylowane histony łączą się z sekwencjami DNA o podwyższonej wrażliwości na trawienie nukleazami.

V-2. Znaczenie acetylacji histonów w aktywacji genów

Szereg przesłanek wskazuje, że stopień acetylacji histonów rdzenia nukleosomalnego ma wpływ na aktywność transkrypcyjną komórki. Pod wpływem szoku termicznego (37°C) w jądrach komórek *Drosophila melanogaster* następuje deacetylacja około 60% histonów rdzeniowych i jednocześnie obserwuje się obniżenie tempa transkrypcji wielu genów. Przypuszcza się, że w 37°C chromatyna przybiera postać bardziej zbitą, a więc mniej dostępną dla polimerazy RNA (144). Z drugiej strony jednak istnieją dane sugerujące, że hiperacetylacja histonów nie wpływa na tworzenie struktur chromatyny wyższego rzędu typu „solenoidu” (145, 146).

Stopień acetylacji histonów ulega podwyższeniu we wczesnym stadium aktywacji genów po indukcji hormonalnej mitogenami i poliaminami (8, 22, 106, 147), natomiast niski jest w nieaktywnych regionach chromatyny (2, 13, 106). Obserwowano wzrost stopnia acetylacji histonów w limfocytach traktowanych fitohemaglutyniną (148), czy w komórkach mózgu szczura po działaniu na nie estradiolem (149, 150). Reakcja acetylacji histonów poprzedza syntezę RNA w hepatocytach po indukcji aktywności aminotransferazy tyrozynowej przez insulinę (151). Stwierdzono, że pod wpływem maślanu sodu zachodzi indukcja aktywności genu globinowego (95) i zasugerowano, że wzrost stopnia acetylacji histonów połączonych ze specyficznymi genami może mieć wpływ na aktywność transkrypcyjną. Równocześnie wykazano jednak, że maślan sodu zapobiega hormonalnej indukcji genów owoalbuminy (152).

Stopień acetylacji histonów rośnie we wczesnych stadiach aktywacji genów w jądrach wątroby szczura po częściowej hepatektomii (153). Stwierdzono, że komórki tego samego narządu, różniące się aktywnością transkrypcyjną charakteryzują się różnym stopniem acetylacji histonów. Np. w izolowanych jądrach neuronów histony H3 i H4 wykazują wyższy stopień acetylacji niż w jądrach komórek glejowych mózgu (154). Acetylacja aktywnych transkrypcyjnie chromosomów jest wyższa niż chromosomów nieaktywnych np. u *Plenococcus citria* matczynej (ang. maternal), aktywny transkrypcyjnie chromosom włącza radioaktywny octan kilka razy szybciej niż chromosom ojcowski (ang. paternal) zawierający nieaktywną transkrypcyjnie heterochromatynę (14). W wielojądrzastych orzęskach *Stylonycha mytilus* i *Tetrahymena pyriformis* w transkrypcyjnie aktywnym makrojądrze występują wysoko acetylowane histony, podczas gdy nieacetylowane histony obecne są w nieaktywnych transkrypcyjnie mikrojądrach (45, 155).

Wzrost stopnia acetylacji histonowej obserwowany jest w komórkach organizmów eukariotycznych po transformacji wirusem SV40 (37, 156, 157) i adenowirusem 2 (158). Obserwuje się różnice stopnia acetylacji histonów podczas rozwoju i różnicowania. Badania erytrocytów kaczki (159) będących w różnych stadiach dojrzewania wykazały, że histon H5 — swoisty dla erytrocytów, którego synteza zachodzi po syntezie DNA, ulega acetylacji w bardzo małym stopniu (160). W czasie gastrulacji u *Arbacia punctulata* (61) i *Rana pipiens* (161) w okresie pomiędzy stadiem *blastuli* i *gastruli* występuje 2.5-krotny wzrost poziomu acetylacji histonu. W stadium *pluteus* nie obserwowano wzmożonej modyfikacji histonów. Ten poprzedzający gastrulację wzrost stopnia acetylacji histonowej nie jest powiązany ze spadkiem tempa deacetylacji, obniżeniem puli acetylo-CoA czy też wzrostem histonów. Prawdopodobnie wzrost stopnia acetylacji histonów może aktywować nowe geny czynne w procesie gastrulacji.

Podczas rozwoju mięśni embrionów kurczęcia wzrasta szybkość acetylacji histonów i spada aktywność deacetylazy histonowej (84, 115). Natomiast inaktywacji genów towarzyszy wzrost stopnia deacetylacji histonów (42). Spadek stopnia acetylacji histonów wraz ze wzrostem wieku szczurów stwierdzono w jądrach komórek wątroby (162) i rdzenia mózgowego (163). Deacetylacja histonów rdzeniowych występuje w jądrach komórek *D. melanogaster* po szoku termicznym (144). Hiperacetylacja histonów prawdopodobnie powiązana jest z indukcją transkrypcji nowych unikalnych sekwencji DNA (164, 165). W komórkach linii Friend po inkubacji z maślanem sodu akumuluje się 38%, nie znajdujących w kontrolnych komórkach transkryptów syntetyzowanych z unikalnych sekwencji DNA (165).

Z nukleosomami związana jest pewna grupa białek niehistonowych o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej nazywanych białkami HMG (ang. high mobility group), (6, 166). W komórkach eukariotycznych ziden-

tyfikowano i opisano cztery białka HMG oznaczone jako HMG1, HMG2, HMG14 i HMG17 (167). Białka HMG zlokalizowano w obrębie „aktywnych” podjednostek chromatyny (168—171). Przy czym istnieją pewne przesłanki aby sądzić, że białka HMG1 i HMG2 powiązane są z odcinkiem DNA łączącym poszczególne nukleosomy (172, 173), natomiast coraz liczniejsze dane wskazują, że z aktywną chromatyną związane są białka HMG14 i HMG17. Białka te są niezbędnym czynnikiem warunkującym wrażliwość aktywnej chromatyny na DNazę I (174). Izolowane z aktywnej chromatyny białka HMG14 i HMG17 po dodaniu do chromatyny nieaktywnej nie powodowały wzrostu wrażliwości na DNazę I genów nieaktywnych. Wysłunięto hipotezę, że konieczny jest inny czynnik, który łącznie z białkami HMG odpowiedzialny być może za nadanie pewnym regionom chromatyny cech odróżniających je od regionów nieaktywnych. Ponieważ białka HMG14 i HMG17 hamują aktywność deacetylazy histonowej (27) wydaje się prawdopodobne, że właśnie tym dodatkowym czynnikiem współdziałającym z białkami HMG w aktywacji genów są acetylowane histony.

V-3. Wpływ acetylacji histonów na strukturę nukleosomu

Przytoczone wyżej dane sugerują, że wzrost stopnia acetylacji histonów wpływa na modyfikacje struktury i funkcji chromatyny, nie tłumaczą jednak mechanizmu tych zjawisk. Prześledzenie tej zależności było możliwe dzięki opracowaniu metod izolowania histonów wykazujących różny stopień acetylacji (42). Białka histonowe H4 rozdzielono na naturalnie występujące podfrakcje: mono- i dwuacetylowane. Obie te formy łączą się z DNA, a metodą dichromizmu kołowego wykazano, że forma monoacetylowana histonu H4 w porównaniu z formą nieacetylowaną powoduje mniejsze deformacje struktury drugorzędowej DNA (175).

Obecnie uważa się, że acetylacja histonów w nukleosomie jest częścią mechanizmu prowadzącego do „otwarcia” nukleosomów umożliwiającego transkrypcję lub replikację DNA (146, 176). Fizykochemiczne aspekty tego zjawiska przedstawione zostały przez grupę Bode (47, 72, 177, 178). Spostrzeżono, że hiperacetylacja histonów H3 i H4 komórek jajowych chomika pod wpływem maślanu sodu zmienia oddziaływania histonów pomiędzy sobą oraz pomiędzy histonami a DNA. Pewien region cząsteczki H3 zawarty we fragmencie N-końcowym jest szczególnie podatnym na modyfikacje; wywnioskowano to z jego podatności na proteolityczną degradację (177, 179).

Regiony DNA zasocjowane z acetylowanymi histonami są preferencyjnie trawione przez DNazę I bez względu na to, czy acetylacji ulegają histony już istniejące w komórce, czy też nowopowstałe w obecności maślanu sodu (31, 131, 137, 180, 181). Regiony chromatyny preferencyjnie

trawione przez DNazę I zawierają prawdopodobnie nukleosomy o zmiennej konformacji. Takie zmiany strukturalne mogą być spowodowane przez hiperacetylację, natomiast mono- czy dwuacetylacja jest zbyt małym bodźcem dla indukowania transkrypcji (31, 180). Zdolność do wzajemnych oddziaływań pomiędzy nukleosomami może zmieniać się wraz ze zmianą stopnia acetylacji histonów rdzenia nukleosomalnego (135). Jednak nawet w wysokim stężeniu maślanu sodu nie wszystkie klasy rdzeniowych histonów ulegają acetylacji. W każdej ich grupie zawarta jest pewna podklasa, której histony pozostają w formie niezmodyfikowanej. Wykazano, że histony łatwo ulegające acetytacji reagują na działanie maślanem sodu dużo szybciej niż cała grupa tych białek (73).

Z doświadczeń nad hybrydyzacją RNA—DNA wiadomo, że tylko około 10% DNA w komórce ssaków jest transkrybowane dając heterogenny, jądrowy RNA (171), natomiast aż 40% histonów H3 i H4 ulega acetylacji. Chociaż wiele prac sugeruje związek funkcjonalny pomiędzy acetylacją histonów a transkrypcją to jest prawdopodobne, że regiony chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie też zawierają zmodyfikowane histony (182), różniące się od histonów z regionów transkrybowanych tempem i obszarem acetylacji. Stwierdzono, że można wyróżnić dwie klasy acetylowanych histonów. Histony klasy I składają się nie więcej, niż z około 15% każdego z histonów, oprócz H1. Histony te są szybko hiperacetylowane ($t_{1/2}$ — 7 min dla monoacetylowanego H4) i szybko deacetylowane ($t_{1/2}$ — 3 do 7 min). Histony klasy II są deacetylowane z $t_{1/2}$ — 30 min a hiperacetylowane dużo wolniej ($t_{1/2}$ — 200 do 300 min dla monoacetylowanego H4). Couvalt i Chalkley (182) zaproponowali trzy hipotezy tłumaczące występowanie histonów ulegających szybkiemu i wolnemu obrotowi metabolicznemu: hipoteza 1 sugeruje występowanie w cząsteczce histonów specyficznych aminokwasów, które ulegają szybkiej modyfikacji. Np. w łańcuchu polipeptydowym histonu H4 z czterech ulegających modyfikacji aminokwasów trzy acetylują się wolno a jeden szybko. Hipoteza 2 zakłada możliwość powstawania zmian konformacyjnych w cząsteczkach białek histonowych, co może powodować przechodzenie form wolno metabolizowanych histonów w formy szybko metabolizowane i odwrotnie. Hipoteza 3 najlepiej poparta danymi doświadczalnymi postuluje występowanie dwóch oddzielnych klas histonów. Histony należące do każdej z tych klas różnią się zdolnością wiązania enzymów modyfikujących. Histony należące do pierwszej klasy są łatwo dostępne dla enzymów i ulegają szybkiej hiperacetylacji i deacetylacji. Natomiast klasa druga obejmuje histony wykazujące niższe powinowactwo do enzymów katalizujących reakcje modyfikujące.

Zaakceptowano do druku 14.10.1984 r.

PIŚMIENICTWO

1. Phillips D. M. P., (1963), *Biochem. J.*, **87**, 258—263.
2. Allfrey V. G., Faulkner R., Mirsky A. E., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 786—794.
3. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**, 1182—1189.
4. Ehrlich M., Wang R. Y.-H., (1981), *Science*, **212**, 1350—1357.
5. Busslinger M., Hurst J., Flavell R. A., (1983), *Cell*, **34**, 197—206.
6. Gröbner S., (1982), *Post. Biochem.*, **28**, 487—501.
7. Johnson E. M., Allfrey V. G., (1978), w: *Biochemical Actions of Hormones*, red. Litwack G., **5**, 1—51, Acad. Press, New York.
8. Allfrey V. G., (1977), w: *Chromatin and Chromosome Structure*, red. Li H. J., Eckhardt R. A., 167—191, Acad. Press, New York.
9. Goldknopf J. L., Busch H., (1978), w: *The Cell Nucleus*, red. Busch E., **6**, 1949—180, Acad. Press, New York.
10. Dixon G. H., (1976), w: *Organization and Expression of Chromosomes*, red. Allfrey, V. G., Bautz E. K. F., McCarthy B. J., Schimke R. T., Tissieres A., Dahlem Konferenzen, Berlin.
11. Littau V. C., Allfrey V. G., Frenster J. H., Mirsky A. E., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **52**, 93—100.
12. Ruiz-Carrilo A., Wang L. J., Allfrey V. G., (1975), *Science*, **190**, 117—128.
13. Berlowitz L., Pallotta D., (1972), *Exp. Cell Res.*, **71**, 45—48.
14. Burkholder G. D., Weaver M. G., (1975), *Exp. Cell Res.*, **92**, 518—522.
15. Yamamoto K. R., Alberts B. M., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 721—746.
16. Phillips D. M. P., (1968), *Biochem. J.*, **107**, 135—138.
17. Gershey E. L., Vidali G., Allfrey V. G., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5018—5022.
18. Vidali G., Gershey E. L., Allfrey V. G., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 6361—6366.
19. Liew C. C., Haslett G. W., Allfrey V. G., (1970), *Nature*, **226**, 414—417.
20. Marzluff W. F., McCarthy K. S., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5635—5642.
21. Wilhelm J. A., McCarthy K. S. (1970), *Cancer Res.*, **30**, 428—435.
22. Allfrey V. G., (1971), w: *Histones and Nucleohiston*, red. Phillips D. M. P., Plenum Publishing Company, London, 241—294.
23. Berkovic S. F., Mauritzen C. M., (1977), *Biochem. Biophys. Acta*, **475**, 160—167.
24. DeLange R. J., Fambrough D. M., Smith E. L., Bonner J., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5669—5679.
25. Sung M. T., Dixon G. H., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 1616—1623.
26. Nelson D. A., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 1565—1568.
27. Reeves R., Candido E. P. M., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 1947—1964.
28. Candido E. P. M., Dixon G. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3182—3188.
29. Candido E. P. M., Dixon G. H., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 2015—2019.

30. Candido E. P. M., Dixon G. H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3868—3873.
31. Sealy L., Chalkey R., (1978), *Cell*, **14**, 115—121.
32. Jackson V., Shires A., Chalkey R., Granner D. K., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4856—4863.
33. Levy-Wilson B., Watson D. C., Dixon G. H., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **6**, 259—274.
34. Libby P. R., (1972), *Biochem. J.*, **130**, 663—669.
35. Bellard M., Gannon F., Chambon P., (1977), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 779—794.
36. DeLange R. J., Smith E. L., (1971), *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 279—314.
37. Chester A., Yaniv M., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 46—50.
38. Vidali G., Boffa L. C., Mann R. S., Allfrey V. G., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 223—227.
39. Moss T., Stephens R. M., Crane-Robinson C., Bradbury E. M., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 2477—2485.
40. Kornberg R. D., (1977), *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 913—955.
41. Jackson V., Shires A., Tanphaichitr N., Chalkley R., (1976), *J. Mol. Biol.*, **104**, 471—483.
42. Wangh L., Ruiz-Carrilo A., Allfrey V. G., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 44—46.
43. Louie A. J., Dixon G. H., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 1975—1979.
44. D'Anna J. A., Tobey R. A., Barham S. S., Curley L. R., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 187—194.
45. Gorovski M. A., Pleger G. L., Keevert J. B., Johmann C. A., (1973), *J. Cell Biol.*, **57**, 773—781.
46. Bode J., Henco K., Wingender E., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **110**, 143—152.
47. Simpson R. T., (1978), *Cell*, **13**, 691—699.
48. Gomez-Lira M. M., Bode J., (1981), *FEBS Lett.*, **127**, 228—233.
49. Oberhauser H., Csordas A., Puschendorf B., Grunicke H., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 110—116.
50. Shewmaker C. K., Cohen B. N., Wagner T. E., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 342—349.
51. Bonner J., Carrard W. T., Gottesfeld J., Holmes D. S., Sevell S., Wilkes M., (1973), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **38**, 303—310.
52. Marushige K., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3937—3942.
53. Wong T. K., Marushige K., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2041—2046.
54. Tack L. O., Simpson R. T., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3119.
55. Davie J. R., Candido E. P. M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5962—5966.
56. Simpson R. T., (1971), *Biochemistry*, **10**, 4466—4471.
57. Levy-Wilson B., Gjerset R. A., McCarthy B. J., (1977), *Biochem. Biophys. Acta*, **475**, 168—175.
58. Pantazis P., Bonner W. M., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 4669—4675.
59. Martinage A., Mangeat P., Sautière P., Couppez M., Marchis-Mouren G., Biserte G., (1981), *FEBS Lett.*, **134**, 107—110.
60. Burdick C. J., Taylor B. A., (1976), *Exp. Cell Res.*, **100**, 428—433.
61. Thwaites B. M., Brandt W. F., Von Holt C., (1976), *FEBS Lett.*, **71**, 193—196.

62. Delpech M., Moisand F., Kruh J., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 1561—1568.
63. Marushige K., Marushige Y., Wong T. K., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2047—2053.
64. Wallace R. B., Sargent T. D., Murphy R. F., Bonner J., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 3244—3248.
65. Cohen B. N., Blue W. T., Wagner T. E., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **107**, 511—518.
66. Shewmaker C. K., Wagner T. E., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **107**, 505—511.
67. Dod B., Kervabon A., Parello J., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **121**, 401—405.
68. Ramponi G., Manao G., Carmici G., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2681—2685.
69. Riggs M. G., Whittaker R. G., Neumann J. R., Ingram V. M., (1977), *Nature*, **268**, 462—464.
70. Candido E. P. M., Reeves R., Davie J. R., (1978), *Cell*, **14**, 105—113.
71. Reeves R., Candido E. P. M., (1978), *FEBS Lett.*, **91**, 117—121.
72. Bode J., Arfmann M. A., Szopa J., Wingender E., (1981), *Studia Biophys.*, **81**, 153—154.
73. Causens L. S., Gallwitz D., Alberts B. M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1716—1723.
74. Vidali G., Boffa C., Bradbury E. M., Allfrey V. G., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 2239—2243.
75. Perry M., Nelson D., Moore M., Chalkley R., (1979), *Biochem. Biophys. Acta*, **561**, 517—526.
76. Boffa L. C., Vidali G., Mann R. S., Allfrey V. G., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3364—3366.
77. Hagopian H. K., Riggs M. G., Schwartz L. A., Ingram V. M., (1977), *Cell* **12**, 855—860.
78. Reczek P. R., Weissman D., Müvös P. E., Fasman G. D., (1982), *Biochemistry*, **21**, 993—1002.
79. Rubenstein P., Sealy L., Marshall S., Chalkley R., (1979), *Nature*, **280**, 692—693.
80. Prasad K. N., Sinha P. K., (1976), *In Vitro*, **12**, 125—132.
81. Ginsburg E., Salomon D., Sreevalsan T., Freese E., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2457—2461.
82. Altenburg B. C., Via D. P., Steiner S. H., (1976), *Exp. Cell Res.*, **102**, 223—231.
83. Fishman P. H., Simmons J. L., Brady R. O., Freese E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 292—299.
84. Fiszmann M. Y., Montarras D., Wright W., Gros F., (1980), *Exp. Cell Res.*, **126**, 31—37.
85. Tallman J. F., Smith C. C., Henneberry R. C., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 873—877.
86. van Wijk R., Tichonicky L., Kruh J., (1981), *In Vitro*, **17**, 859—862.
87. Lough J., (1981), *Cell Biol. Int. Rep.*, **5**, 691—698.
88. Leibovitch M-P., Kruh J., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 896—903.
89. Darzynkiewicz Z., Tragans F., Xue S.-B., Melamed H. R., (1981), *Exp. Cell Res.*, **136**, 279—293.

90. Kitzis A., Tichonicky L., Defer N., Kruh J., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 530—537.
91. Kitzis A., Tichonicky L., Defer N., Kruh J., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**, 833—841.
92. Nelson D., Perry M. E., Chalkley R., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **6**, 561—574.
93. Tichonicky L., Santana-Calderon M. A., Defer N., Giesen E. M., Beck G., Kruh J., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **120**, 427—433.
94. Weingarten D., De Vellis J., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**, 1297—1304.
95. Leder A., Leder P., (1975), *Cell*, **5**, 319—322.
96. D'Anna J. A., Tobey R. A., Gurley L. R., (1980), *Biochemistry*, **19**, 2656—2671.
97. Ghosh N. K., Cox R. F., (1977), *Nature*, **267**, 435—437.
98. Adolph G. R., Swetly P., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 806—812.
99. Gallwitz D., Sures I., (1972), *Biochem. Biophys. Acta*, **263**, 315—328.
100. Horiuchi K., Fujimoto D., (1972), *J. Biochem. (Tokio)*, **72**, 433—438.
101. Fukushima M., Ota K., Fujimoto D., Horiuchi K., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 1409—1414.
102. Libby P. R., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **203**, 384—389.
103. Nohara H., Takahashi T., Ogata K., (1966), *Biochem. Biophys. Acta*, **561**, 248—260.
104. Nohara H., Takahashi T., Ogata K., (1968), *Biochem. Biophys. Acta*, **154**, 529—539.
105. Libby P. R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 233—237.
106. Allfrey V. G., (1966), *Cancer Res.*, **26**, 2026—2040.
107. Sures I., Gallwitz D., (1980), *Biochemistry*, **19**, 943—951.
108. Belikoff E., Wong L.-J., Alberts B. M., (1980), *J. Biol. Chem.* **255**, 11448—11453.
109. Garcea R. L., Alberts B. M., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11454—11463.
110. Wiegand R. C., Brutlag D. L., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 4578—4583.
111. Cano A., Pestana A., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **97**, 65—72.
112. Pestana A., Sudilovsky O., Pitot H. C., (1971), *FEBS Lett.*, **19**, 83—86.
113. Cousens L. S., Alberts B. M., (1982), *J. Biol. Chem.* **257**, 3945—3949.
114. Inoue A., Fujimoto D., (1970), *Biochem. Biophys. Acta*, **220**, 307—316.
115. Boffa L. C., Gershay E. J., Vidali G., (1971), *Biochem. Biophys. Acta*, **254**, 135—143.
116. Vidali G., Boffa L. C., Allfrey V. G., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7365—7373.
117. Reeves R., Candido E. P. M., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 571—579.
118. Sanders L. A., Schechter H. M., McCarty K. S., (1973), *Biochemistry*, **12**, 783—791.
119. Watson D. C., Wong C. W., Dixon G. H., (1979)? **95**, 193—202.
120. Hay C. W., Candido E. P. M., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 3726—3734.
121. Poupko J., Kostellow A. B., (1977) *Differentiation*, **8**, 167—174.
122. Reeves R., (1976), *Science*, **145**, 529—532.
123. Gottesfeld J. M., Melton D. A., (1978), *Nature*, **273**, 317—319.
124. Lipchitz L., Axel R., (1976), *Cell*, **9**, 355—364.
125. Weintraub H., Groudine M., (1976), *Science*, **193**, 848—856.
126. Garel A., Axel R., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3966—3970.

127. Garell A., Zolan M., Axel R., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 4867—4877.
128. Flint S. J., Weintraub H., (1977), *Cell*, **12**, 783—794.
129. Levy-Wilson B., Dixon G. H., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 883—893.
130. Gottesfeld J. M., Butler P. J. G., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 3155—3173.
131. Sealy L., Chalkley R., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 1863—1876.
132. Mathis D. J., Oudet P., Wasyluk B., Chambon P., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 3523—3547.
133. Schaffhausen B. S., Benjamin T. L., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 1092—1096.
134. Olins A. L., Carlson R. D., Wright E. B., Olins D. E., (1976), *Nucleic Acids Res.*, **3**, 3271—3291.
135. Sanders M. M., (1978), *J. Cell Biol.*, **79**, 97—109.
136. Levy-Wilson B., Dixon G. H., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 4155—4163.
137. Levy-Wilson B., Dixon G. H., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 1682—1686.
138. Nelson D., Perry M., Sealy L., Chalkley R., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 1346—1353.
139. Davie J. R., Candido E. P. M., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 3574—3577.
140. Gottesfeld J. M., (1977), w: *Methods Cell in Biol.*, red. Stein G., **16**, 421—436, Acad. Press, New York.
141. Gottesfeld J. M., Garrard W. T., Bagi G., Wilson R. F., Bonner J., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 2193—2197.
142. Hedrick D., Tolstoshev P., Randlett D., (1977), *Gene*, **2**, 147—158.
143. Perry M., Chalkley R., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 3313—3318.
144. Arrigo A-P., (1983), *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1389—1404.
145. McGhee J. D., Nickol J. M., Felsenfeld G., Rau D. C., (1983), *Nucleic Acids Res.*, **11**, 4065—4075.
146. Perry M., Chalkley R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 7336—7388.
147. Nelson D., Covault J., Chalkley R., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 1745—1763.
148. Pogo B. G. T., Alfrey V. G., Mirsky A. E., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**, 805—812.
149. Kanungo M. S., Thakur M. K., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 266—271.
150. Thakur M. K., Das R., Kanungo M., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 828—832.
151. De Villers Graaff G., Von Holt C., (1973), *Biochem. Biophys. Acta*, **299**, 480—484.
152. McKnight G. S., Hager L., Palmiter R. D., (1980), *Cell*, **22**, 469—477.
153. Pogo B. G. T., Pogo A. O., Alfrey V. G., Mirsky A. E., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **59**, 1337—1344.
154. Sarkander H. J., Fleischer-Lambropoulos H., Brade W. P., (1975), *FEBS Lett.*, **52**, 40—43.
155. Vavra K. J., Allis C. D., Gorovsky M. A., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2591—2605.

156. McGregor J. P., Chen Y. H., Goldstein D. A., Hall M. R., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 814—821.
157. Krause M. V., Stein G. S., (1975), *Exp. Cell Res.*, **92**, 175—190.
158. Ledinko N., (1970), *J. Virol.*, **6**, 58—68.
159. Ruiz-Carrilo A., Wangh L. J., Littau V. C., Allfrey V. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7358—7368.
160. Tobin R. S., Seligy V. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 358—365.
161. Poupko J. M., Kostellow A. B., Mortilli G. A., (1977), *Differentiation*, **8**, 167—174.
162. O'Meara A. R., Pochron S. F., (1979), *Biochem. Biophys. Acta*, **586**, 391—401.
163. Das R., Kanungo M. S., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 708—714.
164. Nelson D., Covault J., Chalkley R., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 1745—1763.
165. Reeves R., Cserjesi P., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4283—4290.
166. Mathew C. G. P., Goodwin G. H., Johns E. W., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **6**, 167—179.
167. Sterner R., Boffa L. C., Vidali G., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3830—3836.
168. Weisbrød S., Groudine M., Weintraub H., (1980), *Cell*, **19**, 289—301.
169. Vidali G., Boffa L. C., Allfrey V. G., (1977), *Cell*, **12**, 409—415.
170. Levy-Wilson B., Conner W., Dixon G. H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 609—620.
171. Gazit B., Ceder H., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5143—5155.
172. Jackson J. B., Pollock J. M., Rill J. M., (1979), **18**, 3739—3749.
173. Seyedin S. H., Pehrson J. R., Cole R. D., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 5988—5998.
174. Weisbrod S., Weintraub H., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.
175. Adler A. J., Fasman G. D., Wang L. J., Allfrey V. G., (1974), **249**, 2911—2914.
176. Schröter H., Gomez-Lira M. M., Plank K-H., Bode J., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **120**, 21—28.
177. Bode J., Henco K., (1980), *Int. J. Biol. Macromol.*, **2**, 122—128.
178. Bode J., Gomez-Lira M. M., Schröter H., (1983), *Eur. J. Bioch.*, **130**, 437—445.
179. Marks D. B., Keller B. J., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 134—139.
180. Nelson D., Perry W. M., Chalkley R., (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 356—363.
181. Holmes D. S., Bonner J., (1974), *Biochemistry*, **13**, 841—848.
182. Covault J., Chalkley R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 9110—9116.

MICHAŁ WITT *

Genetyka molekularna głównego kompleksu zgodności tkankowej

Molecular genetics of the major histocompatibility complex

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Antygeny i geny klasy I
 - II-1. Geny łańcucha ciężkiego
 - II-2. Gen β_2 -mikroglobuliny
- III. Antygeny i geny klasy II
 - III-1. Struktura genów klasy II
 - III-2. Organizacja molekularna mysiego regionu I oraz ludzkiego D
- IV. Białka i geny klasy III
- V. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Class I antigens and genes
 - II-1. Heavy chain genes
 - II-2. β_2 -Microglobulin gene
- III. Class II antigens and genes
 - III-1. Class II genes structure
 - III-2. Molecular organization of murine I region and human D region
- IV. Class III proteins and genes
- V. Final remarks

I. Wstęp

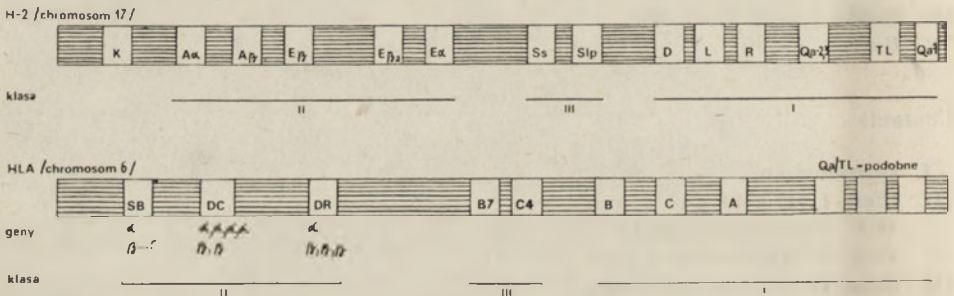
Fragment genomu zawierający informację dla białek powierzchniowych komórek zwierzęcych, odpowiedzialnych za rozróżnianie „swoje—nieswoje” (self-nonsel self recognition) zwany jest głównym kompleksem

*) Dr, Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 30/36, 60-479 Poznań.

Wykaz skrótów: MHC — główny kompleks zgodności tkankowej, H-2 — główny kompleks zgodności tkankowej myszy, HLA — główny kompleks zgodności tkankowej człowieka.

zgodności tkankowej (MHC — major histocompatibility complex). Odpowiedni zespół genów stwierdzony w obrębie chromosomu 17 myszy oznaczono jako H-2, a analogiczny zespół stwierdzony w chromosomie 6 człowieka oznaczono jako HLA (przegląd piśmiennictwa w 1).

Na rycinie 1 przedstawiono schematycznie strukturę głównego kompleksu zgodności tkankowej myszy i człowieka, zaznaczając informacje istotne z punktu widzenia badań molekularnych. Loci MHC i ich produkty dzielone są umownie na trzy klasy. Loci *H-2K*, *H-2D* i *H-2L* myszy oraz *HLA-A*, *HLA-B* i *HLA-C* człowieka kodują klasyczne antygeny transplantacyjne zaliczane do klasy I, zaangażowane bezpośrednio w reakcjach odrzucania przeszczepów. Antygeny te obecne są na powierzchni komórek niemal wszystkich tkanek, z wyłączeniem erytrocytów i plemników (2). Wiadomo, że głównym ich zadaniem jest umożliwienie rozpoznania i zniszczenia przez cytotoksyczne limfocyty T komórek zakażonych wirusem lub komórek zmienionych nowotworowo (1, 2, 3, 4). Do klasy I zaliczane są również antygeny *Qa-1*, *Qa-2*, 3 oraz antygeny *TL* zwane antygenami różnicowania, strukturalnie bardzo podobne do antygenów transplantacyjnych, których występowanie ograniczone jest do niewielkiej podgrupy komórek pochodzenia szpikowego. Ich odpowiednikami u człowieka są tzw. antygeny *Qa/TL*-podobne (*Qa/TL*-like).

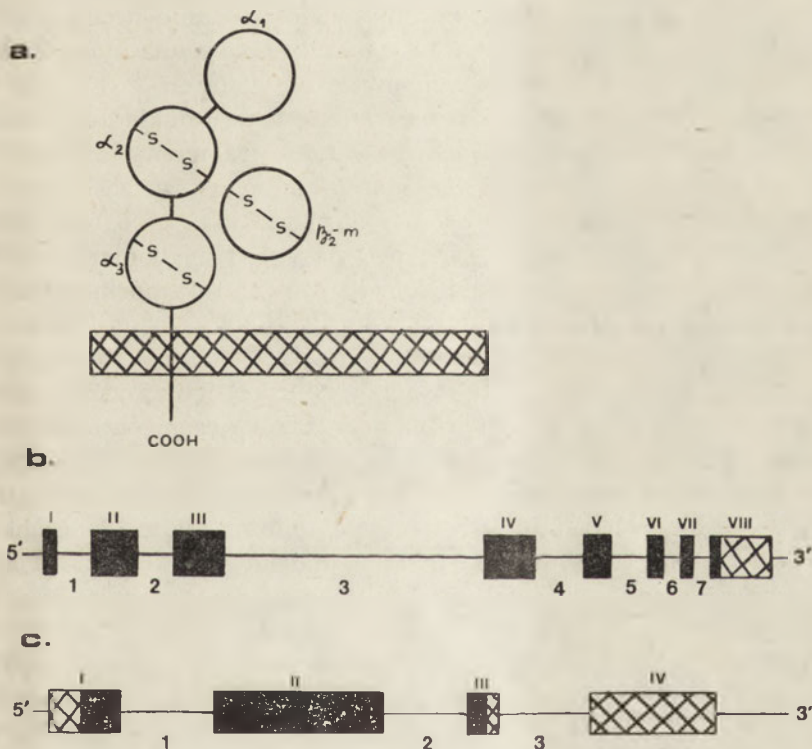


Ryc. 1. Struktura głównego kompleksu zgodności tkankowej H-2 myszy obecnego w 17 chromosomie (A) i HLA człowieka obecnego w 6 chromosomie. W ich obrębie kodowane są antygeny powierzchniowe komórek zaliczane do klasy I (tzw. antygeny transplantacyjne), klasy II oraz białka zaliczane do klasy III (białka osocza krwi i komponenty komplementu). Antygeny klasy II składają się z łańcuchów α i β , kodowanych oddzielnie w obrębie kompleksu.

Mysie antygeny klasy II kodowane są w obrębie regionu I chromosomu 17, z których biochemicznie najlepiej scharakteryzowane są antygeny I-A oraz I-E. Ich odpowiednikami ludzkimi są antygeny HLA-DC i HLA-DR, kodowane w obrębie regionu D chromosomu 6. Podstawową funkcją antygenów klasy II jest pośredniczenie w oddziaływaniach limfocytów T z makrofagami i limfocytami B, koniecznych do zapoczątkowania odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego (produkcja przeciwciał) lub supresji tejże (2, 5, 6). Do klasy III zaliczane są białka będące składnikami komplementu (1, 7), słabiej jak dotąd poznane.

II. Antygeny i geny klasy I

Mysie antygeny H-2K, H-2D i H-2L oraz ludzkie HLA-A, HLA-B i HLA-C, a także pokrewne z nimi antygeny Qa, TL oraz Qa/TL-podobne (Ryc. 1) są glikoproteinami błonowymi, składającymi się z łańcucha ciężkiego o masie cząsteczkowej 47 000 oraz niekowalencyjnie z nim związanej β_2 -mikroglobuliny o masie cząsteczkowej 12 000 (1, 8). Łańcuch ciężki zanurzony jest w błonie komórkowej i w swej części zewnątrzkomórkowej połączony z dwiema złożonymi resztami węglowodanowymi. Łańcuch ciężki pozbawiony reszt cukrowych ma masę cząsteczkową 43 000 (9) i składa się z trzech globularnych domen w części zewnątrzkomórkowej (α_1 , α_2 , α_3), zawierających ok. 90 reszt aminokwasowych każda, fragmentu śród błonowego (ok. 40 reszt aminokwasowych) oraz domeny cytoplazmatycznej (wewnątrzkomórkowej), zawierającej ok. 30 reszt aminokwasowych (10) (Ryc. 2A). Specyficzność antygenową warunkuje część zewnątrzkomórkowa łańcucha ciężkiego, a obecność reszt cukrowych



Ryc. 2. A. Struktura antygeny klasy I. Składa się on z łańcucha ciężkiego, zakotwiczonego w błonie komórkowej (zakratkowany pas) oraz łańcucha β_2 -mikroglobuliny (β_2 -m). α_1 , α_2 , α_3 — globularne domeny zewnątrzkomórkowej części łańcucha ciężkiego. —S—S— mostki dwusiarczkowe. COOH- końcowa grupa karboksylowa. B. Struktura genu łańcucha ciężkiego. Cyframi rzymskimi oznaczono eksony, arabskimi — introny, fragment zakreskowany — region nie ulegający translacji. C. Struktura genu β_2 -mkglobuliny (oznaczenia jak wyżej).

nie ma na nią wpływu (9). Domeny α_2 i α_3 łańcucha ciężkiego zawierają mostki dwusiarczkowe (10).

Metodami serologicznymi stwierdzono, że antygeny transplantacyjne charakteryzują się znacznym polimorfizmem. U myszy wykazano 50—100 różnych alleli mogących występować w loci *H-2K* i *H-2D*, zaś w odpowiednich loci genomu ludzkiego (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) może pojawiać się ok. 30 różnych alleli. Tę różnorodność potęguje także heterozygotyczność genów MHC.

II-1. Geny łańcucha ciężkiego

Informacyjny RNA łańcucha ciężkiego antygenów klasy I ma stałą sedymentacji 17S (11) i występuje w niewielu kopiach w komórce (antygeny zgodności tkankowej stanowią 0.05—0.1% puli białek komórkowych), co poważnie utrudniało jego wydzielenie. Uzyskane preparaty specyficznego mRNA (11, 12, 13, 14) pozwoliły na otrzymanie drogą odwrotnej transkrypcji nici cDNA (15, 16), a te posłużyły jako sonda hybrydyzacyjna do identyfikacji genów kodujących mysie antygeny H-2 (17) oraz ludzkie HLA (18). W pracowni Hooda wyizolowano i dokładnie scharakteryzowano dwa klony bakteryjne zawierające fragmenty mysiego DNA z dwoma genami z obrębu MHC, które jako pierwsze zostały w pełni zsekwencjonowane. Analiza sekwencyjna wykazała, że ogólny schemat budowy łańcucha ciężkiego antygenów klasy I (trzy domeny zewnątrzkomórkowe, część śródbłonowa i domena wewnątrzkomórkowa) ma swe odbicie w organizacji samego genu, zawierającego 8 eksonów oddzielonych 7 intronami (Ryc. 2B). Ekson I koduje łańcuch 21 aminokwasów, spośród których 19 są to aminokwasy hydrofobowe lub obojętne; odcinek ten stanowi sekwencję sygnałową umożliwiającą zakotwiczenie nowosyntetyzowanego antygeny w błonie komórkowej. Eksony II, III i IV kodują zewnątrzkomórkowe domeny α_1 , α_2 i α_3 , ekson V — fragment wewnątrz błonowy, zaś eksony VI, VII i VIII — część cytoplazmatyczną łańcucha ciężkiego (19). Analogiczną budowę ma gen ludzkiego antygeny HLA z tą różnicą, że jego część cytoplazmatyczna kodowana jest przez dwa, a nie trzy, eksony (18).

Obydwa wyizolowane geny mysie (oznaczone 27.1 oraz 27.5) wykazują duże podobieństwo sekwencyjne: eksony są homologiczne w 87%, a introny w 80%, z wyłączeniem 1000-nukleotydowej insercji w intronie 3 genu 27.1 (20). Ta insercja ma charakter transpozonu, czyli elementu ruchomego w genomie, ograniczonego z obu stron wysoce powtarzalnymi sekwencjami należącymi do tzw. rodziny Alu (21). Przy pomocy transformacji (DNA-mediated gene transfer) wykazano, że gen 27.5 koduje cząsteczkę H-2L^d (22), zaś gen 27.1 jest pseudogenem występującym w regionie Qa-2,3 (19). Cząsteczki L^d produkowane przez mysie komórki L trans-

formowane przez gen 27.5 okazały się identyczne pod względem biochemicznym, immunologicznym i funkcjonalnym z cząsteczkami L^d obecnymi na powierzchni komórek śledziony myszy, które użyto jako donory genu 27.5 (22). Tej samej metody użyto do identyfikacji innych genów kompleksu H-2 (17).

Aby zbadać wzajemne położenie poszczególnych genów w kompleksie H-2 sklonowano większy fragment DNA mysiego chromosomu 17. Okazało się, że w obrębie kompleksu H-2 można wyróżnić 13 zespołów genów (clusters) zawierających w sumie 36 oddzielnych genów klasy I (23). Scharakteryzowany odcinek mysiego genomu zawierał 837 tysięcy par zasad DNA mysiego chromosomu 17. Poszczególne zespoły genów wahają się w wielkości od 35 do 191 tysięcy par zasad i zawierają od 1 do 7 genów. Gen 27.1 leży w zespole składającym się z 7 genów — wszystkie geny mają tę samą orientację 5'→3', a więc wszystkie transkrybowane są z tej samej nici DNA (23).

Analiza hybrydyzacyjna i sekwencyjna sklonowanego DNA wykazała, że ekson IV kodujący trzecią domenę zewnątrzkomórkową (α_3) łańcucha ciężkiego (patrz Ryc. 2A i 2B) charakteryzuje się znacznie większą stałością sekwencji niż eksony II i III, kodujące domeny α_1 i α_2 . Jednocześnie stwierdzono znaczną homologię struktury domeny α_3 z częścią stałą łańcucha ciężkiego immunoglobulin. Ta homologia zdaje się wskazywać, że β_2 -mikroglobulina, również konserwatywna i sekwencyjnie homologiczna z immunoglobulinami, oddziałuje z łańcuchem ciężkim w obrębie trzeciej domeny, wytwarzając strukturę III-rzędową typu β , analogiczną z przestrzennym ułożeniem łańcucha ciężkiego oraz łańcucha lekkiego immunoglobulin (24, 25). Domeny α_1 i α_2 są prawdopodobnie zaangażowane w interakcje komórkowe, jak np. rozpoznawanie przez limfocyty T. Homologia sekwencyjna genów immunoglobulin i antygenów klasy I oraz analogie w organizacji eksonów i intronów wskazują na wspólne pochodzenie ewolucyjne rodzin tych genów (24).

Nie jest sprawą ostatecznie rozstrzygniętą ile z 36 wykrytych genów klasy I jest transkrypcyjnie czynnych. Wiadomo, że tylko 6 z nich koduje serologicznie zdefiniowane antygeny powierzchniowe — są to geny H-2K^d, H-2D^d, H-2L^d oraz dwa geny TL (17, 25, 26). Pozostałe są albo nieczynnymi pseudogenami (19), albo kodują jeszcze niezidentyfikowane białka powierzchniowe (np. niepolimorficzne białka, niewykrywalne przy użyciu klasycznych metod serologicznych) lub antygeny różnicowania, których ekspresja ograniczona jest do pewnych tylko stadiów rozwojowych i pewnych tylko tkanek, nie zbadanych pod względem generowania wytwarzania surowic allogenicznych (17). Inną możliwością jest produkcja form cytoplazmatycznych lub wydzielniczych antygenów klasy I. Wiadomo, że pseudogenem jest wspomniany już gen 27.1 (Ryc. 2B), znaleziony w regionie Qa-2,3 kompleksu H-2 (19). Zawiera on przedwczesny kodon terminujący przy końcu eksonu kodującego fragment śródbłonowy (ekson V).

Może to oznaczać, że gen 27.1 koduje niepełną cząsteczkę antygeny, niezawierającą domeny cytoplazmatycznej; uważa się, że taka cząsteczką może być formą wydzielniczą antygeny (24, 27). Nie można tu wykluczyć możliwości, że występuje tu zjawisko tzw. alternatywnego cięcia i łączenia RNA (alternative RNA splicing), pozwalające na uzyskanie dwóch różnych białek na podstawie informacji zawartej w jednym genie, jak to ma miejsce w przypadku syntezy form wyzielniczych lub błonowych łańcucha ciężkiego immunoglobulin (19, 24, 8, 29).

II-2. Gen β_2 -mikroglobuliny

Drugim składnikiem cząsteczki wszystkich antygenów klasy I jest β_2 -mikroglobulina, nieglikozylowane białko o masę cząsteczkowej 12 000, zbudowane z 99—100 aminokwasów, niekowalencyjnie połączone z częścią zewnątrzkomórkową łańcucha ciężkiego (1, 9, 10, 31). Funkcja jaką β_2 -mikroglobulina pełni w cząsteczce antygeny nadal nie jest znana. Jedną z ważnych cech charakterystycznych tego białka jest znaczna międzygatunkowa homologia jego sekwencji. Mimo, że β_2 -mikroglobulina wchodzi w skład wszystkich antygenów klasy I, nie jest ona kodowana w regionie genomu zawierającym główny kompleks zgodności tkankowej. Geny β_2 -mikroglobuliny znaleziono w chromosomie 2 myszy oraz w chromosomie 15 człowieka (33). mRNA kodujący β_2 -mikroglobulinę ma stałą sedymentacji 10S (11, 12, 13, 34) i stanowi 0.03% puli komórkowego mRNA, zaś sama β_2 -mikroglobulina stanowi 0.1% puli białek komórkowych (35). Podobnie jak w przypadku łańcucha ciężkiego (29) stwierdzono, że na matrycy jednego genu β_2 -mikroglobuliny mogą być transkrybowane cząsteczki mRNA różniące się między sobą wielkością 3'-regionu nie ulegającego translacji (36). Produkty syntetyzowane na matrycy takich różnych mRNA mogą mieć różne przeznaczenie (np. asocjacja z łańcuchem ciężkim lub sekwencja).

Sklonowany cDNA β_2 -mikroglobuliny (34) posłużył do wyizolowania i charakterystyki genów kodujących β_2 -mikroglobulinę (37, 38). Analiza hybrydyzacyjna wykazała, że w mysim haploidalnym genomie znajduje się tylko jeden gen β_2 -mikroglobuliny, brak zaś jakichkolwiek pseudogenów i genów o homologii sekwencyjnej większej niż 70% w stosunku do genu β_2 -mikroglobuliny. Sekwencje reprezentowane w dojrzałym mRNA β_2 -mikroglobuliny kodowane są przez 4 eksony oddzielone w genie 3 intronami (Ryc. 2C). Większa część łańcucha polipeptydowego kodowana jest w obrębie eksonu II (aminokwasy 3—95). Aminokwasy 1 i 2 kodowane są łącznie z sekwencją sygnałową w obrębie eksonu I, zaś aminokwasy 96—99 w obrębie eksonu III. Wielkość 5'-regionu nie ulegającego translacji nie jest ustalona.

Dawniej już zwrócono uwagę (39), że struktura I- i II-rzędowa β_2 -mikroglobuliny jest podobna do struktury I- i II-rzędowej domen łańcucha

ciężkiego immunoglobuliny (wielkość ok. 90 reszt aminokwasowych, mostek dwusiarczkowy spinający aminokwasy odległe o 56 pozycji, homologia sekwencyjna do 28%). Podobieństwo takie stwierdzono również, o czym wspomniano już wyżej, między β_2 -mikroglobuliną i domeną α_3 łańcucha ciężkiego antygenów klasy I (24, 40). W związku z tym uzasadnioną wydaje się hipoteza, że geny łańcucha ciężkiego antygenów klasy I, β_2 -mikroglobuliny oraz immunoglobulin wywodzą się z jednego wspólnego genu pierwotnego. Dodatkowych argumentów dostarcza również porównanie struktury samych genów. We wszystkich trzech przypadkach poszczególne eksony kodują funkcjonalne odcinki (domeny) łańcuchów polipeptydowych. Ponadto wszystkie miejsca cięcia i łączenia (splice junctions) na pograniczach ekson/intron wykazują znaczne podobieństwo. Homologia sekwencji tych genów waha się w granicach 50—65%.

Wykazano znaczne podobieństwo międzygatunkowe β_2 -mikroglobuliny (1). Sekwencja aminokwasowa β_2 -mikroglobuliny mysiej i ludzkiej wykazuje homologię w 68% (41), a sekwencje nukleotydowe odpowiednich regionów kodujących nawet w 72%. Największe podobieństwo ma miejsce w obrębie eksonu III, gdzie stwierdzono homologię w 95% (37).

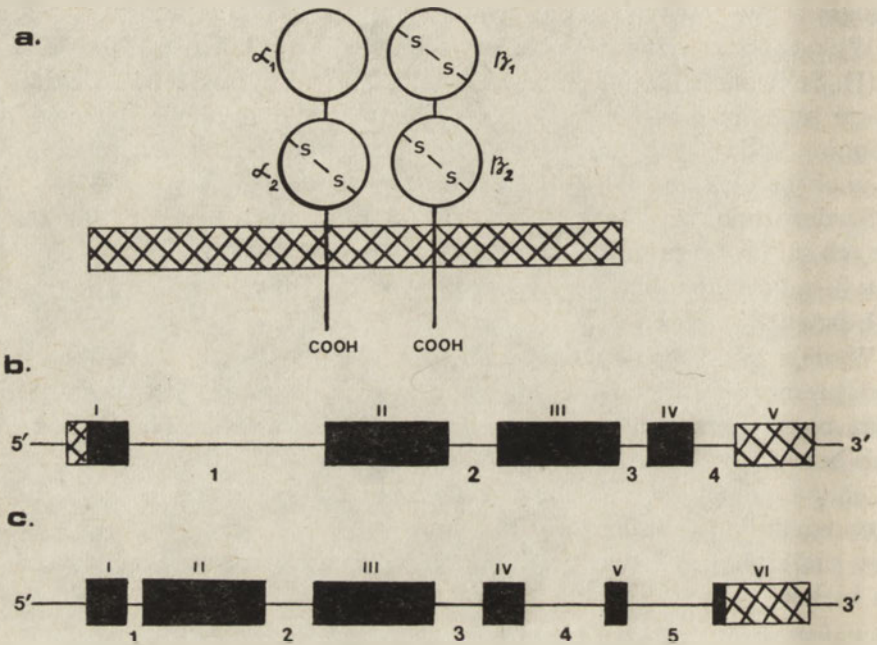
Stwierdzono, że defekt genetyczny w mutantach mysich linii komórkowych, nie wykazujących ekspresji antygenów H-2 i TL, polega na braku genu β_2 -mikroglobuliny, przy zachowanych i czynnych transkrypcyjnie genach łańcuchów ciężkich (37).

Wydaje się, że pojedynczy gen β_2 -mikroglobuliny „obsługuje” swym produktem wszystkie znane antygeny klasy I, podobnie jak produkowana przez pojedynczy gen podjednostka α wchodząca w skład czterech różnych hormonów białkowych (HGT, TSH, FSH i LH) i łącząca się z różnymi, choć ewolucyjnie ze sobą pokrewnymi podjednostkami β (42). Różnica w wielkości polimorfizmu strukturalnego β_2 -mikroglobuliny i łańcuchów ciężkich jest łatwo wytłumaczalna poprzez różnicę w ilości genów obu białek.

III. Antygeny i geny klasy II

Scharakteryzowano dwie grupy mysich antygenów Ia, kodowanych w obrębie podregionów I-A i I-E. Tak cząsteczki I-A, jak i I-E składają się z dwóch podjednostek glikoproteinowych. Łańcuchy ciężki ($A\alpha$) i lekki ($A\beta$) antygenów I-A mają masę cząsteczkową odpowiednio 35 000 i 26 000, zaś analogiczne łańcuchy antygenów I-E: 32 000 ($E\alpha$) i 29 000 ($E\beta$). Ich ludzkie odpowiedniki stanowią antygeny HLA-DC i HLA-DR (5, 6, 43, 44). Zarówno łańcuch α , jak i β zbudowany jest z 229 aminokwasów. Część zewnątrzkomórkowa łańcucha α zawiera 191 aminokwasów, część wewnątrzkomórkowa 23 wyłącznie hydrofobowe aminokwasy, zaś do cytoplazmy zwrócona jest część łańcucha składająca się z 15 aminokwasów (45). Analogicznie, odpowiednie części łańcucha β zawierają: 198, 21 i 10 aminokwa-

sów (46). Część zewnątrzkomórkowa obu łańcuchów antygenów HLA-DR dzieli się na dwie domeny, z których w łańcuchu β obydwie zawierają mostki dwusiarczkowe, zaś w łańcuchu α tylko druga z nich (47) (Ryc. 3A). W związku z faktem, że tylko łańcuchy β wykazują znaczny polimorfizm struktury przyjmuje się, że właśnie one zawierają determinanty antygenowe stanowiące o specyficzności danego antygeny (47). Polimorfizm ten pochodzi wyłącznie ze zróżnicowania struktury łańcuchów polipeptydowych, gdy boczne reszty cukrowe i kwas sjałowy nie mają w nim swego udziału (48, 49). Wykazano, że łańcuchy β mogą różnić się strukturą nawet w obrębie komórek o tej samej specyficzności serologicznej antygenów DR (50).



Ryc. 3. A. Struktura antygeny klasy II. Składa się on z łańcucha ciężkiego α i łańcucha lekkiego β . Oba zakotwiczone są w błonie komórkowej (zakratkowany pas). α_1 , α_2 — globularne domeny zewnątrzkomórkowej części łańcucha α . β_1 , β_2 — globularne domeny zewnątrzkomórkowej części łańcucha β . —S—S— mostki dwusiarczkowe. COOH— końcowa grupa karboksylowa. B. Struktura genu łańcucha α . C. Struktura genu łańcucha β . Cyframi rzymskimi oznaczono eksony, arabskimi — introny, fragment zakreskowany — region nie ulegający translacji.

Wykryto również trzeci łańcuch, oznaczany u ludzi $DR\gamma$, u myszy Ii. Ten nie polimorficzny łańcuch nie pojawia się na powierzchni komórki, a prawdopodobnie łącząc się z łańcuchami α i β w obrębie retikulum endoplazmatycznego umożliwia ich właściwe wzajemne interakcje i wewnątrzkomórkowy transport poprzez aparat Golgiego do powierzchni komórki (5, 51).

III-1. Struktura genów klasy II

Porównując sekwencje genomowe i odpowiadające im sekwencje cDNA ustalono, że zarówno mysie geny łańcuchów ciężkich $E\alpha$ (52), jak i ludzkie $DR\alpha$ (53, 54, 55) składają się z pięciu eksonów oddzielonych czterema intronami (Ryc. 3B). Jak bywa i w przypadku innych genów (56), ekson I koduje 5'-region nie ulegający translacji, sekwencję sygnałową i dwa pierwsze aminokwasy domeny α_1 . Eksony II i III kodują dwie zewnątrzkomórkowe domeny α_1 i α_2 . Ekson IV zawiera informację dotyczącą trzech elementów strukturalnych łańcucha ciężkiego: krótkiego peptydu łączącego domenę α_2 z fragmentem śródbłonowym, fragment śródbłonowy i krótką domenę cytoplazmatyczną. Ekson V zawiera sekwencję kodującą 3'-region nie ulegający translacji, znajdujący w dojrzałym mRNA. Zgrupowanie informacji dotyczących różnych elementów strukturalnych w eksonie IV różni się od organizacji genów klasy I (18, 19). Wykazano też (52), że ekspresja genu $E\alpha$ nie wymaga przegrupowania genu, tak jak ma to miejsce w wypadku immunoglobulin (28, 57).

Porównanie sekwencji genów $E\alpha$ i $DR\alpha$ ujawnia znaczną homologię w obrębie eksonów (75—80%) i znacznie mniejszą homologię pomiędzy intronami. 3'-regiony nie ulegające translacji również różnią się znacznie od siebie (52). Z porównania sekwencji łańcuchów polipeptydowych $E\alpha$ i $DR\alpha$ wynika, że domeny α_1 i α_2 wykazują homologię w 80% i 84%. Najbardziej różnią się od siebie domeny cytoplazmatyczne (zaledwie 53% homologii) (52).

Analiza sekwencji klonów cDNA i klonów genomowych mysiego genu $A\alpha$ (58) wykazała znaczną homologię domeny α_2 z immunoglobulinami.

Znaczne podobieństwo wykazują również geny łańcuchów lekkich: mysie geny $A\beta$ (54) i ludzkie $DR\beta$ (46, 59). Składają się one z 6 eksonów, oddzielonych 5 intronami (Ryc. 3C). Ekson I koduje peptyd sygnałowy i pierwsze 5 aminokwasów, eksony II i III — zewnątrzkomórkowe domeny β_1 i β_2 , ekson IV — fragment wewnątrzłonowy, ekson V — część domeny cytoplazmatycznej, ekson VI — pozostałą część domeny cytoplazmatycznej i 3'-region nie ulegający translacji.

Sekwencje aminokwasowe łańcuchów $A\beta$ i $DR\beta$ wykazują 75% homologii. Fragmentami najbardziej różniącymi się są odcinki łączące domeny β_1 i β_2 obu łańcuchów (59). Uderzającą różnicę stanowi 9 dodatkowych aminokwasów w domenie wewnątrzkomórkowej mysiego łańcucha I- $A\beta$, kodowanych przez oddzielny ekson (Ryc. 3C, ekson V). Można przypuszczać, że różne formy mysiego I- $A\beta$ mRNA mogą powstawać przez wycięcie sekwencji odpowiadającej eksonowi V (alternatywne cięcie-łączenie), analogicznie jak postuluje się to dla antygenów klasy I (19) (patrz też podrozdział II-1). Możliwe też, że w procesie ewolucji ekson V uległ delecji w ludzkim genie $DR\beta$ (59).

III-2. Organizacja molekularna mysiego regionu I oraz ludzkiego D

Mysi region I dzielony jest zwykle przez immunogenetyków na 5 podregionów: I-A, I-B, I-J, I-E oraz I-C (5). Obecnie znane są wyniki pierwszej pełnej analizy zbioru klonów genomowych zawierającego sumarycznie odcinek o długości ok. 200 tys. par zasad, odpowiadający kompletnemu regionowi I mysiego chromosomu 17 (60). Stwierdzono następującą kolejność genów kodujących antygeny klasy II (w porządku od centromeru do telomeru): *A α* , *A β* , *E β* , *E α* . Trzy pierwsze z nich kodowane są w obrębie podregionu I-A, ostatni w obrębie I-E. Gen *E α* ma orientację 5'→3' przeciwną do pozostałych zidentyfikowanych genów klasy II. Pomiędzy genami *E β* i *E α* stwierdzono obecność jeszcze jednego genu, oznaczonego *E β ₂*, który odpowiada prawdopodobnie ludzkiemu genowi *DC β* . W sumie genom myszy szczepu BALB/c zawiera 2 geny α i 4—6 genów β . Kwestią sporną jest rozmieszczenie podregionów I-B i I-J, które na wszystkich mapach genetycznych lokowane były pomiędzy podregionami I-A i I-E. Analiza mapy molekularnej mysiego regionu I sugeruje, że I-B i I-J mogą wcale nie istnieć lub że kodowane mogą być poza regionem I. Nie wyklucza się też możliwości, że dwa serologicznie zdefiniowane produkty genu I-J (tzw. supresorowe czynniki T (61)), mogą być identyczne z polipeptydami *E β* , antygenowo różnymi od tych ostatnich dzięki odmiennym modyfikacjom postranslacyjnym (np. glikozylacja), albo też mogą powstawać w wyniku alternatywnego cięcia-łączenia mRNA transkrybowanego z eksonów zawartych w obrębie podregionów I-A i I-E (60).

O ile liczba sekwencji kodujących w obrębie mysiego regionu I odpowiada w przybliżeniu serologicznie ocenionej ilości ich produktów, o tyle ludzki region D wydaje się bardziej skomplikowany (62). W jego obrębie zidentyfikowane zostały trzy loci, zmapowane w różnych podregionach: *SB* (63), *DC* (64) (prawdopodobnie identyczny z opisanym przez innych autorów locus *DS* (43)) i *DR* (6), z których każdy koduje łańcuchy α i β antygeny powierzchniowego o tej samej nazwie (Ryc. 1). Dotychczas wyizolowano klony cDNA i klony genomowe genów łańcuchów α i β antygenów *DR* i *DC* oraz klon cDNA genu *SBA* (65). Stwierdzono, że haploidalny genom ludzki zawiera co najmniej 5—6 genów łańcuchów ciężkich α : jeden *DR α* , 3—4 *DC α* i jemu pokrewnych (hybrydujących z odcinkiem cDNA *DC α* , tzw. *DX α*) oraz jeden *SBA* (66). Tak znaczna różnica w liczbie genów łańcuchów α człowieka i myszy zdaje się wskazywać, że duplikacje w obrębie regionu D miały miejsce już po ewolucyjnym rozdzieleniu linii rozwojowych myszy i człowieka. Analiza mutantów delecyjnych komórek ludzkich wskazuje też, że geny łańcuchów α nie występują w postaci zespołu, ale są raczej szeroko rozrzucone w obrębie regionu HLA na krótkim ramieniu chromosomu 6.

Wykazano również, że w genomie ludzkim znajduje się przynajmniej 6 genów łańcucha β : trzy *DR β* , dwa *DC β* i co najmniej jeden *SB β* (49, 65,

67). Biorąc pod uwagę znaczny polimorfizm struktury łańcuchów β oszacowano teoretycznie, że zarówno genom ludzki (68), jak i myszy (40) może zawierać 20—40 alleli w jednym locus tych genów. Wstępne doniesienia sugerują, że genom myszy zawiera tylko jeden gen *I-A β* (59).

Wyizolowano również geny łańcucha niezmiennego (DR γ u ludzi, Ii u myszy). Stwierdzono, iż geny te ulegają ekspresji wyłącznie w limfocytach B i nie występują ani w chromosomie 6 człowieka, ani też w chromosomie 17 myszy (65).

IV. Białka i geny klasy III

Do klasy III należą kodowane w obrębie ludzkiego MHC białka — komponenty dopełniacza C2 (masa cząsteczkowa 117 000), C4 (230 000), C8 (150 000) oraz czynnik B układu properdyny (Bf, masa cząsteczkowa 100 000) (7). U myszy odpowiadają im białka Ss i Slp, które mają masę cząsteczkową 200 000, składają się z trzech kowalencyjnie połączonych łańcuchów polipeptydowych α (masa cząsteczkowa 87 000), β (78 000), γ (33 000) oraz składnik C4 klasycznego toru aktywacji dopełniacza (1).

Jak dotąd wyizolowano klony cDNA i klony genomowe specyficzne dla C4 i Bf. Gen składnika C4 dopełniacza znajduje się w 2—3 kopiach na haploidalny genom ludzki. Ustalono również strukturę genu ludzkiego czynnika B. Jego sekwencja kodująca podzielona jest na 11 eksonów, a reszty aminokwasowe tworzące miejsca aktywne kodowane są w trzech oddzielnych eksonach, podobnie jak w wypadku innych proteaz serynowych (do których Bf się zalicza) (65).

V. Uwagi końcowe

Badania strukturalne genów głównego kompleksu zgodności tkankowej, prowadzone przy użyciu metod rekombinowania DNA *in vitro*, przybliżają nas coraz bardziej do wyjaśnienia molekularnych podstaw funkcji tych antygenów. Opublikowano już pierwsze wyniki doświadczeń nad ekspresją antygenów klasy I (22, 69) i klasy II (67, 70) na powierzchni komórek transformowanych wyizolowanymi genami tych antygenów i wynikające stąd bezpośrednie implikacje funkcjonalne. Ciągłe jeszcze nie rozwiązany problem jest kwestia mechanizmów powodujących tak znaczny polimorfizm strukturalny antygenów klasy I i II. Wydaje się, że sugerowany wcześniej mechanizm zmienności, analogiczny do mechanizmu obserwowanego u *Trypanosoma* (71), nie potwierdza się w przypadku MHC. W zamian proponuje się raczej mechanizm polegający na drobnych zmianach sekwencji odpowiednich genów (zmiany jednego do co najwyżej kilku nukleotydów) (59). Pytaniem ciągle pozostającym bez odpowiedzi jest, w jaki sposób tak drobne zmiany informacji genetycznej

mogą powodować tak znaczne różnice odpowiedzi immunologicznej (40, 65, 72, 73).

Problemem bezpośrednio łączącym się z polimorfizmem jest ewolucja genów MHC. Omawiane w tym artykule na konkretnych przykładach podobieństwa z immunoglobulinami, wydają się nie pozostawiać wątpliwości co do wspólnego pochodzenia genów MHC i immunoglobulin, choć problem ten wymaga ciągle jeszcze ostatecznego wyjaśnienia (24, 40, 65, 72, 74).

Wreszcie sama organizacja molekularna MHC wymaga dalszych badań biochemicznych, które pozwolą na uzupełnienie mapy kompleksu o nowe geny (75, 76, 77), jednoznaczne określenie ilości genów, ich rozmieszczenia w obrębie kompleksu oraz skorelowanie poszczególnych zmapowanych loci z określonymi funkcjami i strukturami białkowymi.

Zaakceptowano do druku 8.10.1984 r.

PIŚMIENICTWO

1. Witt M., (1983), *Post. Biol. Kom.*, **10**, 93—108.
2. Matzinger P., Zamoyska R., (1982), *Nature*, **297**, 628—630.
3. Zinkernagel R. M., Doherty P. C., (1974), *Nature*, **251**, 547—548.
4. Paabo S., Weber F., Kampe O., Schaffner W., Peterson P. A., (1983), *Cell*, **35**, 445—453.
5. Witt M., Wiktorowicz K., (1983), *Immunol. Pol.*, **8**, 157—175.
6. Schackelford D. A., Kaufman J. F., Korman A. J., Strominger J. L., (1982), *Immunol. Rev.*, **66**, 133—187.
7. Horst A., (1979), *Molekularne podstawy patogenezy chorób*, str. 247—259, PZWL, Warszawa.
8. Ploegh H. L., Orr H. T., Strominger J. L., (1981), *Cell*, **24**, 287—299.
9. Witt M., Słomski R., (1983), *Acta Bioch. Polon.*, **30**, 303—310.
10. Coligan J. E., Kindt T. J., Uehara H., Martinko J., Nathenson S. G., (1981), *Nature*, **291**, 35—39.
11. Witt M., Słomski R., Kurpisz M., (1982), *Acta Bioch. Polon.*, **29**, 311—319.
12. Jay G., Ferrini U., Robison E. A., Khoury G., Appella E., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6562—6566.
13. Ploegh H. L., Cannon L. E., Strominger J. L., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2273—2277.
14. Słomski R., Cohen E. P. (1980), *Biochemistry*, **19**, 5659—5664.
15. Kvist S., Breggere F., Rask L., Cami B., Garoff H., Daniel F., Wiman K., Larhammar D., Abastado J. R., Gachelin G., Peterson P. A., Dobberstein B., Kourilsky P., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2771—2776.
16. Sood A. K., Pereira D., Weissman S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 616—620.
17. Goodenow R. S., McMillan, M. Nicolson M., Sher B. T., Eakle K., Davidson N., Hood L., (1982), *Nature*, **300**, 231—237.
18. Malissen M., Malissen B., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 893—895.
19. Steinmetz M., Moore K. W., Frelinger J. G., Sher B. T., Shen F.-W., Boyse E. A., Hood L., (1981), *Cell*, **25**, 683—692.

20. Moore K. W., Sher B. T., Sun Y. H., Eakle K. A., Hood L., (1982), *Science*, **215**, 679—682.
21. Schmid C. W., Jelinek W. R., (1982), *Science*, **216**, 1065—1070.
22. Goodenow R. S., McMillan M., Orn A., Nicolson M., Davidson N., Frelinger J. A., Hood L., (1982), *Science*, **215**, 677—679.
23. Steinmetz M., Winoto A., Minard K., Hood L., (1982), *Cell*, **28**, 489—498.
24. Hood L., Steinmetz M., Goodenow R., (1982), *Cell*, **28**, 685—687.
25. Pease L. R., Nathenson S. G., Leinwand L. A., (1982), *Nature*, **298**, 382—385.
26. Słomski R., Martens C. L., Cohen E. P., (1983), *Cancer Res.*, **43**, 3358—3361.
27. Zuniga M. C., Malissen B., McMillan M., Brayton P. R., Clark S. S., Forman J., Hood L., (1983), *Cell*, **34**, 535—544.
28. Paszewski A., (1982), *Post. Biochem.*, **28**, 175—190.
29. Cosman D., Khoury G., Jay G., (1982), *Nature*, **295**, 73—76.
30. Peterson P. A., Rask L., Lindblom J. B., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 35—39.
31. Rask L., Lindblom J. B., Peterson P. A., (1974), *Nature*, **249**, 833—834.
32. Goding J. W., (1981), *J. Immunol.*, **126**, 1644—1666.
33. Goodfellow P. N., Jones E. A., Van Heyningen V., Solomon E., Bobrow M., Miggiano V., Bodmer W. F., (1975), *Nature*, **254**, 267—269.
34. Lingappa V. R., Cunningham B. A., Jazwinski S. M., Hopp T. P., Blobel G., Edelman G. M., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3651—3655.
35. Parnes J. R., Velan B., Felsenfeld A., Ramanathan L., Ferrini U., Appella E., Seidman J. G., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2235—2257.
36. Parnes J. R., Robison R. R., Seidman J. G., (1983), *Nature*, **302**, 449—452.
37. Parnes J. R., Seidman J. G., (1982), *Cell*, **29**, 661—669.
38. Suggs S. V., Wallace R. B., Hirose T., Kawashima E. H., Itakura K., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6613—6617.
39. Peterson P. A., Cunningham B. A., Berggard I., Edelman G. M., (1972), **69**, 1697—1701.
40. Robertson M., (1982), *Nature*, **297**, 629—632.
41. Gates F. T. III, Coligan J. E., Kindt T. J., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 554—558.
42. Fiddes J. C., Goodman H. M., (1981), *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 3—18.
43. Goyert S. M., Shively J. E., Silver J., (1982), *J. Exp. Med.*, **156**, 550—565.
44. Bono M., Strominger J., (1982), *Nature*, **299**, 836—838.
45. Larhammar D., Gustaffson K., Claesson L., Bill P., Wiman K., Schenning L., Sundelin J., Widmark E., Peterson P. A., Rask L., (1982), *Cell*, **30**, 152—161.
46. Larhammar D., Schenning L., Gustaffson K., Wiman K., Claesson L., Rask L., Peterson P. A., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3687—3691.
47. Kaufman J. E., Strominger J. L., (1982), *Nature*, **297**, 694—697.
48. Charron D. J., McDevitt H. O., (1980), *J. Exp. Med.*, **152**, 18s—36s.
49. Wake C. T., Long E. O., March B., *Nature*, **300**, 372—374.

50. Groner J. P., Watson A. J., Bach F. H., (1983), *J. Exp. Med.*, **157**, 1687—1691.
51. Kvist S., Wiman K., Claesson L., Peterson P. A., Dobberstein B., (1982), *Cell*, **29**, 61—69.
52. Mathis D. J., Benoist C. O., Williams II V. E., Kanter M. R., McDevitt H. O., (1983), *Cell*, **32**, 745—754.
53. Lee J. S., Trowsdale J., Travers P. J., Carey J., Grosveld F., Jenkins J., Bodmer W. F., (1982), **299**, 750—752.
54. Das H., Lawrence S., Weissman S., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3543—3547.
55. Korman A., Auffray C., Schambeck A., Strominger J., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6013—6017.
56. Breathnach R., Chambon P., (1981), *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 349—383.
57. Adams J., (1980), *Immunol. Tod.*, **1**, 10—17.
58. Benoist C., Mathis D., Kanter M., Williams V., McDevitt H., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 534—538.
59. Long E. O., Wake C. T., Strubin M., Gross N., Accolla R. S., Carrel S., Mach B., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7465—7469.
60. Steinmetz M., Minard K., Horvath S., McNicholas J., Srelinger J., Wake C., Long E., Mach B., Hood L., (1982), *Nature*, **300**, 35—42.
61. Brunswick M., Sainis K. B., Bromberg J., Lake P., (1982), *J. Immunol.*, **129**, 698—703.
62. Hurley C. K., Giles R. C., Capra J. D., (1983), *Immunol. Tod.*, **4**, 219—232.
63. Shaw S., Johnson A. H., Shaerer G. M., (1980), *J. Exp. Med.*, **152**, 565—580.
64. Tosi R., Tanigaki N., Centis D., Ferrara G. B., Pressman D., (1978), *J. Exp. Med.*, **148**, 1592—1611.
65. Lee J., Trowsdale J., (1983), *Nature*, **304**, 214—215.
66. Auffray C., Kuo J., DeMars R., Strominger J. L., (1983), *Nature*, **304**, 174—177.
67. Roubourdin-Combe C., Mach B., (1983), *Nature*, **303**, 670—674.
68. Wiman K., Larhammar D., Claesson L., Gustaffson K., Schenning L., Bill P., Bohme J., Denaro M., Dobberstein B., Hammerling U., Kvist S., Servenius B., Sundelin J., Peterson P. A., Rask L., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1703—1707.
69. Mellor A. L., Golden L., Weiss E., Bullman H., Hurst J., Simpson E., James R. F. L., Townsend A. R. M., Taylor P. M., Schmidt W., Ferluga J., Leben L., Santamaria M., Atfield G., Festenstein H., Flavell R. A., (1982), *Nature*, **298**, 529—534.
70. Malissen B., Steinmetz M., McMillan M., Pierres M., Hood L., (1983), *Nature*, **305**, 440—443.
71. Borst P., Cross G. A. N., (1982), *Cell*, **29**, 291—297.
72. Marx J. L., (1982), *Science*, **216**, 400—402.
73. Evans G. A., Margulies D. H., Shykind B., Seidman J. G., Ozato K., (1982), *Nature*, **300**, 755—757.
74. Soloski M. J., Uhr J. W., Vitetta E. S., (1982), *Nature*, **296**, 759—761.
75. Watson A. J., DeMars R., Trowbridge I. S., Bach F. H., (1983), *Nature*, **304**, 358—361.
76. Orr H. T., DeMars R., (1983), *Nature*, **302**, 534—536.
77. Margulies D. H., Evans G. A., Flaherty L., Seidman J. G., (1982), *Nature*, **295**, 168—170.

EWA ZIĘTKIEWCZ *, RYSZARD SŁOMSKI **

Komórkowe antygeny rybonukleoproteinowe

Cellular ribonucleoprotein antigens

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Autoprzeciwciała
 - II-1. Wiadomości ogólne
 - II-2. Specyficzność autoprzeciwciała
 - II-3. Izolowanie monospecyficzných autoprzeciwciała
- III. Wykorzystanie autoprzeciwciała do izolowania komórkowych antygenów rybonukleoproteinowych
- IV. Antygenowe kompleksy rybonukleoproteinowe
 - IV-1. Rybonukleoproteinowe kompleksy tworzące antygeny Sm i (U1)RNP
 - IV-1.1. Lokalizacja w komórce i wzajemne powiązanie antygenów Sm i (U1)RNP
 - IV-1.2. RNA w antygenach Sm i (U1)RNP
 - IV-1.3. Białka w antygenach Sm i (U1)RNP
 - IV-1.4. Determinanty antygenowe Sm i (U1)RNP na kompleksach UsnRNP
 - IV-1.5. Struktura przestrzenna antygenowych UsnRNP
 - IV-1.6. Związek UsnRNP ze strukturami jądrowymi
 - IV-1.7. Funkcja antygenowych UsnRNP
 - IV-2. Kompleksy rybonukleoproteinowe wchodzące w skład antygenów Ro i La
 - IV-2.1. Lokalizacja w komórce i wzajemne powiązanie antygenów Ro i La
 - IV-2.2. Kompleksy rybonukleoproteinowe Ro scRNP
 - IV-2.3. Kompleksy rybonukleoproteinowe wchodzące w skład antygeny La

*Mgr **)Dr hab. Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 30/36, 60-479 Poznań

Wykaz skrótów: RNP — kompleks rybonukleoproteinowy; snRNA — niskocząsteczkowe jądrowe RNA; snRNP — niskocząsteczkowe jądrowe RNP; scRNA — niskocząsteczkowe cytoplazmatyczne RNA; scRNP — niskocząsteczkowe cytoplazmatyczne RNP; hnRNA — heterogenny jądrowy RNA; hnRNP — heterogenny jądrowy RNP; pre-mRNA — prekursorowy mRNA; SLE — toczeń układowy; PM — zapalenie wielomięśniowe; DM — zapalenie skórno-mięśniowe; PSS — twardzina uogólniona; MCTD — mieszana kolagenoza; RA — reumatoidalne zapalenie stawów; SS — zespół Sjögrena; ANA — przeciwciała przeciwjądrowe; IgG, IgA lub IgM — immunoglobuliny klasy A, G lub M; VAI RNA, VAII RNA — adenowirusowe RNA; EBER1, EBER2 — RNA kodowane przez wirusa Epstein-Barr

IV-2.3.1. Budowa LaRNP**IV-2.3.2. Funkcja antygenowych LaRNP****IV-2.4. Inne antygenowe niskocząsteczkowe RNP****V. Uwagi końcowe***Contents*

- I. Introduction**
- II. Autoantibodies**
 - II-1. General informations**
 - II-2. Specificity of autoantibodies**
 - II-3. Isolation of monospecific autoantibodies**
- III. Application of autoantibodies to the isolation of cellular ribonucleoprotein antigens**
- IV. Ribonucleoprotein complexes as antigens**
 - IV-1. Ribonucleoprotein complexes of Sm and (U1)RNP antigens**
 - IV-1.1. Cellular localization and interrelations of Sm and (U1)RNP antigens**
 - IV-1.2. RNA in Sm and (U1)RNP antigens**
 - IV-1.3. Proteins in Sm and (U1)RNP antigens**
 - IV-1.4. Antigenic determinants Sm and (U1)RNP on UsnRNP complexes**
 - IV-1.5. Three-dimensional structure of antigenic UsnRNP**
 - IV-1.6. Relation between UsnRNP and substructures of nucleus**
 - IV-1.7. Function of antigenic UsnRNP**
 - IV-2. Ribonucleoprotein complexes in Ro and La antigens**
 - IV-2.1. Cellular localization and interrelations of the Ro and La antigens**
 - IV-2.2. Ro-scRNP ribonucleoprotein complexes**
 - IV-2.2.1. Ribonucleoprotein complexes of La antigen**
 - IV-2.3.1. Structure of LaRNP**
 - IV-2.3.2. Function of antigenic LaRNP**
 - IV-2.4. Other small RNP as antigens**
- V. Final remarks**

I. Wprowadzenie

Kompleksy niskocząsteczkowych RNA z białkami występują powszechnie w jądrach komórkowych (ang. small nuclear ribonucleoproteins — snRNP) i cytoplazmie komórek eukariotycznych (ang. small cytoplasmic ribonucleoproteins — scRNP). Dzielą się one na odrębne klasy, występują w komórce w dużej liczbie kopii, są stabilne metabolicznie i konserwatywne ewolucyjnie. Wzrost zainteresowania niskocząsteczkowymi RNP w ostatnich latach jest wynikiem stwierdzenia udziału tych kompleksów w procesie dojrzewania pierwotnych transkryptów mRNA. Niskocząsteczkowe RNP znane są równocześnie jako antygeny rozpoznawane przez specyficzne przeciwciała wytwarzane w niektórych chorobach tkanki łącznej. Poznanie struktury i funkcji antygenów rybonukleoproteinowych powinno przyczynić się do zrozumienia dotąd słabo poznanej patogenyzy cho-

rób autoimmunizacyjnych. Z drugiej strony, przeciwciała przeciw niskocząsteczkowym kompleksom rybonukleoproteinowym stanowią dogodną sondę w badaniach biochemicznych dotyczących snRNP lub scRNP.

Obszerna wiedza dotycząca niskocząsteczkowych RNA wchodzących w skład cząstek rybonukleoproteinowych, doczekała się licznych opracowań zarówno w piśmiennictwie zagranicznym (1—5) jak i polskim (6, 7). Wśród nich prace Jaruzelskiej i Słomskiego w *Postęпах Biochemii* dotyczące struktury i funkcji (6) oraz kodowania (7) snRNA. W piśmiennictwie krajowym brak jest natomiast przeglądu wiadomości na temat niskocząsteczkowych kompleksów rybonukleoproteinowych (8, 9), ich struktury, funkcji, antygenowego charakteru oraz reakcji z autoprzeciwciałami. Praca niniejsza ma na celu przedstawienie obecnego stanu wiedzy na powyższy temat.

II. Autoprzeciwciała

II-1. Wiadomości ogólne

Wytwarzanie przeciwciał przeciw składnikom własnego organizmu jest charakterystyczną cechą chorób autoimmunizacyjnych. Do tego rodzaju schorzeń należą kolagenozy, czyli układowe choroby tkanki łącznej: toczeń układowy (SLE — ang. systemic lupus erythematoses), zapalenie wielomięśniowe (PM — ang. polymyositis), zapalenie skórno-mięśniowe (DM — ang. dermatomyositis), twardzina uogólniona (PSS — ang. progressive systemic sclerosis), mieszana kolagenoza (MCTD — ang. mixed connective tissue disease), a także pokrewne kolagenozom choroby reumatyczne: reumatoidalne zapalenie stawów (RA — ang. rheumatoid arthritis) i zespół Sjögrena (SS — ang. Sjögren syndrom).

Do najbardziej charakterystycznych autoprzeciwciał wytwarzanych w chorobach tkanki łącznej należą przeciwciała reagujące ze składnikami jądra komórkowego (ANA — ang. antinuclear antibodies), klasy IgG, rzadziej IgM lub IgA (10). Antygenami rozpoznawanymi przez autoprzeciwciała przeciwjądrowe mogą być cząsteczki DNA (zarówno dwuniciowego jak i jednoniciowego (11, 12, 13), RNA (13, 14), białka histonowe i niehistonowe (15, 16, 17), a także kompleksy DNA z białkami (13, 15, 18).

W latach 1966—1974 wykryto cztery klasy komórkowych antygenów rybonukleoproteinowych (RNA-białko), rozpoznawanych przez autoprzeciwciała klasy IgG (16, 17, 19—24), a mianowicie Sm, (U1)RNP (dawniej nazywany antygenem RNP), La (syn. SS-B lub Ha) oraz Ro (syn. SS-A). Antygeny rybonukleoproteinowe występują w postaci odrębnych kompleksów złożonych z niskocząsteczkowych RNA — jądrowych lub cytoplazmatycznych — związanych z białkami niehistonowymi.

Wytworzone kompleksy antygen:autoprzeciwciało można wykryć za-

równy w surowicy (22) jak i w niektórych tkankach (nerki, granica skórno-naskórkowa) (10), w których są one odkładane. Ponadto, w badaniach prowadzonych w układzie *in vitro* stwierdzono, że — wbrew powszechnie przyjętej opinii o nieprzenikaniu przeciwciał do żywych komórek — autoprzeciwciała anty-(U1)RNP mogą być pobierane przez żywe, jednojądrzaste komórki (limfocyty i makrofagi) (25). Autoprzeciwciała anty-(U1)RNP są pobierane za pośrednictwem występujących na powierzchni komórek receptorów fragmentu Fc immunoglobulin, po czym są transportowane do jądra, gdzie tworzą kompleksy z obecnymi tam jądrowymi antygenami (U1)RNP. Badania immunofluorescencyjne prowadzone *in vivo* u osób chorych na MCTD (z wysokim mianem przeciwciał anty-(U1)RNP w surowicy) potwierdziły obecność takich kompleksów w jądrach komórek jednojądrzastych (25).

II-2. Specyficzność autoprzeciwciał

Profil wytwarzania autoprzeciwciał specyficznych wobec poszczególnych antygenów komórkowych, jak również częstość występowania określonych autoprzeciwciał, są odmienne w różnych jednostkach chorobowych. Z danych zebranych w tabeli 1 (9, 10, 26, 131, 132) wynika, że u cho-

Tabela 1

Występowanie przeciwciał przeciw antygenom komórkowym w chorobach reumatycznych (9, 10, 26, 131, 132)

| Przeciwciała przeciw antygenowi | Choroba | Częstość występowania autoprzeciwciał (%) | |
|--|--------------------|---|--------|
| natywny DNA (dwuniciowy i jednoniciowy) | SLE | 50—60 | |
| jednoniciowy DNA (ssDNA) | SLE | 50—60 | |
| jąderekowy RNA (4—6S) | PSS, SS | 20—25 | |
| białka histonowe | SLE | 25—30 | |
| | RA | 20 | |
| białko chromosomalne Scl-70 (syn. Scl-1) | PSS | 15—18 | |
| białko centromeru | PSS (marker) | 8 | |
| glikoproteina Mi-1 | DM | 87 | |
| RNP | Sm | SLE (marker) | 25—30 |
| | (U1)RNP (syn. RNP) | MCTD (marker), | 95—100 |
| | | SLE | 25—40 |
| | | RA | 10 |
| | | PSS | 20 |
| | SS-B (syn. La, Ha) | SS (marker) | 60 |
| | | SLE | 10—15 |
| | SS-A (syn. Ro) | SS (marker) | 70 |
| | SLE | 30—40 | |

rych na SLE mogą występować autooprzeciwiacila o kaźdej z wymienionych specyficznosci, chociaź występują one nie we wszystkich przypadkach i nie zawsze równocześnie. Autooprzeciwiacilo anty-Sm spotykane jest wyłącznie w surowicy chorych na SLE (9, 27, 28) i jest przeciwiacilem markerowym dla SLE, ale występuje tylko w 25—30% przypadków tej choroby. Jego obecność w surowicy jest więc warunkiem wystarczającym, chociaź niekoniecznym dla zaliczenia danego przypadku do SLE. W mieszanej kolagenozie (MCTD) specyficznosc autooprzeciwiacił występujących w surowicy jest ograniczona do anty-(U1)RNP oraz anty-ssDNA (anty-jednoniciowy DNA). Autooprzeciwiacilo anty-(U1)RNP występuje w surowicy prawie wszystkich chorych na MCTD (9, 27, 29). Jego obecność w surowicy nie wystarcza jednak, aby dany przypadek można było zaliczyć do MCTD, gdyż autooprzeciwiacila o tej specyficznosci występują również w surowicy chorych z zespołem Sjögrena, PSS lub SLE (27, 29, 131).

Jak wynika z powyższych rozważań, ewentualne diagnozowanie chorób reumatycznych (chorób tkanki łącznej) na podstawie badań serologicznych wymagałoby przebadania nie jednej, lecz szeregu specyficznosci i określenia całego profilu autooprzeciwiacił obecnych w surowicy osoby badanej (10).

II-3. Izolowanie monospecyficznych autooprzeciwiacił

Zarówno badanie immunochemiczne autooprzeciwiacił jak i analiza składu i antygenowego charakteru rozpoznawanych przez nie składników komórki, wymaga wyizolowania autooprzeciwiacił o określonej specyficznosci spośród ich mieszaniny występującej w surowicy (30). U niektórych chorych surowica zawiera tylko jeden rodzaj autooprzeciwiacił, np. tylko anty-(U1)RNP; izolowanie frakcji IgG takiej surowicy pozwala na uzyskanie praktycznie monospecyficznego autooprzeciwiaciła. Znalezienie surowicy nadającej się do izolowania autooprzeciwiacił tą metodą wymaga jednak przebadania próbek pochodzących od wielu chorych (zwykle metodą immunodyfuzji wobec standardowych antygenów). Ponadto w niektórych badaniach obecność nawet małej ilości autooprzeciwiacił o specyficznosci innej niż wymagana może być — na skutek krzyżowych reakcji z antygenem — przeszkodą w uzyskaniu wiarygodnych wyników. Problem izolowania monospecyficznych autooprzeciwiacił rozwiązano w ostatnich latach dzięki wyprodukowaniu linii komórek hybrydoma, wytwarzających monoklonalne przeciwiacila (30), początkowo anty-DNA (31, 32), anty-rRNA (33) i anty-Sm (34, 35), a później również anty-(U1)RNP (36). Komórki hybrydoma uzyskano w wyniku fuzji mysich komórek nowotworowych (plazmacytoma czyli szpiczak) z komórkami śledziony myszy szczepu MRL, które charakteryzują się obecnością w surowicy autooprzeciwiacił anty-DNA, anty-rRNA, anty-Sm lub anty-(U1)RNP (28).

III. Wykorzystanie autoprzeciwciał do izolowania komórkowych antygenów rybonukleoproteinowych.

Wysoka konserwatywność międzygatunkowa determinat antygenowych, czyli miejsc odpowiedzialnych za antygenowy charakter kompleksów rybonukleoproteinowych (20, 21, 37, 38), pozwala na wykorzystanie monoklonalnych autoprzeciwciał mysich o specyficzności anty-Sm lub anty-(U1)RNP do wytrącania odpowiednich snRNP z komórek innych gatunków (np. ludzkich).

Najczęściej stosowane metody izolowania antygenowych kompleksów rybonukleoproteinowych przy użyciu specyficznych autoprzeciwciał obejmują immunoprecypitację oraz chromatografię powinowactwa. Skład wyizolowanych kompleksów antygenowych oznaczany jest na podstawie autoradiografii rozdzielonych elektroforetycznie białek i RNA. Większość badań nad antygenami rybonukleoproteinowymi dotyczy antygenów Sm i (U1)RNP. Antygeny Ro i La, jakkolwiek również są przedmiotem badań, zostały dotąd scharakteryzowane w mniejszym stopniu.

IV. Antygenowe kompleksy rybonukleoproteinowe.

IV-1. Rybonukleoproteinowe kompleksy tworzące antygeny Sm i (U1)RNP

IV-1.1. Lokalizacja w komórce i wzajemne powiązanie antygenów Sm i (U1)RNP

Metodą pośredniej immunofluorescencji oraz frakcjonowania komórek wykazano, że rybonukleoproteinowe antygeny Sm i (U1)RNP występują w jądrze komórkowym, a ściślej w nukleoplazmie (8, 14, 16, 17, 20, 21). Antygen Sm może sporadycznie występować także w cytoplazmie. Metodą immunodyfuzji wykazano fizyczne powiązanie antygenów Sm i (U1)RNP (17, 39). Stwierdzono przy tym, że antygen (U1)RNP jest podklasą antygeny Sm (39).

IV-1.2. RNA w antygenach Sm i (U1)RNP

Analiza RNA obecnych w kompleksach rybonukleoproteinowych wytrącanych przez przeciwciała anty-Sm i anty-(U1)RNP, przeprowadzona przez Lerner'a i Steitz (9, 37, 38) oraz innych badaczy (40) wykazała, że w skład obu antygenów wchodzi snRNA o długości 100 do 300 nukleotydów, charakteryzujące się wysoką zawartością urydyny oraz modyfikowanych nukleotydów. Należą one do grupy określanej jako UsnRNA. UsnRNA występują powszechnie w jądrach komórek eukariotycznych i stanowią 3—5% całkowitego komórkowego RNA (około 10%

jądrowego RNA), charakteryzują się dużą trwałością metaboliczną i wysoką konserwatywnością sekwencji — zarówno w obrębie różnych tkanek (1, 38) jak i różnych gatunków (38, 41). Transkrypcja UsnRNA jest prowadzona przez polimerazę RNA II. Ważniejsze cechy poszczególnych klas UsnRNA przedstawiono w tabeli 2 (1—5).

Tabela 2

Charakterystyczne cechy UsnRNA.

| Cechy UsnRNA | Klasy UsnRNA | | | | | |
|-------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | U1 | U2 | U4 | U5 | U6 | U3 |
| lokalizacja na terenie jądra | np | np | np | np | np | jąderko |
| ilość kopii w jądrze | 10 ⁶ | 5 × 10 ⁵ | 10 ⁵ | 2 × 10 ⁵ | 3 × 10 ⁵ | 3 × 10 ⁵ |
| długość (nukleotydy) | 165 | 188(9) | 139 | 118 | 106 | 216 |
| struktura końca 5' | ³ mGppp | ³ mGppp | ³ mGppp | ³ mGppp | ppp | ³ mGppp |
| wytrącane przez przeciwciała: | | | | | | |
| anty-Sm | + | + | + | + | + | — |
| anty-(U1)RNP | + | — | — | — | — | — |

np — nukleoplazma

³mGppp — trójfosforan 2,2,7-trójmetyloguanozyny

W skład obu antygenów — Sm i (U1)RNP — wchodzi U1 snRNA lub U1A i U1B snRNA (9, 37, 38). W skład antygeny Sm wchodzi ponadto U2, U4, U4 i U6 snRNA (9, 37, 38). W kompleksach rybonukleoproteinowych wytrączanych z ekstraktów komórek owadzi (émy (38) i *Drosophila* (42)) przez przeciwciała anty-Sm i anty-(U1)RNP występują RNA o podobnych ruchliwościach elektroforetycznych jak ludzkie i mysie UsnRNA, chociaż o znacznie mniejszym stopniu homologii sekwencji nukleotydów.

Obserwowana w niektórych badaniach obecność RNA mniejszych niż UsnRNA (4S, 5S i mniejsze (39, 43, 44)) może być — jak się wydaje — wynikiem degradacji RNA wchodzących w skład antygenów Sm i (U1)RNP (39, 44). Potwierdzeniem tego może być fakt, że RNA mniejsze niż UsnRNA nie posiadają charakterystycznej struktury cap na końcu 5' (39). RNA o bardzo niskich ciężarach cząsteczkowych* obserwowane są zwykle wtedy, gdy źródłem antygeny są komórki pochodzące z grasicy różnych zwierząt (44). Rozbieżności dotyczące oceny wielkości RNA wchodzących w skład Sm i (U1)RNP mogą wynikać również z różnic w metodach izolacji antygenów (43).

Dodatkowe badania (9), w których na ekstrakty jądrowe komórek HeLa działano kolejno przeciwciałami anty-Sm i anty-(U1)RNP wykazały, że U1 snRNA występuje w oddzielnym kompleksie rybonukleoproteinowym niż pozostałe UsnRNA (9, 38). Na podstawie analizy wielkości kompleksów

* Obecnie obowiązuje termin względna masa cząsteczkowa.

rybonukleoproteinowych uważa się, że każda z wytrąconych przez oba przeciwciała klas UsnRNA występuje w oddzielnym kompleksie z określonym zestawem polipeptydów, jako UsnRNP (9, 37, 38, 42).

IV-1.3. Białka w antygenach Sm i (U1)RNP

Białka wytrącane przez przeciwciała anty-Sm i anty-(U1)RNP nie zostały dotąd bliżej scharakteryzowane. Wiadomo, że nie są to ani histony, ani białka związane z heterogennym jądrowym RNA (18, 37, 45), a istniejące dane dotyczą jedynie ich ciężaru cząsteczkowego obliczanego na podstawie ruchliwości elektroforetycznej (Tab. 3) (18, 37, 39, 40, 42, 46—58, 133—135).

W większości prac ciężary cząsteczkowe białek wchodzących w skład antygenowych UsnRNP są oceniane na 9 000—35 000, rzadziej dodatkowo na 60 000—70 000. Każdemu z UsnRNP przypisuje się od 4 do 10 polipeptydów. Badania kompleksów rybonukleoproteinowych uzyskanych drogą immunoprecypitacji wykazały, że UsnRNP wchodzące w skład antygenów Sm i (U1)RNP zawierają jednakowy zestaw kilku polipeptydów oraz jedno lub dwa białka charakterystyczne dla poszczególnych antygenów. Rozbieżności dotyczące liczby oraz wielkości polipeptydów wchodzących w skład antygenów Sm i (U1)RNP mogą być wynikiem kilku niezależnych czynników. Jednym z nich jest dobór materiału, z którego są izolowane antygenowe kompleksy — obserwuje się na przykład znaczne różnice w składzie białkowym antygenów Sm i (U1)RNP pochodzących z zamrożonych tkanek lub ekstraktów komórkowych w porównaniu z antygenami pochodzącymi ze świeżych tkanek lub z linii komórkowych (18, 39, 50, 52, 59, 62, 64). Inną przyczyną rozbieżności wyników mogą być różnice w metodach izolacji antygenów (58, 60) lub detekcji wytrąconych polipeptydów (49). Ważną przyczyną niejednorodności wyników dotyczących składu białkowego antygenów Sm i (U1)RNP jest to, że jedni autorzy analizują wszystkie białka (antygenowe i nieantygenowe) wytrącane jako kompleks przeciwciała o danej specyficzności (37, 42, 43, 49), a inni — tylko te białka, które reagują z przeciwciałem jako pojedyncze polipeptydy (42, 50, 55, 58). W drugim przypadku odrzuca się zarówno te białka, które nie mają antygenowego charakteru, a tylko występują w jednym kompleksie z białkami antygenowymi, jak i te, których determinanty antygenowe wymagają zachowania przez białko struktury przestrzennej lub związania go z cząsteczką RNA.

IV-1.4. Determinanty antygenowe Sm i (U1)RNP na kompleksach UsnRNP

Determinanta antygenowa Sm jest wspólna dla pięciu różnych snRNP: U1, U2, U4, U5 i U6 snRNP. Kompleks U1 snRNP ma oprócz determinanty

Białka występujące w antygenowych kompleksach rybonukleoproteinowych Sm i (UI)RNP.

| Komórki użyte jako źródło antygeny | Metoda izolacji antygeny | Ciężary cząsteczkowe białek reagujących z przeciwciałami o specyficzności: | | Ciężary cząsteczkowe determinant | Piśmien- nictwo |
|---------------------------------------|--------------------------|--|--|----------------------------------|--------------------|
| | | anty-Sm | anty-(UI)RNP | | |
| rak <i>Ehrlicha</i> (mysie) | immunoprecypitacja | 9 000—12 000 (3 białka), 16 000, 22 000, 26 000, 33 000 | 9 000—12 000 (3 białka), 16 000, 22 000, 26 000, 33 000, | Sm 22 000, 33 000 | 37 |
| HeLa (ludzkie) | immunoprecypitacja | 12 000—13 000 (3 białka), 15 000, 16 000, 22 000, 23 000, 25 000, 29 000, 110 000 | 12 000—13 000 (3 białka), 15 000, 16 000, 22 000, 23 000, 29 000 | 25 000, 110 000 | 46 |
| HeLa (ludzkie) | immunoprecypitacja | nie oznaczano | 45 000, 48 000, 52 000, 57 000, 60 000 | | 47 |
| HeLa (ludzkie) | immunoprecypitacja* | 14 000, 17 000, 26 000—27 000, 68 000 | 14 000, 17 000, 26 000—27 000, 68 000 | 17 000, 26 000— 27 000 | 48 |
| HeLa (ludzkie) znakowane metioniną | immunoprecypitacja | 8 000—12 000 (4 białka), 18 000, 22 000, 23 000, 30 000 (2 białka) | 8 000—12 000 (4 białka), 18 000, 22 000, 23 000, 30 000 (2 białka) | | 49 |
| HeLa (ludzkie) znakowane leucyną | immunoprecypitacja | 8 000—12 000, 22 000, 23 000, 27 000, 30 000 (2 białka) | 8 000—12 000, 22 000, 23 000, 30 000 (2 białka) | 27 000 30 000 | 49 |

| Komórki użyte jako źródło antygeny | Metoda izolacji antygeny | Ciężary cząsteczkowe białek reagujących z przeciwciałami o specyficzności: | | Ciężary cząsteczkowe determinant | | Pismienictwo |
|--------------------------------------|---|--|---|----------------------------------|-------------------|--------------|
| | | anty-Sm | anty-(U)RNP | Sm | (U)RNP | |
| erytroleukemia Friend (mysie) | immunoprecypitacja* | 10 000, 12 000—14 000, 26 000, 30 000 | 10 000, 12 000—14 000, 26 000, 30 000 | | | 43 |
| linia ludzkich komórek białaczkowych | immunoprecypitacja* | 12 000—32 000 (8 białek, w tym 25 000—2 białka i 19 000) | 12 000—32 000 (8 białek, w tym 25 000—2 białka i 19 000) | | | 50 |
| linia ludzkich komórek białaczkowych | immunoprecypitacja* w warunkach denaturujących | 25 000 (2 białka) | 19 000 | 25 000 (2 białka) | 19 000 | 50 |
| linia komórek wątroby szczura | immunoprecypitacja* w warunkach denaturujących | 25 000, 16 000 | 19 000 | | | 50 |
| wątroba szczura | denaturacja komórek | nie oznaczano | nie oznaczano | | nie wykryto | 50 |
| grasica królika | denaturacja komórek | nie oznaczano | nie oznaczano | | 70 000 | 50 |
| linia ludzkich komórek mieloidalnych | immunoprecypitacja produktów translacji poly A ⁺ RNA | 9 000—32 000 (8 białek) | 18 000, 32 000 | | (łatwo degraduje) | 51 |
| HeLa (ludzkie) | immunoprecypitacja* | nie oznaczano | nie oznaczano | 26000 | | 42 |
| <i>Drosophila</i> (owadzie) | immunoprecypitacja* | nie oznaczano | nie oznaczano | 18 000, 26 000 | | 42 |

| | | | | | | |
|------------------|---|--|--|-------------------|--|--------|
| grasica cielęca | chromatografia immunopowinowactwa | 12 000—13 000 (4 białka), 13 000, 30 000 (2 białka), 65 000 | 12 000—13 000 (4 białka), 13 000, 30 000 (2 białka), 65 000 | 13 000 | 13 000, 30 000, 65 000 | 39 |
| grasica cielęca | chromatografia immunopowinowactwa w obecności RNazy | 12 000—13 000 (4 białka) | nie wykryto | | | 39 |
| wątroba szczura | chromatografia immunopowinowactwa* | nie oznaczano | 13 000, 30 000 | | | 18 |
| grasica cielęca | chromatografia immunopowinowactwa | nie oznaczano | 13 000 (4 białka) 36 000, 65 000 | | 13 000 (2 białka) | 52 |
| HeLa (ludzkie) | chromatografia immunopowinowactwa* | nie oznaczano | nie oznaczano | 13 000, 29 000 | 40 000 (produkt de-gradacji), 70 000 | 55 |
| grasica królicza | chromatografia immunopowinowactwa | nie oznaczano | nie oznaczano | 13 000 | 40 000 (produkt de-gradacji), 70 000 | 55, 56 |
| grasica cielęca | chromatografia immunopowinowactwa | 35 000, 58 000 | nie oznaczano | 58 000 | | 57 |
| grasica królicza | chromatografia immunopowinowactwa | anty-Sm + anty-(U1)RNP 9 000—13 000 (4 białka), 26 000, 30 000, 34 000, 38 000, 44 000 | anty-Sm + anty-(U1)RNP 9 000—13 000 (4 białka), 26 000, 30 000, 34 000, 38 000, 44 000 | | | 53 |
| wątroba kozia | chromatografia immunopowinowactwa* | anty-Sm + anty-(U1)RNP 14 000, 30 000, 70 000, 80 000 | anty-Sm + anty-(U1)RNP 14 000, 30 000, 70 000, 80 000 | 14 000, 30 000 | 14 000, 70 000, 80 000 | 54 |

| Komórki użyte jako źródło antygeny | Metoda izolacji antygeny | Ciężary cząsteczkowe białek reagujących z przeciwciałami o specyficzności: | | Ciężary cząsteczkowe determinant | | Piśmienictwo |
|--|---|--|----------------|---|-------------|--------------|
| | | anty-Sm | anty-(U)RNP | Sm | (U)RNP | |
| grasicca królicza | chromatografia immunopowinowactwa* | anty-Sm + anty-(U)RNP 10 000, 11 000, 13 000, 26 000—27 000, 32 000, 35 000, 73 000 | | 13 000, 26 000— 27 000 | 73 000 | 58 |
| HeLa (ludzkie) | chromatografia immunopowinowactwa* | nie oznaczano | | 13 000, 26 000— 27 000, 68 000 28 000 | 69 000 | 58 |
| wątrobiak Novikoffa | wirowanie w gradiencie gęstości sacharozy i chromatografia w kolumnie BioGel | nie oznaczano | | | nie wykryto | 40 |
| HeLa (ludzkie) | immunoprecypitacja produktów translacji polio-A ⁺ RNA immunoprecypitacja | 26 000, 32 000 | 26 000, 32 000 | | | 134 |
| linia ludzkich komórek mieloidalnych znakowanych metioniną <i>Drosophila</i> (owadzie) | immunoprecypitacja | 9 000—32 000 (8 białek) | 18 000, 32 000 | | | 135 |
| | | nie oznaczano | 14 000, 26 000 | | | 133 |

* — doświadczenia, w których stosowano inhibitory proteaz

Sm jeszcze drugą, charakterystyczną dla niego determinantę antygenową — (U1)RNP. O odrębności determinant Sm i (U1)RNP wchodzących w skład kompleksu U1 snRNP świadczą m.in. wyniki badań prowadzonych metodą radioimmunologiczną (9), w których reakcja U1 snRNP z przeciwciałem anti-Sm nie hamowała wiązania radioaktywnego przeciwciała anti-(U1)RNP do tego kompleksu. Potwierdzeniem tego jest również możliwość rozdzielania aktywności antygenu Sm od (U1)RNP w wyniku dysocjacji kompleksu rybonukleoproteinowego w warunkach denaturujących (50).

Oba antygeny — Sm i (U1)RNP — wykazują wrażliwość (zniesienie reakcji ze specyficznym przeciwciałem) na działanie czynników niszczących białka (trypsyna lub fenol), a antygen (U1)RNP jest ponadto wrażliwy na trawienie RNazą (16, 18, 20, 21, 39, 44, 55).

Większość danych wskazuje na to, że determinantę antygenową Sm tworzą polipeptydy o ciężarach cząsteczkowych 25 000—28 000 oraz 13 000—16 000 (35, 38, 40, 42, 48, 50, 53—56, 58, 59), tworzące z poszczególnymi U_{sn}RNA bardzo trwale kompleksy. Determinantę (U1)RNP tworzą prawdopodobnie jeden lub dwa większe polipeptydy o ciężarze cząsteczkowym 65 000 — 75 000 (45, 48, 54—56, 58), związane dość słabo z kompleksem U_{sn} RNP (45, 54, 61, 62). Łatwo ulegają one proteolizie, stąd często są wykrywane jako pochodne o mniejszym ciężarze cząsteczkowym — około 30 000 — 40 000 (36, 39, 48, 50, 55, 56, 59). Cząsteczka RNA w antygenie (U1)RNP może stanowić część determinanty rozpoznawanej przez specyficzne przeciwciało. Możliwe jest też, że obecność cząsteczki RNA w antygenie (U1)RNP jest konieczna jedynie dla zachowania przestrzennej struktury przez polipeptyd tworzący determinantę antygenową (40, 48, 63). Sugeruje się także, że obecność RNA w antygenie (U1)RNP może być konieczna dla utrzymania antygenowych polipeptydów w formie dostępnej do reakcji z przeciwciałem (55). Ostatnie badania antygenu Sm wskazują na to, że po dokładnym oczyszczeniu również ten antygen wykazuje wrażliwość na RNazę (53).

IV-1.5. Struktura przestrzenna antygenowych U_{sn}RNP

W doświadczeniach z trawieniem U_{sn}RNP rybonukleazą z *Micrococcus* (60) wykazano, że — w przypadku U1, U2, U4 i U5 snRNP — określone fragmenty U_{sn}RNA wchodzącego w skład każdego kompleksu są odporne na nukleolizę. Rolę ochronną przypisuje się kilku białkom o ciężarach cząsteczkowych 9 000—14 000, bardzo silnie związanych z U_{sn}RNA. Większe polipeptydy wchodzące w skład kompleksów U_{sn}RNP są związane z nimi znacznie słabiej i nie wpływają na ochronę U_{sn}RNA przed działaniem RNazy. Fragmenty RNA chronione przed nukleolizą leżą zawsze w okolicy końca 3' cząsteczki U_{sn}RNA i cechuje je obecność sekwencji

$A(U)_nG$ ($n \geq 3$) oraz struktura jednoniciowa otoczona dwoma regionami dwuniciowymi. U6 snRNA, nie posiadający sekwencji $A(U)_nG$, nie zawiera fragmentu chronionego przed atakiem RNazy. Sekwencje leżące na końcu 5' UsnRNA występujących w kompleksach z białkami nie są chronione przed nukleolizą. Stąd przypuszcza się, że są one wyeksponowane na zewnątrz kompleksu i dostępne do oddziaływań z innymi białkami i RNA (60). Potwierdzeniem powyższych przypuszczeń są wyniki badań (64) z użyciem przeciwciała anty-cap, reagującego ze strukturą cap (2,2,7-³mG), charakterystyczną dla końca 5' UsnRNA. Kompleksy UsnRNP są wytrącane z lizatu jądrowego przez specyficzne przeciwciała anty-cap. Stąd wniosek, że koniec 5' UsnRNA zawierający strukturę cap jest wyeksponowany na zewnątrz kompleksu UsnRNP. Ciekawe, że wytrąceniu ulega również U6 snRNP, w skład którego wchodzi U6 snRNA nie posiadający struktury cap i nie reagujący z przeciwciałem anty-cap jako wolny RNA. Świadczyć to może o istnieniu oddziaływań pomiędzy U6 snRNP a pozostałymi UsnRNP.

Proces organizowania się UsnRNA i białek w charakterystyczne kompleksy jest na razie przedmiotem bardzo nielicznych badań. Wydaje się, że wiązanie UsnRNA w kompleksy rybonukleoproteinowe zachodzi w cytoplazmie, gdzie UsnRNA są przejściowo obecne tuż po transkrypcji (65—67). Potwierdzeniem tego są doświadczenia DeRobertisa (68, 69), w których wykazano, że UsnRNA wstrzyknięte do cytoplazmy oocytów żaby są przenoszone i gromadzone w jądrze komórkowym. Wykazano przy tym, na podstawie reakcji z przeciwciałami anty-Sm i anty-(U1)RNP, wiązanie tych UsnRNA z białkami obecnymi w cytoplazmie oocytów. Białka wiążące się z wstrzykniętymi UsnRNA są przechowywane w cytoplazmie oocytów (70) w formie kompleksu pięciu polipeptydów o ciężarze cząsteczkowym 10 000 — 28 000 i dopiero po podaniu UsnRNA są przenoszone do jądra komórkowego.

Stosując translację *in vitro* w układzie bezkomórkowym wykazano, że polipeptydy wchodzące w skład UsnRNP są syntetyzowane na matrycy oddzielnych mRNA (51). Syntetyzowane białka w stosowanym układzie doświadczalnym występują w postaci monomerów, które ulegają częściowej organizacji w kompleksy rybonukleoproteinowe.

IV-1.6. Związek UsnRNP ze strukturami jądrowymi

Kompleksy UsnRNP wchodzące w skład antygenów Sm i (U1)RNP sedymentują podczas wirowania w gradiencie gęstości sacharozy z szybkością 7—11 S (8, 17, 21, 37, 71, 72). Stała sedymentacji nieoczyszczonych UsnRNP, analizowanych jako składniki całkowitego ekstraktu (lub lizatu) jądrowego, zależy od siły jonowej przygotowywanych preparatów. W wysokich stężeniach soli (powyżej 0.15 M NaCl) UsnRNP sedymentują z szyb-

kością około 10 S (tj. jako wolne kompleksy) (45, 49), natomiast w niskich stężeniach soli (0.01—0.1 M NaCl) sedymentują we frakcjach 30 S lub szybciej (38, 45, 73—76). Frakcje te zawierają jako główny składnik heterogenny jądrowy RNA (hnRNA) związany z białkami w kompleks rybonukleoproteinowy (hnRNP). Asocjacja UsnRNP z hnRNP może być spowodowana występowaniem wiązań wodorowych pomiędzy UsnRNA (zwłaszcza U1 i U2) a hnRNA (77, 78) lub oddziaływań pomiędzy białkami wchodzącymi w skład UsnRNP i hnRNP (73, 79, 136). Badania wrażliwości UsnRNA związanych z hnRNP na trawienie RNazą z *Micrococcus* pozwoliły wstępnie zlokalizować poszczególne UsnRNP w obrębie hnRNP (80); U2 i U5 występują we wnętrzu kompleksu hnRNP, a U1 — na jego powierzchni. U6 snRNP jest silnie związany z szybko sedymentującymi strukturami jądrowymi, tzw. ziarnistościami perichromatycznymi, występującymi w regionach jądra zawierających szybko znakujący się hnRNA (80, 81).

We wczesnych badaniach, w których we frakcjach zawierających hnRNP stwierdzono obecność niskocząsteczkowych, trwałych metabolicznie RNA sugerowano, że UsnRNA są strukturalnymi elementami hnRNP (71, 73, 74, 82, 83). Występowanie UsnRNP w postaci odrębnych kompleksów rybonukleoproteinowych (45, 84) o składzie białkowym różnym niż ten, który jest charakterystyczny dla hnRNP (18, 38) przemawia za funkcjonalnym a nie strukturalnym powiązaniem UsnRNA z hnRNP (37, 38).

Poza powiązaniem UsnRNP z hnRNP stwierdzono występowanie kowalentnych wiązań około 10% U1 i U2 snRNP z dwuniciowym DNA (85). Znaczenie tego zjawiska jest nieznanne.

IV-1.7. Funkcja antygenowych UsnRNP

Funkcja UsnRNP wchodzących w skład antygenów Sm i (U1)RNP nie jest do końca wyjaśniona. Konserwatywność, trwałość metaboliczna i duża ilość tych cząstek w jądrze komórkowym (5, 8, 9, 38, 72) sugerują udział UsnRNP w podstawowych procesach życiowych komórki.

Najwięcej danych dotyczy funkcji U1 snRNP. Uważa się, że kompleks ten bierze udział w dojrzewaniu pierwotnych transkryptów mRNA (pre-mRNA), o czym świadczą: występowanie U1 snRNP w zwiększonych ilościach w komórkach aktywnych metabolicznie (38, 72), lokalizacja w tych regionach jądra, gdzie zachodzi synteza i obróbka mRNA (asocjacja z hnRNP (38, 72), występowanie wiązań wodorowych pomiędzy U1 snRNA i hnRNA (78)). Coraz liczniejsze dane wskazują na to, że funkcja U1 snRNP w obróbce pre-mRNA polega na udziale w wycinaniu sekwencji niekodujących — intronów (38, 72, 86). Koniec 5' U1 snRNA zawiera niezwykle konserwatywną sekwencję (38, 75, 87), komplementarną do równie konserwatywnych sekwencji występujących na granicy intron/ekson w pre-mRNA (88, 89, 90) (Ryc. 1). Nukleotydy 2 do 10 — bliższe końca 5' U1

potwierdzenia wiązania przy końcu 3' intronu. Fragmenty pre-mRNA zawierające sekwencję graniczną 5' związane z U1 snRNA mogą być wytrącone przy użyciu przeciwciała anti-(U1)RNP. Trawienie proteinazą K znosi oddziaływanie pomiędzy U1 snRNA i pre-mRNA. Stąd, białka tworzące wraz z U1 snRNA kompleks rybonukleoproteinowy mają istotny udział w wiązaniu U1 snRNA z pre-mRNA (94).

Przekonywującym potwierdzeniem udziału U1 snRNP w dojrzewaniu pre-mRNA są doświadczenia *Yanga i wsp.* (95). Wprowadzenie przeciwciał anti-Sm lub anti-(U1)RNP do bezkomórkowego układu zawierającego izolowane jądra komórek HeLa zainfekowanych adenowirusem hamowało wycinanie intronów adenowirusowego wczesnego pre-mRNA, natomiast synteza i poliadenylacja tego pre-mRNA nie ulegały zmianie. Ponieważ determinanty antygenowe dla obu przeciwciał — anti-Sm i anti-(U1)RNP — równocześnie występują tylko na U1 snRNP, stąd wniosek o roli tego właśnie kompleksu w wycinaniu intronów. Ostatnie badania przeprowadzone przez grupy *Steitz* oraz *Sharpa* (96) wykazały hamowanie wycinania intronów również z późnych pre-mRNA adenowirusowych w układzie bezkomórkowym przez przeciwciała anti-(U1)RNP oraz anti-Sm. Przeciwciała specyficzne wobec U2 snRNP nie hamowały wycinania intronów. W analogicznych doświadczeniach w układzie komórkowym, wprowadzanie przeciwciał anti-(U1)RNP do komórek HeLa zainfekowanych adenowirusem (47), hamowało dojrzewanie tylko niektórych z późnych adenowirusowych pre-mRNA. Wprowadzanie przeciwciał anti-Sm lub anti-(U1)RNP do oocytów żaby zainfekowanych wirusem SV40 hamowało wycinanie intronów ze wszystkich późnych, ale tylko z niektórych wczesnych SV40 pre-mRNA (137). Wskazuje to na istnienie alternatywnych systemów obróbki pre-mRNA.

Nie ma dotąd pewności, czy działanie U1 snRNP w procesie dojrzewania pre-mRNA ogranicza się do odpowiedniego ułożenia przestrzennego pre-mRNA (44), czy też kompleks ten pełni również funkcję enzymatyczną — endonukleazy wycinającej introny i ligazy łączącej poszczególne eksony w ciągłą nić mRNA (50). Przykładem enzymu, który do swej aktywności wymaga — poza zestawem odpowiednich białek — obecności cząsteczki RNA, jest RNaza P, biorąca udział w dojrzewaniu tRNA (97, 98).

W układzie komórkowym stwierdzono hamowanie translacji przez U1 snRNP (99). Stąd sugerowano, że kompleks ten może brać udział w zaobserwowanym wcześniej hamowaniu translacji w komórce podczas mitozy (100). W komórce zachodzi wprawdzie przestrzenne oddzielenie miejsca występowania U1 snRNP i miejsca translacji ale wiadomo, że po zaniku błony jądrowej podczas mitozy U1 snRNP przejściowo znajduje się w cytoplazmie (101). Badania prowadzone w układzie komórkowym nie potwierdzają jednak sugerowanej powyżej funkcji U1 snRNP — hamowanie translacji w czasie mitozy jest obserwowane mimo związania

U1 snRNP przez wprowadzone do komórki przeciwciała anti-(U1)RNP (102).

Funkcje pozostałych UsnRNP są na razie nieznanne. Ze względu na istnienie wspólnych determinant antygenowych i na podobną strukturę wszystkich UsnRNA sugeruje się udział U2, U4, U5 i U6 snRNP w podobnych procesach, jak U1 snRNP. Stwierdzono m.in., że U2 snRNA zawiera sekwencje komplementarne do niektórych sekwencji w pre-mRNA występujących w pobliżu granicy intron/ekson (103). Wykazano także doświadczalnie występowanie wiązań wodorowych pomiędzy U2 snRNA i hnRNA (77).

Sugeruje się, że U2, U4, U5 i U6 snRNP mogą brać udział np. wycinaniu intronów z pre-mRNA, zawierających na granicy intron/ekson sekwencje odmienne od powszechnie spotykanych lub w dojrzewaniu końców 3' i 5' w pre-tRNA, albo w trawieniu końców 3' hnRNA przed poliadenylacją (8).

IV-2. Kompleksy rybonukleoproteinowe wchodzące w skład antygenów Ro i La

IV-2.1. Lokalizacja w komórce i wzajemne powiązanie antygenów Ro i La

Niskocząsteczkowe kompleksy rybonukleoproteinowe wytrącane przez przeciwciała anti-Ro zostały metodą pośredniej immunofluorescencji zlokalizowane w cytoplazmie (104), a ściślej w cytoplazmatycznych organelach (105). W literaturze kompleksy te są określane jako Ro-scRNP.

Cytoplazmatyczne (106, 107) lub jądrowe (108) rozmieszczenie rybonukleoproteinowych kompleksów wytrącanych przez przeciwciała anti-La było dość długo przedmiotem kontrowersji. Obecnie uważa się, że La jest antygenem pochodzenia jądrowego, który przejściowo występuje w cytoplazmie (63, 109). Ponadto w czasie izolowania kompleksu LaRNP łatwo przenikają z jądra do frakcji cytoplazmatycznej (110).

Antygeny Ro i La są ze sobą częściowo spokrewnione, przy czym antygen Ro jest uważany za podklasę antygeny La (jest wytrącany również przez przeciwciała anti-La) (110). Sugerowana przez niektórych autorów (63, 110) obecność determinant La na kompleksach Ro-scRNP nie została potwierdzona w doświadczeniach z immunoprecypitacją Ro-scRNP przeciwciałami anti-Ro i anti-La (46).

IV-2.2. Kompleksy rybonukleoproteinowe Ro-scRNP

RNA wchodzące w skład Ro-scRNP różnią się znacznie od UsnRNA charakterystycznych dla antygenów Sm i (U1)RNP. Te niskocząsteczkowe cytoplazmatyczne RNA są nieco krótsze od UsnRNA (90-10 nukleotydów),

nie zawierają modyfikowanych nukleotydów, a na końcu 5' nie posiadają struktury cap, tylko trójfosforan purynowy (105). Ro-scRNA (określane inaczej jako Y-scRNA) są stabilne, podobnie jak UsnRNA, ale występują w znacznie mniejszej liczbie kopii w komórce (mniej niż 10^6). Nie są też tak wysoce konserwatywne jak UsnRNA. W komórkach ludzkich HeLa występuje pięć różnych Ro-scRNA (Y1-Y5), a w komórkach mysich — tylko dwa (Y1 i Y2). Ro-scRNA są produktami transkrypcji prowadzonej przez polimerazę RNA III (105).

Ro-scRNA nie są konieczne do zachowania antygenowego charakteru przez kompleksy Ro-scRNP. Determinanty antygenowe Ro leżą w obrębie białek wchodzących w skład kompleksów. Dane dotyczące białek odpowiedzialnych za rozpoznanie Ro-scRNP przez przeciwciała anti-Ro są bardzo skąpe; wydaje się, że są to polipeptydy o ciężarze cząsteczkowym 90 000 i 94 000 (46), lub 50 000 i 57 000 (138).

Funkcja Ro-scRNP nie jest dotąd znana. W związku z lokalizacją tych kompleksów w organellach cytoplazmatycznych przypuszcza się, że mogą być one zaangażowane w akumulację lub rozkład zużytego mRNA w organellach (8).

IV-2.3. Kompleksy rybonukleoproteinowe wchodzące w skład antygeny La

IV-2.3.1. Budowa LaRNP

Kompleksy rybonukleoproteinowe wytrącane przez przeciwciała anti-La stanowią najbardziej zróżnicowaną grupę niskocząsteczkowych kompleksów rybonukleoproteinowych o charakterze antygenowym.

RNA występujące w kompleksach rybonukleoproteinowych wytrącanych przez przeciwciała anti-La (110) są znacznie mniej stabilne niż UsnRNA oraz nie tak konserwatywne ewolucyjnie. Ich długość wynosi 80—140 nukleotydów, na końcu 5' nie występuje struktura cap, ale — podobnie jak w Ro-scRNP — trójfosforan purynowy. Wszystkie są produktami transkrypcji prowadzonej przez polimerazę RNA III. Do RNA związanych z antygenem La należą: 4.5S RNA (myszy i chomika) (111, 112), 4,5S I RNA (szczura) (110), pre-tRNA (113), pre-5S rRNA (113) oraz wspólne z antygenem Ro Ro-scRNA (110). Kompleksy LaRNP wytrącane przez przeciwciała anti-La z komórek zainfekowanych niektórymi wirusami zawierają — oprócz wymienionych wyżej komórkowych RNA — także RNA pochodzenia wirusowego (kodowane przez genom wirusa). Należą do nich: VAI i VAII RNA (ang. virus associated RNA) wytrącane z komórek HeLa zainfekowanych adenowirusem (105, 114) oraz EBER1 i EBER2 (z ang. Epstein-Barr encoded RNA) wytrącane z komórek ludzkich zainfekowanych wirusem Epsteina-Barr (109). Inne wirusy, jak np. *Herpes simplex* lub SV40 (94, 109) nie kodują RNA wchodzących w skład

kompleksów wytrącanych przez przeciwciała anty-La. Wirusowe VAI i VAII RNA (105, 114) oraz EBER1 i EBER2 (109), o długości odpowiednio 160 i 180 nukleotydów, posiadają na końcu 5' trójfosforan adeniny i są produktami transkrypcji prowadzonej przez polimerazę RNA III z komórki gospodarza (109, 114).

Trawienie kompleksów LaRNP proteinazą lub trypsyną, lub traktowanie ich fenolem znosi reakcję immunoprecypitacji z przeciwciałem anty-La (46, 105, 109, 114). Antygen La jest też wrażliwy na działanie RNazy (105, 106). Białka wchodzące w skład antygeny La są zawsze pochodzenia komórkowego (46, 109, 114). Za właściwy antygen uważane jest białko o ciężarze cząsteczkowym ocenianym na 55 000 (113), 50 000 (113, 138, 139), 45 000 (46) lub 43 000 (138), obecne zarówno w komórkach zainfekowanych wirusem jak i niezainfekowanych (46).

Tabela 4

RNA wytrącane przez przeciwciała anty La i anty Ro

| Przeciwciało | RNA wytrącane przez przeciwciała anty -La i anty -Ro | | | |
|--------------|--|-----------------------------|----------------------|-----------|
| | nazwa | pochodzenie | długość (nukleotydy) | koniec 5' |
| anty-Ro | Y1 i Y2 scRNA | cytoplazmatyczne (mysz) | 90—100 | pppPu |
| | Y1-Y5 scRNA | cytoplazmatyczne (człowiek) | 90—100 | pppPu |
| anty-La | 4.5S | komórkowe (mysz) | 95 | pppG |
| | 4.5SI | komórkowe (szczur) | 96 | pppG |
| | pre-tRNA | komórkowe | | pppPu |
| | pre-5S RNA | komórkowe | | pppPu |
| | Y scRNA | cytoplazmatyczne | 90—100 | pppPu |
| | VAI i VAII | adenowirusowe | 160—163 | pppPu |
| | EBER1 i EBER2 | wirusowe | 167—173 | pppA |

Organizacja przestrzenna LaRNP nie jest jeszcze całkowicie poznana. Wiadomo, że miejsce wiązania białka La z wirusowym VA RNA znajduje się na końcach 3' i 5' cząsteczki RNA, przy czym rozpoznawana jest, jak się wydaje, sekwencja a nie struktura drugorzędowa RNA. Istotniejszą rolę w wiązaniu odgrywa koniec 3' (46). Miejsce wiązania 4.5S RNA szczura przez białko La leży przy końcu 3' tego RNA, we fragmencie bogatym w reszty urydylowe (115). Ponieważ większość RNA występujących w kompleksach LaRNP (VA RNA, EBER, mysie 4.5S RNA, szczurze 4.5S I RNA, ludzkie Y5 RNA) charakteryzuje się zwiększoną zawartością reszt urydylowych przy końcu 3' (112, 114—117), wydaje się, że ten region może być powszechnym miejscem wiązania białka La (115).

Wiązanie białka La z Ro-scRNA oraz wirusowymi EBER i VA RNA jest trwałe (110, 114), natomiast jego wiązanie z prekursorowymi formami

komórkowych RNA — pre-tRNA i pre-rRNA — ma charakter przejściowy (113). Dojrzałe 5S RNA oraz tRNA tracą swój związek z antygenem La (113) i mogą — jak się wydaje — wiązać się z białkami reagującymi z innymi przeciwciałami (118).

IV-2.3.2. Funkcja antygenowych LaRNP

Wszystkie RNA, które tworzą z białkiem La kompleksy rybonukleoproteinowe wytrącane przez przeciwciała anty-La, są produktami transkrypcji prowadzonej przez polimerazę RNA III. Stąd uważa się, że białko La może być istotnym czynnikiem dla prawidłowej transkrypcji wszystkich RNA syntetyzowanych przy udziale polimerazy RNA III (113). Przejściowy charakter wiązania białka La z prekursorowymi formami 5S RNA i tRNA wskazuje na możliwość udziału białka La w obróbce potranskrypcyjnej produktów działania polimerazy RNA III (113).

Niektóre RNA wchodzące w skład LaRNP (4.5S RNA, EBER) wykazują duży stopień homologii z występującą powszechnie w genomach eukariotycznych rodziną sekwencji Alu (117, 119—121). Uważa się, że rodzina wysoce powtarzalnych, konserwatywnych, rozproszonych w genomie sekwencji Alu (120, 123), jest zaangażowana w procesach regulacji funkcji genu (124). Możliwe więc, że LaRNA wykazujące duże podobieństwo sekwencji pełnią podobną funkcję w komórce.

RNA wchodzące w skład kompleksów LaRNP mogą brać udział w obróbce potranskrypcyjnej mRNA. Stwierdzono, że wirusowy VA RNA hybrydyzuje z dojrzałymi późnymi mRNA adenowirusa lub z wytworzonymi na ich matrycy cDNA, natomiast nie hybrydyzuje z wirusowym natywnym DNA, zawierającym introny (125). Wykazano ponadto homologię sekwencji VA RNA z sekwencjami występującymi na granicy intron/ekson w wirusowym pre-mRNA (92). Sugeruje to udział VA RNA albo w wycinaniu intronów z późnych wirusowych pre-mRNA (92, 125) (analogiczną do funkcji U1 snRNA w wycinaniu intronów z wczesnych adenowirusowych pre-mRNA), albo też w dalszej obróbce mRNA — np. w transporcie z jądra do cytoplazmy (125).

W wielu badaniach wykazano, że komórkowy 4.5S RNA występuje w asocjacji z jądrowym i cytoplazmatycznym RNA zawierającym sekwencje poly-A, charakterystyczne dla mRNA (72, 111, 112, 119). Asocjacja 4.5S RNA z poliadenylowanym cytoplazmatycznym RNA ma charakter przejściowy i jest obserwowana do momentu utworzenia polisomów, tj. rozpoczęcia translacji na matrycy tego mRNA (119). Półokresy trwania 4.5S RNA i poliadenylowanego RNA w jądrze komórkowym są porównywalne, a w cytoplazmie znacznie krótsze w przypadku 4.5S RNA (112, 119). Powyższe dane sugerują udział 4.5S RNA w transporcie mRNA z jądra do cytoplazmy (112, 119). Miejsce asocjacji 4.5S RNA z poliadeny-

lowanym RNA leży w regionie 4.5S RNA bogatym w puryny, komplementarnym do bogatego w pirymidyny regionu 3' intronów w pre-mRNA (112). Wskazuje to na możliwość zaangażowania 4.5S RNA w wycinaniu intronów z pre-mRNA (112).

IV-24. Inne antygenowe niskocząsteczkowe RNP

Odkryte w ostatnim czasie przeciwciała anty-Th i anty-To wytrącają niskocząsteczkowe kompleksy rybonukleoproteinowe spokrewnione ze sobą oraz z antygenami La i Ro.

W surowicy chorego na twardzinę uogólnioną (PSS) wśród charakterystycznych dla tej choroby przeciwciał przeciwjąderkowych (126), stwierdzono obecność przeciwciała anty-To, które z ekstraktów komórek szczu- rzych i ludzkich wytrąca niskocząsteczkowe kompleksy rybonukleoproteinowe: 7—2 RNP zlokalizowany w jąderku oraz 8—2 RNP zlokalizowany w cytoplazmie (127). RNA wchodzące w skład tych kompleksów są produktami transkrypcji prowadzonej przez polimerazę RNA III (118), posiadają na końcu 5' trójfosforan guanozyny i są częściowo konserwatywne (127). Występują w oddzielnych kompleksach rybonukleoproteinowych, na co wskazuje wytrącanie ich przez przeciwciała anty-To z różnych miejsc komórki (127). Większość 7—2 RNP jest zasocjowana z dużymi strukturami o stałej sedymentacji większej niż 20 S, natomiast 8—2 RNP sedymentują z szybkością 10 S (127).

Kompleksy 7—2 RNP i 8—2 RNP są wytrącane również przez przeciwciała anty-Th wykryte w surowicy chorego na toczeń rumieniowaty (118). Przeciwciała to — w przeciwieństwie do anty-To — wytrąca z ekstraktów komórek mysich i ludzkich nie tylko kompleksy zawierające 7—2 i 8—2 RNA, ale również Ro-scRNA, charakterystyczne dla Ro-scRNP. 7—2 RNA różni się od analogicznych RNA wytrącanych przez przeciwciała anty-To i — jak się okazało — również przez przeciwciała anty-La, brakiem grupy trójfosforanowej na końcu 5'. Obrazy elektroforetycznych rozdziałów produktów częściowego trawienia La 7—2 RNA i Th 7—2 RNA są (poza różnicą końca 5') identyczne. Stąd uważa się, że La 7—2 RNA może być prekursorową formą Th 7—2 RNA (118).

Antygenowy charakter kompleksów 7—2 i 8—2 RNP wymaga obecności białka, czego dowodzi wrażliwość tych kompleksów na działanie fenolu (118, 127). Niewyjaśnione pozostaje, czy przeciwciała anty-To i anty-Th rozpoznają wspólną białkową determinantę antygenową, czy też odmienne, mimo że występujące na tych samych kompleksach (118). Nie wiadomo też, czy przeciwciała anty-Th rozpoznaje w kompleksach 7—2 i 8—2 RNP to samo antygenowe białko, co w Ro-scRNP, czy też w surowicy są obecne dwa przeciwciała — anty-Ro i anty-Th (63).

V. Uwagi końcowe

Niskocząsteczkowe jądrowe oraz cytoplazmatyczne RNA występują w połączeniu z białkami w kompleksach rozpoznawanych przez przeciwciała z surowicy chorych na choroby tkanki łącznej. Poza autoprzeciwciałami wytrącającymi opisane w niniejszej pracy rybonukleoproteinowe antygeny Sm, (U1)RNP, Ro, La, To i Th, znane są także przeciwciała przeciwyrybosomalne, wytrącające związane z białkami 5S i 5.8S rRNA (63, 128). Spośród niskocząsteczkowych RNA tylko U3 snRNA (transkrybowany przez polimerazę RNA II) oraz wirusowy 7S RNA (transkrybowany przez polimerazę RNA III) nie ulegają wytrąceniu przez przeciwciała z surowicy chorych na choroby tkanki łącznej. Stwierdzono wprawdzie obecność U3 snRNA w immunoprecypitatach uzyskanych przy użyciu surowicy chorego na twardzinę uogólnioną, jednak wydaje się, że obecne w tej surowicy przeciwciała były skierowane nie przeciw U3 snRNP lecz przeciw prerybosomalnym cząsteczkom zawierającym zasocjowane z nimi U3 snRNP (127).

Każdy rodzaj niskocząsteczkowych RNA występuje w jednym tylko typie kompleksów rybonukleoproteinowych i jest ilościowo wytrącany przez przeciwciała rozpoznające determinanty antygenowe tego kompleksu. Wyjątek stanowią antygenowe kompleksy La, które wiążą się jedynie przejściowo z niektórymi RNA łączącymi się później z białkami o innej antygenowości.

Niemal wszystkie badania dotyczące snRNP i scRNP potwierdzają udział tych kompleksów w regulacji metabolizmu komórki, zwłaszcza w regulacji ekspresji genetycznej na poziomie kontroli potranskrypcyjnej, jak wycinanie intronów z pre-mRNA i transport mRNA z jądra do cytoplazmy. Brak jednak dokładnego określenia działań poszczególnych kompleksów. W ostatnich latach wykazano zdolność pre-rRNA z *Tetrahymena* do samowycinania intronów (129). Wewnątrz intronu mRNA z drożdży stwierdzono występowanie sekwencji niezbędnej do wycinania intronu, która prawdopodobnie działa na podobnej zasadzie jak U1 snRNA w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych (130).

Wykorzystanie specyficznych autoprzeciwciał przeciw snRNP i scRNP jako precyzyjnej sondy do izolacji i charakteryzowania tych kompleksów powinno przyczynić się do lepszego poznania funkcji jaką niskocząsteczkowe kompleksy rybonukleoproteinowe pełnią w komórkach eukariotycznych.

Zaakceptowano do druku 12.09.1984 r.

PISMIENNICTWO

1. Ro-Choi T., Busch H., (1974), *The Cell Nucleus*, red. Busch H., t. 3, 151—208, Academic Press, New York.

2. Reddy R., Busch H., (1981), *The Cell Nucleus*, red. Busch H., t. 8, 261—306, Academic Press, New York.
3. Busch H., Reddy R., Rothblum L., Choi T., (1982), *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 617—654.
4. Monstein H-J., (1982), *Acta Universitatis Upsaliensis*, **656**, 1—34.
5. Zieve G., (1981), **25**, 296—297.
6. Jaruzelska J., Słomski R., (1982), *Post. Bioch.*, **28**, 25—43.
7. Jaruzelska J., Słomski R., (1984), *Post. Bioch.*, **1—2**, 53—69.
8. Lerner M., Steitz J., (1981), *Cell*, **25**, 298—300.
9. Lerner E., Lerner M., Hardin J., Janeway Jr. Ch., Steitz J., (1982), *Arthritis Rheum.*, **25**, 761—766.
10. Tan E., (1982), *Arthritis Rheum.*, **25**, 753—756.
11. Arana R., Seligmann M., (1967), *J. Clin. Invest.*, **46**, 1867—1882.
12. Koffler D., Kunkel H., (1971), *J. Exptl Med.*, **134**, 294—312.
13. Tan E., Lerner R., (1972), *J. Mol. Biol.*, **68**, 107—114.
14. Pinnas J., Northway J., Tan E., (1973), *J. Immunol.*, **111**, 996—1004.
15. Stollar B., (1971), *Arthritis Rheum.*, **14**, 485—492.
16. Tan E., Kunkel H., (1966), *J. Immunol.*, **96**, 464—471.
17. Mattioli M., Reichlin M., (1973), *J. Immunol.*, **110**, 1318—1324.
18. Douvas A., Stumph W., Reyes P., Tan E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3608—3616.
19. Sharp G., Irvin W., Tan E., Gould R. G., Holman H., (1972), *Am. J. Med.*, **52**, 148—159.
20. Mattioli M., Reichlin M., (1971), *J. Immunol.*, **107**, 1281—1290.
21. Northway J., Tan E., (1972), *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **1**, 140—154.
22. Halle J., Volanakis J., Schrohenloher J., (1979), *Arthritis Rheum.*, **22**, 484—489.
23. Alspaugh M., Talal N., Tan E., (1976), *Arthritis Rheum.*, **19**, 216.
24. Kassan S., Akizuki M., Steinberg A., Reddick R., Chused T., (1977), *Am. J. Med.*, **63**, 328.
25. Alarcon-Segovia D., Ruiz-Arguelles A., Fishbein E., (1978), *Nature*, **271**, 67—69.
26. Zimmermann-Górska I., Potocka-Michajluk U., (1982), *Immunologia Polska*, **7**, 197—211.
27. Sharp G., (1982), *Arthritis Rheum.*, **25**, 757—759.
28. Eisenberg R., Tan E., Dixon F., (1978), *J. Exptl Med.*, **147**, 582—587.
29. Sharp G., Irvin W., May C., Holman H., McDuffie F., Hess E., Schmid F., (1976), *New Engl. J. Med.*, **295**, 1149—1154.
30. Rauch J., Lafer E., Andrzejewski Ch., Stollar B., Schwartz R., (1982), *Arthritis Rheum.*, **25**, 744—746.
31. Hahn B., Ebling F., Freeman S., Clevinger B., Davie J., (1980), *Arthritis Rheum.*, **23**, 942—945.
32. Tron F., Charron D., Bach J., Talal N., (1980), *J. Immunol.*, **125**, 2805—2809.
33. Eilat D., Asofsky R., Laskov R., (1980), *J. Immunol.*, **124**, 766—768.
34. Cohen P., Eisenberg R., (1982), *J. Immunol.*, **129**, 2682—2685.
35. Lerner E., Lerner M., Janeway Jr. Ch., Steitz J., (1981), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **78**, 2737—2741.
36. Billings P., Allen R., Jensen F., Hoch S., (1982), *J. Immunol.*, **128**, 1176—1180.

37. Lerner M., Steitz J., (1979), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **76**, 5495—5499.
38. Lerner M., Boyle J., Mount S., Wolin S., Steitz J., (1980), *Nature*, **283**, 220—224.
39. Takano M., Golden S., Sharp G., Agris P., (1981), *Biochemistry*, **20**, 5929—5935.
40. Schrier W., Reddy R., Busch H., (1982), *Cell Biology International Reports*, **6**, 925—932.
41. Branlant Ch., Krol A., Ebel J-P., Lazar E., Gallinaro H., Jacob M., Sri-Widada J., Jeanteur P., (1980), *Nucl. Acid Res.*, **8**, 4143—4154.
42. Wooley J., Cone R., Tartof D., Chung S-Y., (1982), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **79**, 6762—6766.
43. Barque J., Yeni P., Peraudeau L., Danon F., Larsen C., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 284—291.
44. McGillivray A., Carroll A., Dahi S., Naxakis G., Sadaie M., Wallis C., Jing T., (1982), *FEBS Letters*, **141**, 139—147.
45. Hinterberger M., Petterson J., Steitz J., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 2604—2613.
46. Francoeur A., Matthews M., (1982), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **79**, 6772—6776.
47. Lenk R., Maizel Jr. J., Crouch R., (1982), *Eur. J. Bioch.*, **121**, 475—482.
48. Wooley J., Zukenberg L., Chung S-Y., (1980), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **80**, 5208—5212.
49. Kinlaw C., Dusing-Swartz S., Berget S., (1982), *Mol. Cell Biol.*, **2**, 1159—1166.
50. Conner G., Nelson D., Wisniewolski R., Lahita R., Blobel G., Kunkel H., (1982), *J. Exptl Med.*, **156**, 1475—1485.
51. Fisher D., Conner G., Reeves W., Blobel G., Kunkel H., (1983), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **80**, 6356—6360.
52. Takano M., Agris P., Sharp G., (1980), *J. Clin. Invest.*, **65**, 1449—1456.
53. White P., Gardner W., Hoch S., (1981), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **78**, 626—630.
54. Ishaq M., Ali R., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 564—570.
55. White P., Billings P., Hoch S., (1982), *J. Immunol.*, **128**, 2751—2755.
56. White P., Hoch S., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 365—371.
57. Dang H., Fischbach M., Lerner E., Talal N., (1983), *J. Immunol.*, **130**, 2782—2785.
58. Billings P., Hoch S., (1983), *J. Immunol.*, **131**, 347—351.
59. Douvas A., (1982), *Proc. Natl Acad., Sci., USA*, **79**, 5401—5405.
60. Liautard J-P., Sri-Widada J., Brunel C., Jeanteur P., (1982), *J. Mol. Biol.*, **162**, 623—643.
61. Assens C., Liautard J., Sri-Widada J., Brunel C., Jeanteur P., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 953—960.
62. Kinlaw C., Robberson B., Berget S., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 7181—7189.
63. Hardin J., Rahn D., Shen C., Lerner M., Wolin S., Rosa M., Steitz J., (1982), *J. Clin. Invest.*, **70**, 141—147.

64. Bringmann P., Reuter R., Rinke J., Appel B., Bald R., Luhrmann R., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 2745—2747.
65. Eliceiri G., Gurney T., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 915—919.
66. Eliceiri G., Sayavedra M., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 507—512.
67. Eliceiri G., (1980), *J. Cell. Physiol.*, **102**, 199—207.
68. DeRobertis E., (1983), *Cell*, **32**, 1021—1025.
69. DeRobertis E., Lienhard S., Parisot R., (1982), *Nature*, **295**, 572—577.
70. Zeller R., Nyffenegger T., DeRobertis E., (1983), *Cell*, **32**, 425—434.
71. Howard E., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3228—3236.
72. DeRobertis E., (1980), *Nature*, **283**, 132—133.
73. Zieve G., Penman S., (1981), *J. Mol. Biol.*, **145**, 501—523.
74. Deimel B., Louis Ch., Sekeris C., (1977), *FEBS Lett.*, **73**, 80—83.
75. Maxwell E., Maundrell K., Puvion-Dutilleul F., Scherrer K., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **113**, 233—247.
76. Guaialis A., Arvanitopoulou A., Patrino-Gregoula M., Sekeris C., (1983), *FEBS Lett.*, **151**, 127—133.
77. Calvet J., Meyer L., Pederson T., (1982), *Science*, **217**, 456—458.
78. Calvet J., Pederson T., (1981), *Cell*, **26**, 363—367.
79. Gallinaro H., Jacob M., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **652**, 109—120.
80. Sri-Widada J., Liautard J-P., Brunel C., Jeanteur P., (1983), *Nucl. Acid Res.*, **11**, 6631—6646.
81. Daskal Y., Komaromy L., Busch H., (1980), *Exptl Cell Res.*, **126**, 39—46.
82. Northemann W., Scheurleu M., Gross V., Heinrich P., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 1130—1137.
83. Zieve G., Penman S., (1976), *Cell*, **8**, 19—31.
84. Sri-Widada J., Assens Ch., Liautard J., Jeanteur P., Brunel C., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 457—462.
85. Pederson T., Bhorjee T., (1979), *J. Mol. Biol.*, **128**, 451—480.
86. Rogers J., Wall R., (1980), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **77**, 1877—1879.
87. Mount S., Steitz J., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 6351—6368.
88. Mount S., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 459—472.
89. Sharp P., (1981), *Cell*, **23**, 643—646.
90. Breathnach R., Chambon P., (1981), *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 349—383.
91. Branlant Ch., Krol A., Ebel J-P., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 841—858.
92. Murray V., Holliday R., (1979), *FEBS Lett.*, **106**, 5—7.
93. Lazar E., Jacob M., Krol A., Branlant Ch., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 1193—1201.
94. Mount S., Petterson I., Hinterberger M., Karmas A., Steitz J., (1983), *Cell*, **33**, 509—518.
95. Yang V., Lerner M., Steitz J., Flint S., (1981), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **78**, 1371—1375.
96. Padgett R., Mount S., Steitz J., Sharp P., (1983), *Cell*, **35**, 101—107.

97. Stark B., Kole R., Bowman E., Altman S., (1978), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **75**, 3717—3721.
98. Kole P., Altman S., (1979), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **76**, 3795—3799.
99. Rao M., Blackstone M., Busch H., (1977), *Biochemistry*, **16**, 2756—2762.
100. Mitchison J., (1971), *The Biology of the Cell Cycle*, Cambridge University Press, London i New York.
101. Gurney Jr., T., Eliceiri G., (1980), *J. Cell. Biol.*, **87**, 398—403.
102. Smith J., Subbarao M., Eliceiri G., (1983), *J. Cell. Physiol.*, **114**, 1—6.
103. Ohshima Y., Itoh M., Okada N., Miyata T., (1981), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **78**, 4471—4474.
104. Clark G., Reichlin M., Tomasi T., (1968), *J. Immunol.*, **102**, 117—122.
105. Lerner M., Boyle J., Hardin J., Steitz J., (1981), *Science*, **211**, 400—402.
106. Mattioli M., Reichlin M., (1974), *Arthritis Rheum.*, **17**, 421—429.
107. Alspaugh M., Tan E., (1975), *J. Clin. Invest.*, **55**, 1067—1073.
108. Akizuki M., Powers R., Holman H., (1977), *J. Clin. Invest.*, **59**, 254—272.
109. Lerner M., Andrews N., Miller G., Steitz J., (1981), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **78**, 805—809.
110. Hendrick J., Wolin S., Rinke J., Lerner M., Steitz J., (1981), *Mol. Cell Biol.*, **1**, 1138—1149.
111. Jelinek W., Leinwand L., (1978), *Cell*, **15**, 205—214.
112. Harada F., Kato N., (1980), *Nucl. Acid Res.*, **8**, 1273—1285.
113. Rinke J., Steitz J., (1982), *Cell*, **29**, 149—159.
114. Rosa M., Gottlieb E., Lerner M., Steitz J., (1981), *Mol. Cell Biol.*, **1**, 785—796.
115. Reddy R., Henning D., Tan E., Busch H., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 8352—8356.
116. Monstein H., Philipson L., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 4239—4250.
117. Kato N., Hoshino H., Harada F., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 363—370.
118. Hashimoto C., Steitz J., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 1379—1382.
119. Leinwand L., Wydro R., Nadal-Ginard B., (1982), *Mol. Cell Biol.*, **2**, 1320—1330.
120. Rubin C., Houck C., Deininger P., Friedmann T., Schmid C., (1980), *Nature*, **284**, 372—374.
121. Jelinek W., Toomey T., Leinwand L., Duncan C., Biro P., Choudary P., Weissman S., Rubin C., Houck C., Deininger P., Schmid C., (1980), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **77**, 1398—1402.
122. Haynes S., Toomey T., Leinwand L., Jelinek W., (1981), *Mol. Cell Biol.*, **1**, 573—583.
123. Houck C., Rinehart F., Schmid C., (1979), *J. Mol. Biol.*, **132**, 289—306.
124. Davidson E., Klein W., Britten R., (1977), *Dev. Biol.*, **55**, 69—84.
125. Mathews M., (1980), *Nature*, **285**, 575—577.
126. Douvas A., Tan E., (1981), *The Cell Nucleus*, red. Busch H., t. 8, 369—389, Academic Press, New York.
127. Reddy R., Tan E., Henning D., Nohga K., Busch H., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 1383—1386.

128. Hardin J., Lerner M., Shen C., Rahn D., Steitz J., (1981), *Arthritis Rheum.*, **24**, 58.
129. Kruger K., Grabowski P., Zaug A., Sands J., Gottschling J., Cech T., (1982), *Cell*, **31**, 147—157.
130. Pikielny C., Teem J., Rosbash M., (1983), *Cell*, **34**, 395—403.
131. Notman D., Kurata N., Tan E., (1975), *Annalis Intl Med.*, **83**, 464—469.
132. McNeilage L. J., Whittingham S., Mackay I., (1984), *J. Clin. Lab. Immunol.*, **15**, 1—17.
133. Wieben E., Pederson T., (1982), *Mol. Cell Biol.*, **2**, 914—920.
134. Wieben E., Madore S., Pederson T., (1983), *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **80**, 1217—1220.
135. Fisher D., Reeves W., Conner G., Blobel G., Kunkel H., (1984), *Proc. Natl Acad., Sci., USA*, **81**, 3185—3189.
136. Brunel C., Sri-Widada J., Lelay M-N., Jeanteur P., Liautard J-P., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 815—830.
137. Fradin A., Jove R., Hemenway C., Keiser H., Manley J., Privves C., (1984), *Cell*, **37**, 927—936.
138. Elkon K., Culhane L., (1984), *J. Immunol.*, **132**, 2350—2356.
139. Gottesfeld J., Andrews D., Hoch S., (1984), *Nucl. Acid Res.*, **12**, 3185—3200.

Addendum: W czasie, gdy praca znajdowała się w druku, ukazały się liczne artykuły, przedstawiające nowe, niezwykle istotne dla omawianego zagadnienia informacje. Poniżej podane są poszczególne pozycje piśmiennictwa odnoszące się do fragmentów tekstu wskazanych w nawiasach.

140. Fritzler M., Ali R., Tan E., (1984), *J. Immunol.*, **132**, 1216—1222. (II-2., str. 5)
141. Mimori T., Hinterberger M., Pettersson I., Steitz J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 560—565. (IV-1.4., str. 13)
142. Hashimoto C., Steitz J., (1984), *Nucl. Acid Res.*, **12**, 3283—3293. (IV-1.5., str. 14)
143. Matajji I., DeRobertis E., (1985), *Cell*, **40**, 111—118. (IV-1.5., str. 14)
144. Harmon F., Subrahmanyam Ch., Busch H., (1985), *Mol. Cell Biol.*, **65**, 45—55. (IV-1.6., str. 15)
145. Krämer A., Keller W., Appel B., Lührmann R., (1984), *Cell*, **38**, 299—307. (IV-1.6., str. 17)
146. Padgett R., Konarska M., Grabowski P., Hardy S., Sharp P., (1984), *Science*, **225**, 898—903. (IV-1.6., str. 17)
147. Keller W., (1984), *Cell*, **39**, 423—425. (IV-1.6., str. 17)
148. Konarska M., Grabowski P., Padgett R., Sharp P., (1985), *Nature*, **313**, 552—557. (IV-1.6., str. 17)
149. Berget S., (1984), *Nature*, **309**, 179—182. (IV-1.7., str. 18)
150. Moore C., Sharp P., (1984), *Cell*, **36**, 581—591. (IV-1.7, str. 18 i IV-2.3.2., str. 22)
151. Madore S., Wieben E., Pederson T., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 1929—1933. (IV-2.3.1., str. 20)
152. Kurilla M., Keene J., (1983), *Cell*, **34**, 837—845. (IA-2.3.2., str. 21)

BOŻENNA OLSZAŃSKA *)

Rola segmentów poliadenylowych i poliadenylacji RNA w rozwoju embrionalnym

Role of polyadenylic tracts and RNA polyadenylation in embryonic development

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Kompleksy rybonukleoproteinowe (RNP)
 - II-1. Jądrowe hnRNP
 - II-2. Wolne cytoplazmatyczne mRNP (informosomy)
 - II-3. Polisomalne mRNP
 - II-4. Inne specyficzne nierybosomalne RNP
- III. Enzymy uczestniczące w metabolizmie poli(A)
 - III-1. Polimerazy poli(A) (E.C.2.7.7.19)
 - III-2. Specyficzna poli(A) rybonukleaza-rybonukleaza IV (E.C.3.1.4.-)
- IV. Sekwencje sygnałowe dla poliadenylacji RNA *in vivo*
- V. Rola poli(A) w utrzymaniu stabilności mRNA w oocycie
- VI. Synteza i obrót sekwencji poli(A) w jajach po zapłodnieniu
- VII. Uruchamianie macierzystego mRNA
- VIII. Rola odcinków poli(A) w metabolizmie mRNA w oocycie i komórkach somatycznych

Contents

- I. Introduction
- II. Ribonucleoprotein complexes (RNP)
 - II-1. Nuclear hnRNP
 - II-2. Free cytoplasmic mRNP (informosomes)
 - II-3. Polyosomal mRNP
 - II-4. Other specific non-ribosomal RNP

*) dr; Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec 05-551.

Stosowane skróty: RNP — cząsteczki rybonukleoproteinowe, hnRNP — cząsteczki rybonukleoproteinowe zawierające heterogenny jądrowy RNA, mRNP — cząsteczki rybonukleoproteinowe zawierające informacyjny RNA, poli(A)⁺RNA- poliadenylowany RNA, mRNA- informacyjny RNA, hnRNA- heterogenny jądrowy RNA, poli(A) — segment poliadenylowy, A_n — segment poliadenylowy zawierający n reszt adenilowych, S — stała sedimentacji.

III. Enzymes participating in poly(A) metabolism**III-1. Poly(A) polymerases (E.C.2.7.7.19)****III-2. Specific poly(A) ribonuclease IV (E.C.3.1.4.-)****IV. Signal sequences for *in vivo* RNA polyadenylation****V. Role of poly(A) tracts in mRNA stability in oocyte****VI. Synthesis and turnover of poly(A) tracts in fertilized egg****VII. Activation of maternal mRNA****VIII. Role of poly(A) tracts in mRNA metabolism in oocyte and somatic cells****I. Wstęp**

Szereg hipotez usiłujących wyjaśnić rolę poliadenylacji i fragmentów poliadenylowych w funkcjonowaniu komórki (patrz przegląd 1—3) sprowadza się głównie do 3 założeń:

1. Udziału segmentów poli(A) w przetwarzaniu hnRNA do mRNA i jego transporcie do cytoplazmy. Za takim tłumaczeniem przemawiała obecność sekwencji poli(A) na końcu 3' zarówno w hnRNA jak i w mRNA. Sugerowało to umiejscowienie sekwencji kodujących mRNA na końcu 3' w hnRNA i ich konserwatywne odcinanie i przemieszczanie razem z fragmentem poli(A) do cytoplazmy. Przeciwno takiej interpretacji przemawia jednak istnienie informacyjnych RNA, które mimo braku poli(A) (np. mRNA histonowy) przechodzą do cytoplazmy; także inne mRNA przy zahamowaniu poliadenylacji przez użycie inhibitorów (kordycepina) są w jądrze prawidłowo składane (4), przemieszczają się do cytoplazmy i tworzą polisomy (5) — a więc obecność odcinka poli(A) nie jest niezbędna do prawidłowego utworzenia mRNA i jego transportu z jądra do cytoplazmy. Okazało się też, że część hnRNA, mimo że jest poliadenylowana, ulega w jądrze rozkładowi i nie przechodzi do cytoplazmy. Zatem prostą zależność: prekursor → produkt między poli(A)⁺hnRNA i poli(A)⁺mRNA należy wykluczyć (2, 6).

2. Znaczenia poli(A) w procesie translacji, które zakładano na podstawie wykrycia poliadenylacji cytoplazmatycznej (7, 8). Jednakże wkrótce stwierdzono, że segment poli(A) nie jest w ogóle konieczny do translacji w układach *in vitro* (9—12), a wydajność translacji i jej poszczególnych etapów (inicjacji i elongacji) *in vivo* w komórkach L nie zależy od długości odcinka poli(A) (10). Zależność odwrotna, tj. zależność syntezy i transportu mRNA do cytoplazmy oraz jego rozkładu od translacji, również nie ma miejsca, gdyż procesy te przebiegają normalnie przy zahamowaniu translacji (13).

3. Udziału segmentu poli(A) w kontroli stabilności mRNA w komórce — poprzez jego związek z białkami, zależnie od długości łańcucha poli(A) może być kontrolowany okres półtrwania mRNA w jądrze i cytoplazmie. Pogląd taki w miarę nagromadzenia faktów zyskuje sobie coraz więcej zwolenników (14—17).

Poniżej zostanie rozpatrzona głównie ta ostatnia hipoteza, ze szczególnym uwzględnieniem procesów związanych z aktywacją macierzystego mRNA po zapłodnieniu i zachodzących we wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego.

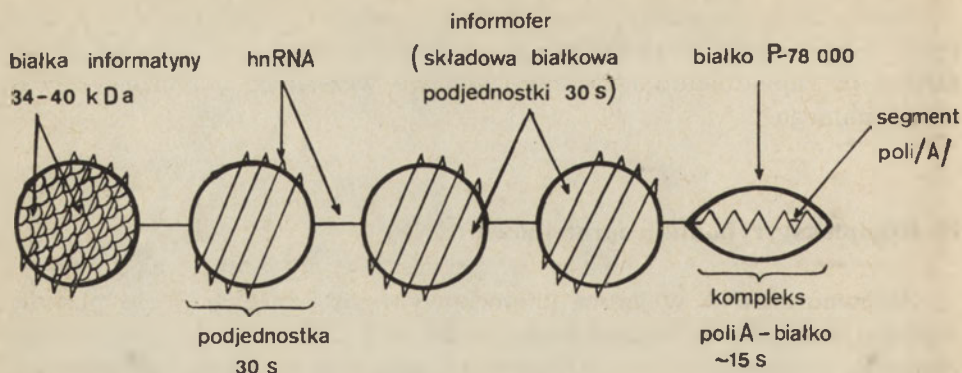
II. Kompleksy rybonukleoproteinowe (RNP)

Zarówno hnRNA w jądrze komórkowym jak i mRNA w cytoplazmie występują zawsze w postaci kompleksów z białkami. Kompleksy RNA-białko są wysoce specyficzne (składniki te występują zwykle w stosunku stechiometrycznym 1:3—1:4) i kompleksy sedimentują w gradiencie CsCl w paśmie o gęstości około 1.4 g/cm^3 , co wskazuje, że są one znacznie bogatsze w białka niż rybosomy (18—22).

Można wyróżnić 3 główne klasy nierybosomalnych kompleksów rybonukleoproteinowych (RNP): a) jądrowe hnRNP o wysokiej stałej sedimentacji sięgającej 400 S, b) wolne cytoplazmatyczne mRNP o stałej sedimentacji rzędu 9—110 S i c) polisomalne mRNP rzędu 15—70 S uwalniane ze struktur polisomalnych działaniem EDTA lub puromycyny. Wolne cytoplazmatyczne mRNP nazywane są też informosomami (18—20) i terminu tego nie należy stosować do innych rodzajów mRNP. Spotyka się też określenie „informosomy jądrowe” na oznaczenie podjednostek 30 S (hnRNA + białka) w hnRNP (23) — patrz rycina 1. W literaturze anglosaskiej na określenie tej podjednostki 30 S, używany jest czasem termin „informofer” (np. 24), który to termin oryginalnie zaproponowany był przez Samarinę i wsp. (18, 25) na oznaczenie składowej białkowej występującej w podjednostce 30 S. Wdalszym ciągu, dla uniknięcia nieporozumień, będą używane terminy: hnRNP, wolne cytoplazmatyczne mRNP (= informosomy), polisomalne mRNP oraz podjednostka 30 S.

II-1. Jądrowe hnRNP

Duże kompleksy białkowe hnRNP o stałej sedimentacji do 400 S można wyodrębnić z jądra w obecności inhibitorów rybonukleazy. W latach siedemdziesiątych postulowano model, według którego kompleksy hnRNP zbudowane są z podjednostek, o stałej sedimentacji 30 S, ułożonych paciorkowo, podobnie jak rybosomy w strukturach polisomów lub nukleosomy w chromatynie (Ryc. 1). W skład podjednostki 30 S, wchodzi globularna komponenta białkowa o średnicy 200 \AA o masie cząsteczkowej 40 000 i z nici RNA długości około 570 nukleotydów (18—20, 26). Oba składniki takiej podjednostki 30 S, tj. białko i RNA, dysocjują przy wysokim stężeniu soli (2—3 M NaCl) i reasocjują po zmniejszeniu jej stężenia (23). Przy



Ryc. 1. Schemat budowy poli(A)+hnRNP

końcu 3' w poli(A)⁺hnRNA znajduje się kompleks poli(A) — białko (patrz rozdz. II-4). Taki schemat budowy hnRNP w świetle nowszych danych wydaje się jednak zbyt uproszczony, zwłaszcza jeśli chodzi o skład komponenty białkowej i występowanie struktur drugorzędowych w hnRNP. Doniesienia o tworzeniu się wtórnych agregatów w trakcie trawienia hnRNA rybonukleazami (22, 27) również skłaniają do ostrożnej oceny proponowanych modeli budowy hnRNP.

Większość komponenty białkowej w podjednostkach 30 S stanowi niewiele białek (około 6), o stosunkowo niskiej masie cząsteczkowej 34—40 000, które są wysoce konserwatywne w rozwoju filogenetycznym. Cechą charakterystyczną białek podjednostki 30 S jest obecność w nich zmodyfikowanego aminokwasu N,N-dwumetyloargininy, który może służyć jako wskaźnik ich występowania (28). Są jednak także doniesienia, że w kompleksach hnRNP występuje aż około 90 różnych białek, które są bardziej heterogenne pod względem masy cząsteczkowej, mieszczące się w granicach 25—200 kDa (21, 22, 29). Różnice pomiędzy danymi pochodzącymi z różnych pracowni wynikać mogą z różnej zdolności rozdzielczej stosowanych metod (elektroforeza 1-no lub 2-kierunkowa), z różnej siły wiązania poszczególnych białek w strukturze hnRNP lub z ich umiejscowienia na nici hnRNA oraz z różnego biologicznie materiału doświadczalnego. Białka w podjednostkach 30 S hnRNP związane są, jak to wykazano stosując hybrydyzację DNA-RNA, tak z sekwencjami intronów jak i z sekwencjami kodującymi, przy czym te ostatnie są silniej chronione przed działaniem rybonukleaz niż sekwencje intronowe (30). Z białkami związane są również sekwencje poli(A) w hnRNP. Przy wyodrębnianiu jądrowych hnRNP bez obecności inhibitora rybonukleazy, względnie przy łagodnym nadtrawianiu hnRNP rybonukleazą, sekwencje poli(A) są odcinane i w gradiencie sacharozy uzyskuje się kompleksy poli(A)—białko o stałej sedymentacji 15 S, w których z odcinkiem poli(A) związane jest białko o masie cząsteczkowej 78 kDa (31, 32) oznaczane też jako białko 75 kDa (2) lub 73 kDa (21).

II-2. Wolne cytoplazmatyczne mRNP (informosomy)

Wolne cytoplazmatyczne mRNP sedymentują w gradiencie sacharozy w zakresie 9—110 S (17—18, 33—36), a zawarte w nich mRNA — w zakresie 4—32 S. Zwykle w cięższych mRNP znajdują się dłuższe łańcuchy mRNA. Główne pasmo przy wirowaniu w gradiencie CsCl odpowiada gęstości 1.4 g/cm³, ale obserwuje się też inne pasma w obszarze nieco większej (1.43—1.48 g/cm³) i nieco mniejszej (1.35—1.38 g/cm³) gęstości (18). Informacyjny RNA w wolnych cytoplazmatycznych mRNP jest bardziej wrażliwy na działanie rybonukleazy niż sekwencje mRNA w hnRNP (37). Oczyszczone mRNP zawierają zwykle około 10—12 głównych białek o masie cząsteczkowej 40—130 kDa (33—35, 38). Białka te są odmienne od białek wchodzących w skład hnRNP i polisomalnych mRNP (17, 18, 39—41).

II-3. Polisomalne mRNP

Polisomalne mRNP otrzymywane są po traktowaniu polisomów EDTA lub puromycyną. Wirowane w gradiencie CsCl lokują się w dość szerokim paśmie 1.4—1.5 g/cm³, w gradiencie sacharozy sedymentują w granicach 15—70 S, przy czym rozmieszczenie głównego szczytu zależy od źródła i sposobu wyodrębniania polisomów. Informacyjny RNA z polisomalnych mRNP sedymentuje w granicach 8—30 S z maksimum zwykle przy 18 S, z wyjątkiem mRNA z komórek wyspecjalizowanych wytwarzających głównie nieliczne specyficzne białka. W retikulocytach, globinowy 9 S mRNA związany z białkiem w polisomalnych mRNP występuje w wyraźnym szczycie 15 S (18, 38, 40).

W polisomalnych mRNP występuje zwykle mniej specyficznych białek niż w wolnych cytoplazmatycznych mRNP. Z reguły obserwuje się 2 główne białka około 52 i 78 kDa (15, 33, 40, 42, 43) i kilka polipeptydów w zakresie 45—68 kDa i 80—130 kDa występujących w mniejszej ilości.

II-4. Inne specyficzne nierybosomowe RNP

Kompleksy poli(A) — białko. Obecność białek związanych z odcinkiem poli(A) wykazano w hnRNP, wolnych cytoplazmatycznych mRNP i polisomalnych mRNP. Kompleksy poli(A)—białko, uwolnione po strawieniu nukleazami z polisomów i wolnych cytoplazmatycznych mRNP sedymentowały w obszarze 8—12 S (2, 3, 18) lub 15 S — w przypadku hnRNP (26). Analizy kompleksów poli(A)—białko wykazały obecność białek P-52 000 i P-78 000 w wolnych i polisomalnych mRNP (2, 3, 33, 42), podczas gdy w hnRNA z poli(A) związane jest tylko białko P-78 000. Po-

wszechność występowania białka P-78 000 w wolnych cytoplazmatycznych mRNP jest jednak dyskusyjna. Jego obecność stwierdzono w kompleksach pochodzących z mięśni embrionów kurzych (33), z komórek chłonia-ka myszy (15), z kryptobiotycznej gastruli *Artemia* (44), z jaj i zygoty jeżowca (35) oraz z mikroplazmodiów i przetrwalników *Physarum* (45). Natomiast w wolnych cytoplazmatycznych mRNP o stałej sedymentacji 20 S, zawierających mRNA globinowy, nie znaleziono białka P-78 000 (39, 46). U *Physarum* obecność kompleksu poli(A)—białko stwierdzono tylko w wolnych cytoplazmatycznych mRNP zawierających odcinki poli(A) rzędu $\sim A_{65}$, natomiast w polisomalnych mRNP, w których sekwencje poli(A) były o wiele krótsze $\sim A_{15}$, kompleks białkowy z taką sekwencją w ogóle się nie tworzył (47, 48). Wiążące się z sekwencją poli(A) białko P-78 000 jest antygenowo pokrewne lub identyczne z polimerazą poli(A) (E.C.8.7.7.19) (49). Z sekwencją poli(A) białko to tworzy powtarzalne struktury, o wielokrotności A_{20} (43, 50) czy też A_{27} (51), podobne do budowy nukleosomów w chromatynie. Odsłonięte miejsca w łańcuchu poli(A) co 20—27 nukleotydów są zapewne bardziej podatne na działanie nukleaz poli(A). Takie periodyczne struktury nie występowały jednak w odcinku poli(A) w hnRNP (51).

W polisomalnych mRNA kompleks poli(A)—białko P-78 000 obejmuje też kilkanaście nukleotydów przyległych do odcinka poli(A), a ponadto też wiąże sekwencje znajdujące się przy końcu 5' nadając mRNP określoną strukturę trzeciorzędową (16, 43).

Macierzyste zapasowe mRNP. Macierzyste mRNP w komórkach jajowych jak też zapasowy mRNA obecny w komórkach w spoczynkowych lub abiotycznych stanach organizmu, występują w translacyjnie nieczynnej, zamaskowanej postaci jako cytoplazmatyczne kompleksy z białkami. Takie nieczynne zapasowe mRNA są bardziej heterogenne co do wielkości niż wolne cytoplazmatyczne mRNP z metabolicznie czynnych komórek somatycznych. Wolne cytoplazmatyczne mRNP z kryptobiotycznej gastruli *Artemia salina* sedymentowały w zakresie 10—120 S (44), a mRNP z jaj jeżowca, w obecności jonów Ca^{+2} , tworzył ciężkie agregaty 300—400 S złożone z mniejszych podjednostek 20—60 S (52), co będzie szerzej dyskutowane w rozdz. VII.

RNA związany w wolnych cytoplazmatycznych mRNP z jaj i zarodków jeżowca oraz z kryptobiotycznej gastruli *Artemia* nie ulegał translacji *in vitro* w układzie z kielków pszenicy, jaj jeżowca i retikulocytów królika w warunkach, w których zachodziła translacja polisomalnych mRNP z zarodków jeżowca i odbiałzonego mRNA z tych wolnych cytoplazmatycznych mRNP (36, 39, 46, 53, 54).

W skład zapasowych mRNP z jaj jeżowca i z kryptobiotycznej gastruli *Artemia* wchodziło 15—20 i więcej różnych białek, a więc więcej niż w wolnych cytoplazmatycznych mRNP z komórek metabolicznie czynnych (34, 35, 44). U *Physarum polycephalum* natomiast zestaw białek

mRNP w formach przetrwalnikowej i aktywnej metabolicznie jest podobny pod względem ruchliwości elektroforetycznej (45). Przytoczone dane nie są jednak całkowicie porównywalne ze względu na różnice w technikach izolowania (siła jonowa, stężenie jonów jedno i dwuwartościowych, obecność jonów fosforanowych), które mogą spowodować różnice w składzie otrzymywanych kompleksów białkowych (34, 35). W zapasowych cytoplazmatycznych mRNP znaleziono również białko o ruchliwości elektroforetycznej podobnej do białka P-78 000 związanego z odcinkiem poli(A) w mRNP z komórek aktywnych metabolicznie, ale występowało ono w niewielkich ilościach (34, 35, 45, 55). Z fragmentem poli(A) w macierzystych cytoplazmatycznych mRNP z jaj i jednokomórkowej zygoty jeżowca związane były głównie białka o masie cząsteczkowej 87 i 130 kDa (55), a w kryptobiotycznej gastruli *Artemia* — białko o masie cząsteczkowej 38 kDa występowało na segmencie poli(A) periodycznie co 20 reszt poliadenilowych (50)

III. Enzymy uczestniczące w metabolizmie poli(A)

III-1. Polimerazy poli(A) (E.C.2.7.7.19)

Polimerazy poli(A) wykryto zarówno w jądrze jak i w cytoplazmie u prokariotów i eukariotów (56—61) — patrz tabela 1. Występują one w preparatach chromatyny, nierybosomalnych RNP, rybosomów lub w postaci wolnej.

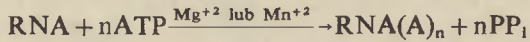
Tabela 1

Niektóre właściwości polimeraz poli(A)*

| Źródło polimerazy | Masa cząsteczkowa (kDa) | Zależność od jonów | Primer | Substrat | Bibliografia |
|--|-------------------------|--------------------|--------------------------|-------------|--------------|
| Komórki HeLa: | | | | | |
| jądra | 50 | Mn, Mg | RNA | ATP | 58 |
| cytoplazma | 75 | Mn | RNA, oligo(A) | ATP | 58 |
| transformowane wirusem <i>Vaccinia</i> | {57 37} dimer | Mn, Mg | RNA, oligo(A) | ATP | 58 |
| Rak wosniowy Ehrlicha: | | | | | |
| cytosol | — | Mn, | poli(A) i rRNA(słaby) | ATP | 60 |
| rybosomy | — | Mn, Mg | poli(A) ⁺ RNA | ATP, UTP | 60 |
| Jaja jeżowca: | | | | | |
| jaja całe | — | Mn | (A) ₁₁ | AMP | 62 |
| cytoplazma | — | Mn | (A) ₁₆ | ATP | 64 |

* Obszerna lista polimeraz poli(A) wykrytych do roku 1976 znajduje się w pracy Edmonds i Winters (57).

Enzymy te katalizują reakcję:



W zależności od pochodzenia enzymu, a także od stężenia primera dla aktywności enzymu wymagane są jony Mg^{+2} lub Mn^{+2} (lub oba). Polimeryzy pol(A) są bardziej wrażliwe na wielkość siły jonowej niż polimeryzy RNA, i stężenia soli wymagane dla aktywności polimeryzy RNA (zwykle 0.1 M KCl) już hamują aktywność polimeraz pol(A).

Polimeryzy pol(A) zwykle nie wykazują w warunkach *in vitro* specyficzności co do rodzaju primera. Reszty adenilowe mogą być przyłączane do wszelkich rodzajów RNA jak np. rRNA, poli(A)⁺RNA, tRNA, a także do poli(A) i oligo(A), z tym, że indywidualne enzymy pochodzące z różnych źródeł mają jednak bardziej specyficzne wymagania co do rodzaju primera (patrz Tab. I). Dopiero niedawno ustalono warunki poliadenylacji w układzie *in vitro* pozwalające na ujawnienie się specyficzności enzymu i poliadenylację tylko takich pre-mRNA, które zawierają odpowiednie sekwencje przy końcu 3' (61a).

Masy cząsteczkowe polimeraz jądrowych wykazują zadziwiającą różnorodność — od 50 000 w przypadku enzymu z jąder komórek HeLa do 150 000 w przypadku enzymu z jąder komórek grasicy cielęcej. Polimeryzy cytoplazmatyczne są bardziej jednorodne pod względem masy cząsteczkowej (58). Przypuszcza się, że polimeryzy o mniejszej masie cząsteczkowej są produktami cięcia większych polipeptydów, przy zachowaniu właściwości enzymatycznych i antygenowych. Stwierdzono też immunogenetyczne podobieństwo polimerazy pol(A) i białka P-75 000 związanego z fragmentem poli(A) w polisomalnych mRNP komórek HeLa (49) (białko P-75 000 odpowiada białku P-78 000, różnice wynikają z przybliżonej oceny masy cząsteczkowej według migracji w żelu).

Aktywność polimeraz pol(A) wykryto również w niezaplodnionych jajach i wczesnych, 4-komórkowych, zarodkach jeźowca oraz we frakcjach cytoplazmatycznych tych zarodków (62-64).

III-2. Specyficzna poli(A) rybonukleaza IV (E.C.3.1.4.-)

Rybonukleaza ta została wyodrębniona i oczyszczona z jajowodu przepiórki japońskiej i kury (65, 66). Rybonukleaza IV o masie cząsteczkowej 45 kDa i działaniu endonukleolitycznym, specyficznie tnie pojedynczy łańcuch poli(A) na fragmenty o długości 10 nukleotydów. Enzym ten wymaga obecności jonów Mg^{+2} (optimum 1 mM) lub Mn^{+2} (optimum 0.5 mM) i działa optymalnie przy pH 8.7. Umiejscowiona jest głównie w jądrze (około 90% zawartości) w ilości 40 000 cząsteczek na komórkę i występuje razem z polimerazą poli(A) zależną od Mg^{+2} , od której trudno daje się oddzielić i która często maskuje działanie rybonukleazy poli(A). Aktywność rybo-

nukleazy IV w przeliczeniu na 1 cząsteczkę wynosi około 1 700 cięć/min. i jest zbliżona do aktywności polimerazy poli(A) z grasicy cielej, która syntetyzuje około 1800 nukleotydów/min. Rybonukleaza IV nie działa na pozostałą niepoliadenylową część łańcucha RNA i nie rozkłada polisomów przy inkubacji *in vitro*.

Wykrycie rybonukleazy specyficznej wobec poli(A) u eukariotów pozwala na lepsze zrozumienie niektórych procesów w metabolizmie RNA jak np. obrót hnRNA (turnover) i jego przetwarzanie (processing) w jądrze, regulacja stabilności mRNA, kontrola obrotu odcinka poli(A) w zygocie i w czasie pierwszych podziałów komórkowych zarodka (patrz rozdz. VI) oraz regulacji uczynniania macierzystych zapasowych mRNA.

IV. Sekwencje sygnałowe dla poliadenylacji RNA *in vivo*

Wydaje się, że sekwencją rozpoznawaną przez enzymy przetwarzające i poliadenylujące hnRNA jest sekwencja 5' AAUAAA 3' powszechnie występująca przy końcu 3' znanych mRNA u wyższych eukariotów (67—70). W mRNA lizozymu kurczęcia (71) i mysiej amylazy (72) rolę tę spełnia prawdopodobnie sekwencja 5' AUUAAA 3'.

Przy pomocy analizy restrykcyjnej wykazano, że poliadenylacja różnych mRNA wirusa SV 40 zachodzi w odległości 11—19 nukleotydów w stronę końca 3' od sekwencji AAUAAA (70). W przypadku innych mRNA ta odległość od sekwencji sygnałowej utrzymuje się w zakresie 13—30 nukleotydów (69, 73, 74). Ostatnio wykazano, że podstawienie G w miejsce U w sekwencji AAUAAA nie wpływa znacząco na wydajność procesu poliadenylacji ale raczej obniża wydajność „przycinania” (cleavage) transkryptu pierwotnego w przypadku jednego z genów adenowirusa Ad 2. Nie jest jednak wykluczone, że oba te procesy (przycinanie i poliadenylacja) mogą być sprzężone (74a). Prawdopodobnie jednak sekwencja AAUAAA nie jest jedynym sygnałem rozpoznawczym i dodatkowo wymagane są również inne proste sekwencje (GA, CA, UA) lub struktury drugorzędowe, czy też określone kombinacje sekwencji i struktur drugorzędowych (70).

V. Rola poli(A) w utrzymaniu stabilności mRNA w oocyocie

Zaobserwowano, że stabilność mRNA w oocyocie płatkiny (*Xenopus*) zależy od długości odcinka poli(A) (14, 75—77). Dla zachowania natywnej stabilności mRNA globinowego wprowadzonego do oocyty konieczny był odcinek poli(A), o długości co najmniej A_{30} . W przypadku łańcuchów poli(A) krótszych niż A_{30} degradacja mRNA była szybsza, a mRNA zawierające tylko 16 reszt adenilowych było rozkładane tak szybko jak mRNA

całkowicie pozbawione poli(A) (77). Ponowne dodanie odcinka poli(A) na końcu 3' mRNA uprzednio pozbawionego sekwencji poli(A), przywracało mu pierwotną stabilność (76).

Zależność okresu półtrwania mRNA od długości odcinka poli(A) wykazano też w przypadku wirusowych mRNA w transformowanych wirusom Ad2 komórkach zarodka mysiego (78), w komórkach HeLa (5) i komórkach jajnika chomika (79). Skracanie mRNA globinowego w miarę upływu czasu stwierdzono też w erytrocytach (80). Wszystkie te dane przemawiają za udziałem sekwencji poli(A) na końcu 3' mRNA w zachowaniu trwałości całej cząsteczki.

VI. Synteza i obrót sekwencji poli(A) w jaju po zapłodnieniu

W oocytach i bruzdkujących zarodkach jeźowca (81), w oocytach *Xenopus* (82), w bruzdkujących zarodkach przepiórki japońskiej (83) i w jedno i dwukomórkowych zarodkach myszy (84) oprócz odcinków poli(A) o normalnej długości 100—150 nukleotydów stwierdzono obecność odcinków krótkich, liczących 10 lub 20—40 reszt adenilowych.

W oocytach *Xenopus* podczas intensywnej syntezy RNA (okres prewitellogenazy), obserwowano dłuższe odcinki poli(A) zawierające 60—80 reszt adenilowych (82). W okresie tym ponad 70% poli(A)⁺ RNA znajduje się na polisomach (85). Natomiast w dojrzałych oocytach, w których synteza RNA jest zahamowana, przeważają krótsze odcinki poli(A) rzędu 20—40 nukleotydów (82), a 70—90% poli(A)⁺ RNA występuje w formie nieczynnych zapasowych mRNP (82, 85, 86). Powyższe dane otrzymywano w przypadku oocytów bez ich uprzedniego rozdziału na jądra i cytoplazmę. Biorąc jednak pod uwagę niewielką objętość jądra w stosunku do cytoplazmy, przyjmuje się uproszczone założenie, że większość RNA znajdowała się na terenie cytoplazmy. Podobne krótkie fragmenty poli(A) zbudowane z 20—40 nukleotydów w nieczynnej zapasowej formie mRNA w oocycie i ich wydłużanie się po zapłodnieniu obserwowano w przypadku 4 różnych mRNA u *Spisula* (87). Wydaje się więc, że występowanie macierzystego mRNA w nieczynnej postaci zapasowych mRNP może być związane ze skróceniem odcinka poli(A). Krótsze odcinki poli(A) stwierdzono również w globinowym mRNA znajdującym się w wolnych cytoplazmatycznych mRNP, w porównaniu z ich długością w mRNP polisomalnych (88).

Po zapłodnieniu jaja, w czasie pierwszego podziału bruzdkowania zawartość sekwencji poli(A) wzrasta znacznie w porównaniu z jego zawartością w jaju niezapłodnionym u myszy (84), jeźowca (89—92) i robaka morskiego *Urechis caupa* (93). Prawdopodobnie nasileniu poliadenylacji po zapłodnieniu nie towarzyszy zwiększenie aktywności polimeraz poli(A),

bowiem w niezaplodnionym jajku i we wczesnym zarodku aktywność polimeraz poli(A), oznaczona w warunkach *in vitro*, była podobna (62, 63).

Poliadenylacji ulegają macierzyste mRNA zgromadzone w oocycie, których fragmenty poli(A) ulegają destrukcji i z kolei odnawiają się i wydłużają (83, 90, 92). Zjawisko to określa się jako obrót (turnover) odcinka poli(A). Wydaje się, że po uwolnieniu macierzystego mRNA z macierzystych zapasowych mRNP jednocześnie zachodzi degradacja odcinka poli(A) od końca 3' i cięcia endonukleolityczne wewnątrz segmentu poli(A), a do tak skróconych odcinków A_n pozostałych na mRNA szybko dołączane są nowe reszty adenilowe i w rezultacie powstaje odbudowany i wydłużony segment poli(A) przy „starym” macierzystym mRNA.

Jeśli weźmie się pod uwagę wspomniane już endonukleolityczne działanie jądrowej rybonukleazy poli(A) (patrz rozdz. III-2) można założyć, że w toku częstych podziałów komórkowych po zapłodnieniu i związanych z nimi okresowych zaników błony jądrowej, enzym ten może przedostawać się do cytoplazmy gdzie rozkłada nieosłonięte przez białko sekwencje odcinka poli(A) powodując jego szybką degradację. Jednocześnie reszty adenilowe są stale dołączane na końcu 3' sekwencji A_n związanych z mRNA, co sprawia, że powstają nowe fragmenty poli(A) o normalnej długości 100—150 nukleotydów.

Hipotezę tę potwierdzają obserwacje dotyczące wczesnego zarodka myszy (84), w którym ilość macierzystego mRNA jest niewielka (0,35 ng/ /jajo), a podziały bruzdkowania, jak wiadomo, zachodzą stosunkowo powoli (co 24 godz) w porównaniu z szybkimi podziałami bruzdkowania u ptaków czy jeźowców (co 30—120 min). U myszy więc nie obserwuje się szybkiego obrotu odcinków poli(A), tak charakterystycznego dla jeźowców, *Urechis caupa* czy ptaka, a zawartość poli(A) po zapłodnieniu wzrasta w mniejszym stopniu (o 20%) niż u jeźowców i *Urechis* (o 200—300% (89—93)) i po pierwszym podziale komórkowym spada aż o 70% (84). Być może ten proces degradacji i ponownej syntezy odcinków poli(A) jest związany z mechanizmem uruchamiania macierzystych mRNA.

VII. Uruchamianie macierzystego mRNA

Po zapłodnieniu jaja, w czasie pierwszych podziałów komórkowych, jednocześnie ze wzrostem ilości poli(A) obserwuje się przemieszczanie rybosomów z frakcji monosomalnej i poli(A)⁺RNA z macierzystych mRNP do frakcji polisomalnej (81, 86, 92, 94). Mechanizmy regulujące te przejścia nie są znane, ale jeśli rozpatruje się je w powiązaniu z szeregiem zmian fizjologicznych zachodzących po zapłodnieniu, można przypuszczać, że jednym z nich jest proces proteolizy i/lub dysocjacji białek związanych z mRNA w kompleksach mRNP.

Na obwodzie jaja pod powierzchnią błony plazmatycznej znajdują się

pęcherzykowate, granularne struktury tzw. ziarna korowe. Ziarna te zawierają mukopolisacharydy, niespolimeryzowaną aktywną, oraz szereg enzymów między innymi proteolitycznych. Ostatnio, w ziarnach korowych w jaju i wczesnych zarodkach *Chaetopterus* stwierdzono także obecność poli(A)⁺RNA (95). Natychmiast po zapłodnieniu (20 sek) następuje w jaju tzw. reakcja korowa polegająca na wyrzuceniu do przestrzeni pozakomórkowej zawartości ziaren korowych. Reakcja korowa rozpoczyna się w miejscu wnikięcia plemnika i jest spowodowana bezpośrednio miejscowym wzrostem stężenia jonów Ca⁺² i dalej rozprzestrzenia się na całej powierzchni jaja (96, 97). W czasie tej reakcji uwalniają się trypsyno-podobne enzymy proteolityczne, które odgrywają rolę w oddzieleniu błony plazmatycznej od błony witelinowej, zniszczeniu receptorów plemników na błonie witelinowej oraz ewentualnie w strawieniu treści ziaren korowych (97, 98). Znaczna część tych enzymów pozostaje jednak w cytoplazmie lub związana z błonami (99).

Niezapłodnione jaja jeżowca zawierają proteazy w formie nieczynnej, które po wyizolowaniu można poprzez dializę przeprowadzić w formę aktywną, podobną co do działania i wielkości cząsteczki do czynnego enzymu obecnego w jajach zapłodnionych (99). W homogenatach z jaj jeżowca, w obecności jonów Ca⁺², macierzyste mRNA znajdowano w ciężkich agregatach o stałej sedimentacji rzędu 300—400 S, które z kolei składały się z agregatów mniejszych podjednostek rzędu 20—60 S. Autorzy nie wykluczają możliwości, że te ciężkie 300—400 S agregaty były identyczne z ziarnami korowymi (52), co z kolei pozwala sądzić, że mniejsze podjednostki 20—60 S mogłyby odpowiadać macierzystym zapasowym mRNP. W homogenatach z jaj jeżowca w ciągu około 10 min po zapłodnieniu zachodzi okresowa aktywacja proteazy obecnej w osadzie tych ciężkich 300—400 S agregatów, wygasająca w ciągu następnych 60 min. Równocześnie, bezpośrednio po zapłodnieniu, macierzysty mRNA wykrywany jest nie w tych wielkich 300—400 S agregatach, ale we frakcji mikrosomalnej. Podobne przemieszczenie mRNA można też wywołać przez lekką trypsynizację homogenatu z jaj niezapłodnionych, przy czym obserwuje się wówczas pojawienie się struktur o charakterze polisomów (52).

Wniknięcie plemnika lub partenogenetyczna aktywacja powoduje uwolnienie jonów Ca⁺² z nieznanego jak dotąd miejsca ich wiązania w komórce jajowej (97, 98), którym są być może te ciężkie mRNP. Reakcja korowa i wzrost pH w komórce jajowej po zapłodnieniu wywołują uwolnienie i aktywację proteaz, które rozkładając część białek mRNP związanych z macierzystymi mRNA mogą powodować ich przejście do frakcji wolnych cytoplazmatycznych i polisomalnych mRNP. Po takim proteolitycznym rozkładzie macierzystych mRNP i częściowym nawet odsłonięciu odcinków poli(A), przy częstym zaniku błony jądrowej podczas bruzdkowania, mogą zaistnieć warunki sprzyjające degradacji fragmentów poli(A) przez jądrową rybonukleazę specyficzną dla poli(A) oraz ich odbudowy w pro-

cesie cytoplazmatycznej poliadenylacji, po ponownym wytworzeniu błony jądrowej (patrz rozdz. VI).

Na zasadzie podobnego mechanizmu, tj. proteolitycznego uwalniania mRNA od białek tworzących struktury mRNP, można też tłumaczyć zjawisko indukcji embrionalnej. Indukcja embrionalna jest to wzajemne oddziaływanie różnych części organizmu w czasie jego rozwoju, prowadzące do różnicowania się tkanek. Induktorem (czynnikiem indukującym) jest substancja wydzielana przez jedną z części organizmu, lub dostarczona z zewnątrz, powodująca różnicowanie się innej części organizmu w określona tkankę. W rozważaniach nad istotą induktorów naturalnych przeważa pogląd, że mają one charakter białkowy — przy ich ekstrakcji fenolem z materiału biologicznego plasują się bowiem w interfazie i fazie fenolowej oraz są wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych, a niewrażliwe na działanie rybonukleaz (100, 101).

Trudny do zrozumienia i obszernie dyskutowany jest niespecyficzny charakter zjawiska indukcji. Wywołują ją bowiem różne egzogenne induktory jak np.: sole, słabe kwasy i zasady, nukleoproteiny, zdegenerowane obce tkanki, zmiany pH, a także cytoliza części tkanki indukowanej. Poza tym, ten sam czynnik indukujący, zależnie od rodzaju indukowanego obszaru organizmu i jego kompetencji (tj. zdolności do różnicowania się w określoną tkankę), może powodować różnicowanie się w odmiennych kierunkach (100, 101).

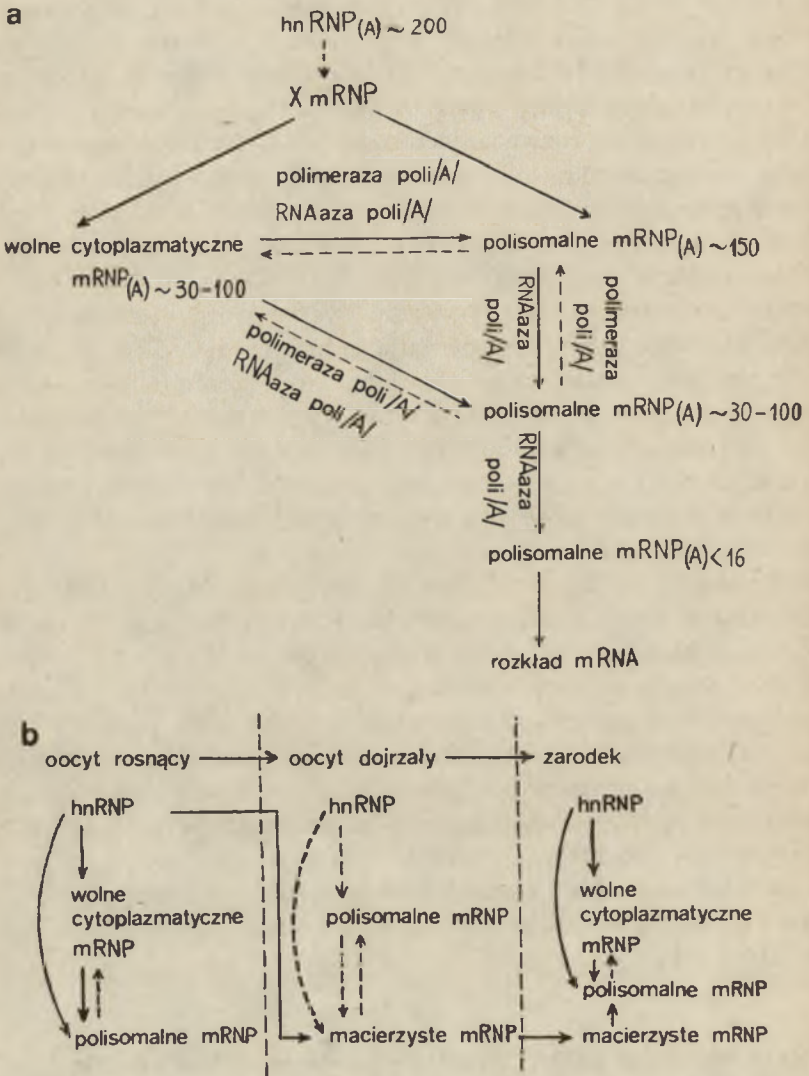
Jeżeli założyć, że indukcja embrionalna polega na uwolnieniu z zapasowych mRNA związanych z nich mRNP, np. przez strawienie lub od dysocjowanie białek, to bardziej zrozumiałym staje się różnorodny i pozornie nie mający ze sobą związku charakter czynników indukujących. Działanie każdego czynnika powodującego uwolnienie mRNA przez proteolizę lub częściowe nawet oddysocjowanie białek z mRNP może być działaniem indukującym pod warunkiem istnienia określonej kompetencji indukowanych komórek, polegającej na obecności w ich mRNP specyficznych mRNA. Postulowany mechanizm wymaga jednak założenia pewnej nierównomierności rozmieszczenia mRNA w różnych komórkach zarodka, co zresztą znajduje obecnie coraz szersze potwierdzenie doświadczalne (102—111).

VIII. Rola odcinków poli(A) w metabolizmie mRNA w oocycie i w komórkach somatycznych

Hipotetyczny schemat metabolizmu mRNA w komórkach somatycznych i w oocycie, z uwzględnieniem obrotu odcinka poli(A) przedstawiono na rycinie 2.

Na rysunku tym oznaczono strzałkami możliwe przemieszczenia mRNA, wraz z jego odcinkiem poli(A) z jednej frakcji do innej. Część tylko no-

wosyntetyzowanego hnRNA, stanowiąca pulę prekursorów mRNA, po odpowiednim przetworzeniu przechodzi do cytoplazmy, podczas gdy większość powstającego hnRNA ulega degradacji w jądrze (112, 113). Po przejściu do cytoplazmy mRNA częściowo wchodzi w skład struktur poli-



Ryc. 2. Proponowany schemat obrotu odcinka poli(A) w komórkach somatycznych (a) i przemieszczania mRNA w oocyte i zarodku (b). Linia ciągłą oznaczono kierunek przemieszczania wykazany doświadczalnie, linią przerywaną zaś — hipotetyczny (patrz rozdz. VIII).

w (a) — przyjęto założenie, że polimerazy poli(A) i rybonukleazy mogą działać w trakcie przemieszczania się mRNA: polisomy \rightleftharpoons informosomy, a także w obrębie danej frakcji mRNP.

w (b) — dla uproszczenia pominięto hipotetyczną pulę XmRNP.

somów, a częściowo — wolnych cytoplazmatycznych mRNP i jest chroniony przed rozkładem przez związane z nim białka. Ponieważ forma mRNA w czasie przejścia z jądra do cytoplazmy nie jest znana, na Rys. 2a wprowadzono umowną pulę XmRNP, oznaczająca pulę mRNP przed ich rozdziałem pomiędzy frakcje polisomalnych i wolnych cytoplazmatycznych mRNP.

Mechanizm regulujący rozmieszczenie mRNA między te oba rodzaje mRNP nie jest znany i stanowi jedno z kluczowych zagadnień związanych z posttranskrypcyjną regulacją ekspresji genomu. Wiadomym jest, że ten sam mRNA może występować w tej samej komórce w formie czynnej na polisomach i formie nieczynnej w wolnych cytoplazmatycznych mRNP. Np. w erytrocytach kaczki, 92% globinowego mRNA znaleziono we frakcji polisomów, a tylko 8% we frakcji wolnych cytoplazmatycznych mRNP, przy czym polisomalne mRNP zawierały około 200 różnych mRNA, a wolne cytoplazmatyczne mRNP aż 1400 rodzajów mRNA (114). Macierzyste zapasowe mRNP jak również wolne cytoplazmatyczne mRNP są więc formą przechowywania w cytoplazmie tego mRNA, które w danym okresie nie ulega translacji. Przemieszczanie się mRNA z frakcji wolnych cytoplazmatycznych mRNP do polisomalnych mRNP wykazano doświadczalnie (48, 115, 116). O możliwości przemieszczania odwrotnego tj. z polisomów do wolnych cytoplazmatycznych mRNP (patrz Rys. 2a) przemawiają pewne dane pośrednie jak np.:

— wyższa aktywność globinowego mRNA z polisomów w porównaniu z jego aktywnością właściwą w wolnych cytoplazmatycznych mRNP przy znakowaniu ^{32}P (88),

— mniejsza długość odcinków poli(A) w wolnych cytoplazmatycznych mRNP niż w polisomalnych mRNP (82, 86, 88, 91), co może oznaczać, że są one „starsze”, względnie — że nie ulegają cytoplazmatycznej poliadenylacji.

Rozkład odcinka poli(A) pociągający za sobą prawdopodobnie rozkład pozostałego łańcucha mRNA może zachodzić conajmniej w wyniku 3 procesów:

— endonukleolitycznego działania rybonukleazy IV (65, 66) powodującej fragmentację odcinka poli(A) do oligonukleotydów A_{10} ,

— działania 3' egzorybonukleazy (E.C.3.1.4.20) powodującego skracanie odcinka poli(A) od końca 3' (56),

— specyficznego odcinania całego segmentu poli(A) w okolicy wiązania z pozostałą częścią łańcucha mRNA, prowadzącego czasem do całkowitej destrukcji tego segmentu (117).

W wyniku tych procesów powstają cząsteczki mRNA o skróconych odcinkach A_n lub też całkowicie ich pozbawione i zapewne mniej lub bardziej podatne na całkowitą degradację.

Jeden z tych procesów, polegający na stopniowym usuwaniu kilkunastu reszt adenilowych od końca 3' okazał się niewrażliwy na zahamowa-

nie translacji (elongacji) przez emetynę lub cykloheksimid (118, 119) co znaczy, że może on zachodzić w obrębie frakcji wolnych cytoplazmatycznych mRNP. Drugi, polegający na szybkiej destrukcji całego odcinka poli(A), ulegał zahamowaniu wraz z zahamowaniem elongacji (119) i w związku z tym można przypuszczać, że zachodził w trakcie translacji mRNA na polisomach.

Skrócenie odcinka poli(A) poniżej krytycznej długości A_{30} — powodując jego niezdolność do skompleksowania z odpowiednim białkiem, np. z poli(A) polimerazą (białko P-78 000), prowadziłoby do skrócenia okresu półtrwania mRNA, a w konsekwencji do jego całkowitej degradacji. Czynnikiem stabilizującym mRNA byłby proces cytoplazmatycznej poliadenylacji (rozdz. III-1) powodujący ponowne wydłużenie odcinka poli(A), a więc i zwiększenie zdolności jego kompleksowania z białkiem polimerazy. W rezultacie stan równowagi danego mRNA pomiędzy jego frakcją ulegającą degradacji i frakcją stabilną może być wynikiem długości jego odcinka poli(A), dostępności specyficznych białek dla wytworzenia kompleksów mRNP, aktywności polimeraz poli(A) oraz aktywności rybonukleaz uczestniczących w rozkładzie poli(A) i kodującej części łańcucha mRNA.

Opisane mechanizmy dotyczą wycinka postranskrypcyjnej regulacji ekspresji genomu, która u eukariontów, według „kaskadowej” regulacji Scherrera (120), jest procesem wieloetapowym. U eukariontów etap transkrypcji stanowi tylko pierwszy krok w procesie regulacji, a pozostałe (i główne) fazy zachodzą na poziomie posttranskrypcyjnym, w przeciwieństwie do prokariotów, gdzie regulacja ta odbywa się w zasadzie na etapie transkrypcji.

Pani prof. Z. Lassotowej z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN za krytyczną dyskusję i panu prof. M. Chorążemu za zwrócenie uwagi na prace zespołu dr. Monique Jacob ze Strasburga składam serdeczne podziękowania.

Zaakceptowano do druku 10.11.1984 r.

PISMIENICTWO

1. Brysch B., (1974), *Post. Bioch.*, **20**, 459—480.
2. Greenberg J. R., (1975), *J. Cell. Biol.*, **64**, 269—288.
3. Brawerman G., (1981) *Crit. Rev. in Bioch.*, **10**, 1—38.
4. Zeevi M., Nevins J. R., Darnell J. E. (1981) *Cell*, **26**, 39—46.
5. Zeevi M., Nevins J. R., Darnell J. E., (1982), *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 517—525.
6. Perry R. P., Kelley D. E., LaTorre J., (1974), *J. Mol. Biol.*, **82**, 315—331.
7. Diez I., Brawerman G., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 4091—4095.
8. Sawicki S. G., Jelinek W., Darnell J. E., (1977), *J. Mol. Biol.*, **113**, 219—235.
9. Mescher A., Humphreys T., (1974), *Nature*, **249**, 138—139.

11. Fromson D., Verma D. P. S., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 148—151.
12. Cereghini S., Geoghenan T., Bergman I., Brawerman G., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3153—3159.
13. Duncan R., Dower W., Humphreys T., (1975), *Nature*, **253**, 751—753.
14. Marbaix G., Huez G., Burny A., Cleuter Y., Hubert E., Leclercq M., Chantrenne H., Soreq H., Nudel U., Littauer U. Z., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3065—3067.
15. Müller W. E. G., Arendes J., Zahn R. K., Schröder H. C., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **86**, 283—290.
16. Adams D. S., Noonan D., Jeffrey W. R., (1980), *FEBS Letters*, **114**, 115—118.
17. Vincent A., Goldenberg S., Standart N., Civelli O., Imaizumi-Scherrer I., Maundrell K., Scherrer K., (1981), *Mol. Biol. Rep.*, **7**, 71—81.
18. Samarina O. P., Lukanidin E. M., Georgiev G. P., (1973), w „Protein Synthesis in Reproductive Tissues”, 6th Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology, red. Diczfalusy, 130—167, Bogtrykkeriet Forum, Copenhagen.
19. Probozhenksy A. A., Spirin A. S., (1978), *Progress in Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **21**, 1—38.
20. Spirin A. S., (1978), *FEBS Letters*, **88**, 15—17.
21. Maundrell K., Scherrer K., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **99**, 225—238.
22. Stevenin J., Jacob M., (1979), *Mol. Biol. Rep.*, **5**, 29—35.
23. Kulguskin V. V., Krichevskaya A. A., Lukanidin E. M., Georgiev G. P., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **609**, 410—424.
24. Pedersen T., (1983), *J. Cell Biol.*, **97**, 1321—1326.
25. Samarina O. P., Lukanidin E. M., Molnar J., Georgiev G. P., (1968), *J. Mol. Biol.*, **32**, 251—268.
26. Kinniburgh A. J., Billings P. B., Quinlan T. J., Martin T. E., (1976), *Progr. in Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **19**, 335—351.
27. Stevenin J., Gattoni R., Diviliers G., Jacob M., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **95**, 593—606.
28. Pederson T., (1981), *American Scien.*, **69**, 76—84.
29. Maundrell K., Maxwell E. S., Civelli O., Vincent A., Goldenberg S., Buri J. F., Imaizumi-Scherrer T., Scherrer K., (1979), *Mol. Biol. Rep.*, **5**, 43—51.
30. Argentsinger-Steitz J., Kamen R., (1981), *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 21—34.
31. Kish V. M., Pederson T., (1975), *J. Mol. Biol.*, **95**, 227—238.
32. Roy R. K., Lau A. S., Munro H. N., Baliga B. S., Sarkar S., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 1751—1755.
33. Jain S. K., Sarkar S., (1979), *Biochemistry*, **18**, 745—753.
34. Moon R. T., Moe K. D., Hille M. B., (1980), *Biochemistry*, **19**, 2723—2730.
35. Moon R. T., (1983), *Differentiation*, **24**, 13—23.
36. Raff R. A., (1980), w: „Cell Biology”, **4**, 107—136, wyd. Prescott M. R., Academic Press, N.Y.
37. Pederson T., Munroe S. H., (1981), *J. Mol. Biol.*, **150**, 509—524.
38. Scherrer K., (1973), w: „Protein Synthesis in Reproductive Tissues” 6th Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology, red. Diczfalusy E., 95—129, Bogtrykkeriet Forum, Copenhagen.
39. Vincent A., Civelli O., Maundrell K., Scherrer K., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **112**, 617—633.

40. Vincent A., Goldenberg S., Scherrer K., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **114**, 179—193.
42. Van-Tan H., Shapira G., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **85**, 271—281.
42. Blobel G., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 924—928.
43. Goldenberg S., Vincent A., Scherrer K., (1980), *Nucl. Acid. Res.*, **8**, 5057—5070.
44. Sledgers H., DeHerdt E., Kondo M., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **117**, 111—120.
45. Adams D. S., Noonan D., Jeffery W. R., (1981), *Differentiation*, **20**, 177—187.
46. Van Venrooij W. J., Eckelen C. A., Jansen R.T.P., Princen J. M.G., (1977), *Nature*, **270**, 189—191.
47. Adams D. S., Noonan D., Jeffery W. R., (1980), *Biochemistry*, **19**, 1965—1970.
48. Adams D. S., Noonan D., Jeffery W. R., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 83—87.
49. Rose K. M., Jacob S. T., Kumar A., (1979), *Nature*, **279**, 260—262.
50. DeHerdt E., Piot E., Kondo M., Slegers H., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **122**, 453—460.
51. Baer B. W., Kornberg R. D., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 1890—1892.
52. Mano Y., Nagano H., (1970), *J. Biochem. (Tokyo)*, **67**, 611—623.
53. Rudensey L. M., Infante A. A., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3056—3063.
54. Civelli O., Vincent A., Maunrell K., Buri J. F., Scherrer K., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **107**, 577—585.
55. Peters C., Jeffery W. R., (1978), *Differentiation*, **12**, 91—97.
56. Müller W. E. G., Totsuka A., Kroll M., Nusser J., Zahn R. K., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **383**, 147—158.
57. Edmonds M., Winters M. A., (1976), *Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, **17**, 149—179.
58. Nevins J. R., Joklik W. K., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6939—6947.
59. Orava M. M., Isomaa V. V., Jänni O. A., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **101**, 195—203.
60. Avramova Z. V., Milchev G. J., Hadjiolov A., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **103**, 99—107.
61. Milchev G. J., Avramova Z. V., Hadjiolov A., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **103**, 109—115.
- 61a. Manley J. L., (1983), *Cell*, **33**, 595—605.
62. Egrie J. C., Wilt F. H., (1979), *Biochemistry*, **18**, 269—274.
63. Slater D. W., Slater I., Bollum F. J., (1978), *Dev. Biol.*, **63**, 94—110.
64. Slater I., Slater D. W., (1979), *Differentiation*, **13**, 109—115.
65. Müller W. E., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **70**, 241—248.
66. Müller W. E., Seibert G., Steffen R., Zahn R. K., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **70**, 249—258.
67. Proudfoot N. J., Brownlee G. G., (1974), *Nature*, **252**, 359—362.
68. Proudfoot N., Brownlee G. G., (1976), *Nature*, **263**, 211—214.
69. Proudfoot N. J., Cheng C. C., Brownlee G. G., (1976), *Progr. in Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **19**, 123—134.
70. Fitzgerald M., Shenk T., (1981), *Cell*, **24**, 251—260.
71. Jung A., Sippel A. E., Gretz M., Schutz G., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 5759—5763.
72. Hagenbüchle O., Bovey R., Young R. A., (1980), *Cell*, **21**, 179—187.

73. Hagenbüchle O., Kirkeles M. S., Sprague K. U., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7157—7169.
74. Aleström P., Akusjarvi G., Perricaudet M., Mathews M. B., Klessing D. F., Pettersson U., (1980), *Cell*, **19**, 671—681.
- 74a. Montell C., Fisher E. F., Caruthers M. H., Berk A. J., (1983), **305**, 600—605.
75. Allende C. C., Allende J. E., Firtel R. A., (1974), *Cell*, **2**, 189—196.
76. Huez G., Marbaix G., Hubert E., Cleuter Y., Leclercq M., Chantrenne H., Devos R., Soreq H., Nudel U., Littauer U., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **59**, 589—592.
77. Nudel U., Soreq H., Littauer U., Marbaix G., Huez G., Leclercq M., Hubert E., Chantrenne H., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **64**, 115—121.
78. Wilson M. C., Sawicki S. G., White P. A., Darnell J. E., (1978), *J. Mol. Biol.*, **126**, 23—36.
79. Harpold M. M., Wilson M. C., Darnell J. E., (1981), *Mol. Cell Biol.*, **1**, 188—198.
80. Gorski J., Morrison M. R., Merkel C. G., Lingrel J. B., (1975), *Nature*, **253**, 749—751.
81. Duncan R., Humphreys T., (1981), *Dev. Biol.*, **88**, 211—219.
82. Cabada M. D., Darnborough C., Ford P. J., Turner P. C., (1977), *Dev. Biol.*, **57**, 427—439.
83. Olszańska B., Kludkiewicz B., Lassota Z., (1984), *J. Embryol. Exp. Morph.*, **79**, 11—24.
84. Clegg K. B., Pikó L., (1983), *Dev. Biol.*, **95**, 331—341.
85. Darnborough C., Ford P. J., (1976), *Dev. Biol.*, **50**, 285—301.
86. Rosbash M., Ford P. J., (1974), *J. Mol. Biol.*, **85**, 87—101.
87. Rosenthal E. T., Tansey T. R., Ruderman J. V., (1983), *J. Mol. Biol.*, **166**, 309—323.
88. Marbaix G., Huez G., Nokin P., Cleuter Y., (1976), *FEBS Letters*, **66**, 269—273.
89. Slater D. W., Slater I., Gillespie D., (1972), *Nature*, **240**, 333—337.
90. Wilt F. H., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2345—2349.
91. Wilt F. H., (1977), *Cell*, **11**, 673—681.
92. Dolecki G. J., Duncan R. T., Humphreys T., (1977), *Cell*, **339**—344.
93. Davies F. C., Davies R. W., (1978), *Dev. Biol.*, **66**, 86—96.
94. Davies F. C., (1982), *Differentiation*, **22**, 170—174.
95. Jeffery W. R., Wilson L. J., (1983), *J. Embryol. Exp. Morph.*, **75**, 225—239.
96. Steinhardt R. A., Epel D., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1915—1919.
97. Epel D., (1978), *Dev. Biol.*, **12**, 186—242.
98. Vacquier V. D., (1981), *Dev. Biol.*, **84**, 1—26.
99. Fodor E. J. B., Ako H., Walsh K. A., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4923—4927.
100. Tiedeman H., (1966), *Current Topics in Dev. Biol.*, **1**, 85—112.
101. Saxen L., (1980), *Current Topics in Dev. Biol.*, **15**, 409—418.
102. Newrock K. M., Raff R. A., (1975), *Dev. Biol.*, **42**, 242—261.
103. Capco D. G., Jeffery W. R., (1978), *Dev. Biol.*, **67**, 137—151.
104. Jeffery W. R., Capco D. G., (1978), *Dev. Biol.*, **67**, 152—166.
105. Rodgers W. H., Gross P. R., (1978), *Cell*, **14**, 279—288.
106. Ernst S. G., Hough-Evans B. R., Britten R. J., Davidson E. H., (1980), *Dev. Biol.*, **79**, 119—127.

107. Jäckle H., Kalthoff K., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 6700—6704.
108. Capco D. G., Jeffery W. R., (1981), *Nature*, **294**, 255—257.
109. Johnson M. H., Ziomek C. A., (1981), *Cell*, **24**, 71—80.
110. Carpenter C. D., Klein W. H., (1982), *Dev. Biol.*, **91**, 43—49.
111. Jeffery W. R., Tomlison C. R., Brodeur R. D., (1983), *Dev. Biol.*, **99**, 408—417.
112. Lewin B., (1975), *Cell*, **4**, 11—20.
113. Salditt-Georgieff M., Darnell J. E., (1982), *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 701—707.
114. Imaizumi-Scherrer M. T., Maundrell K., Civelli O., Scherrer K., (1982), *Dev. Biol.*, **93**, 126—138.
115. Lee G., Engelhardt D., (1979), *J. Mol. Biol.*, **129**, 221—233.
116. Geoghenan T., Cereghini S., Brawerman G., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 5587—5591.
117. Bergman I. E., Brawerman G., (1980), *J. Mol. Biol.*, **139**, 439—454.
118. Markel C. G., Wood T. C., Lingrel J. B., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5512—5515.
119. Adams D. S., Jeffery W. R., (1978), *Biochemistry*, **17**, 4519—4524.
120. Scherrer K., (1980), w „Eucariotic Gene Regulation”, red. Kolodny G. M., 57—129, CRC Press Inc.

Addendum: Po złożeniu artykułu do druku do wiadomości autora dotarły jeszcze 2 prace pochodzące z tego samego laboratorium. Jedną z nich (Palatnik C. M., Storti R. V., Capone A. K., Jacobson A. (1980), *J. Mol. Biol.*, **141**, 99—118) poddaje w wątpliwość rolę poli(A) w utrzymywaniu stabilności mRNA, jednak, zdaniem autora niniejszego artykułu, ani założenia eksperymentalne, ani otrzymane wyniki nie pozwalają na jednoznaczną negatywną odpowiedź. W drugiej pracy (Jacobson A., Favreau M., (1983), *Nucl. Acid Res.*, **11**, 6353—6368) autorzy stwierdzili zahamowanie procesu translacji *in vitro* przy dodawaniu wzrastających ilości homopolimeru (A)₂₀₀. W końcowych rozważaniach dochodzą jednak do wniosku, że nie musi to oznaczać bezpośredniego udziału segmentu poli(A) w translacji, a ewentualnie wiązanie specyficznego białka (faktora) do segmentu poli(A).

RECENZJE

Evegeny Golovinsky

Biochemie der Antimetabolite

naukowe opracowanie wydania niemieckiego: **Gerd-Joachim Krauss,**

VEB Fischer Verlag, Jena, 1984, stron 226, rycin 69, tabel 24

Książka E. Golovinsky'ego ukazała się w 1975 roku nakładem Wydawnictwa „Izdatelstvo i iskustvo”, Sofia pt.: „Biochimija na antimetabolitite”. Niemiecka wersja książki powstała w ramach współpracy autora z G.-J. Kraussem. Golovinsky, profesor w Instytucie Biologii Molekularnej Bułgarskiej Akademii Nauk w Sofii, przełożył wraz z współtłumaczem książkę na język niemiecki. Dr Krauss z Uniwersytetu im. M. Luthera w Halle opracował niemiecką wersję książki, unowocześniając tekst tak, że według słów Golovinsky'ego (por. przedmowę do wydania niemieckiego) „Biochemie der Antimetabolite” stanowi praktycznie nową książkę.

Termin „antimetabolit” wprowadził w 1952 roku D. Wooley podając, w swej klasycznej monografii „A Study of Antimetabolites”, następującą definicję: „Strukturalne analogi (życiowo niezbędnych) metabolitów... mogą wywoływać w organizmie symptomy niedoboru metabolitów, których strukturę przypominają. Prawie we wszystkich przypadkach znieść można ów efekt biologiczny przez podwyższenie stężenia właściwego metabolitu. Takie, antagonistycznie działające strukturalne analogi metabolitów nazywać będziemy antymetabolitami”.

Już w 1938 roku D. Wooley ze współpracownikami opisał fizjologicznie ujemne efekty syntetycznego analogu kwasu nikotynowego. Dwa lata później D. Woods wykazał, że skuteczność antybakteryjnego działania sulfonoamidów polega na ich interferencji z procesami biosyntetycznymi przebiegającymi z udziałem p-aminobenzoenu. Stwierdzenie to, dało początek nowej dziedzinie nauk doświadczalnych i stosowanych zarazem — biochemii antymetabolitów. Tę właśnie dziedzinę przedstawia recenzowana książka E. Golovinsky'ego.

Badania prowadzone w omawianej dziedzinie, ogólnie mówiąc, obejmują następujące kierunki: projektowanie i syntezę nowych antymetabolitów, doświadczalne sprawdzanie mechanizmów ich działania oraz próby praktycznego ich zastosowania. Kolejne rozdziały książki Golovinsky'ego przedstawiają właśnie te zagadnienia.

Na część ogólną książki składają się następujące rozdziały:

1. Ukierunkowana synteza antymetabolitów
2. Metody oznaczania biologicznego działania antymetabolitów
3. Biochemiczne mechanizmy działania antymetabolitów
4. Metabolizm antymetabolitów i odtruwanie organizmu
5. Główne rodzaje antymetabolitów
6. Zastosowania antymetabolitów w chemioterapii
7. Antymetabolity jako leki i czynniki immunosupresyjne

Kolejne rozdziały opatrzone są odnośnym piśmiennictwem, doprowadzonym do wczesnych lat osiemdziesiątych; oczywiście wybranym dość arbitralnie i niepełnym lecz wystarczająco ilustrującym omawiane zagadnienia. Liczne ryciny oraz tablice ułatwiają percepcję treści przedstawionych w tekście jasno i przystępnie. Książka zainteresować może przedstawicieli wielu dziedzin szeroko pojętych nauk przyrodniczych — przede wszystkim chemików i biologów, a także farmakologów i lekarzy różnych specjalności, zwłaszcza immunologów i onkologów.

Zofia Zielińska

SPIS TREŚCI

Wspomnienia:

| | |
|---|-----|
| O profesorze Józefie Chmielu | 219 |
| O Profesor Marii Sarneckiej-Keller | 221 |

Artykuły:

| | |
|--|-----|
| G. Bartosz, W. Leyko — Białko błony erythrocytu przenoszące aniony | 223 |
| L. Lachowicz — Transport głównych kationów w zakończeniach komórek nerwowych | 247 |
| A. Kozik — Białka wiążące ryboflawinę | 263 |
| J. Ryńca — Udział witaminy K w modyfikacji białek | 283 |
| E. Biesiada — Acetylacja histonów | 305 |
| M. Witt — Genetyka molekularna głównego kompleksu zgodności tkankowej | 323 |
| E. Ziętkiewicz, R. Słomski — Komórkowe antygeny rybonukleoproteinowe | 337 |
| B. Olszańska — Rola segmentów poliadenylowych i poliadenylacji RNA w rozwoju embironalnym | 365 |

Recenzja książki:

| | |
|--|-----|
| E. Golovinsky — Biochemie der Antimetabolite (Z. Zielińska) | 385 |
|--|-----|

POSTĘPY BIOCHEMII

March 1985

ARTICLES IN POLISH

Number 1

| | |
|--|-----|
| Professor Józef Chmiel — Obituary | 219 |
| Professor Maria Sarnecka-Keller — Obituary | 221 |

Articles:

| | |
|--|-----|
| G. Bartosz, W. Leyko — Anion Transport Protein of the Erythrocyte Membrane (Department of Biophysics, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Łódź) | 223 |
| L. Lachowicz — Main Cation Transport in the Nerve Terminals (II Department of Biochemistry, Institute of Physiology and Biochemistry, Medical Academy, Łódź) | 247 |
| A. Kozik — Riboflavin-Binding Proteins (Department of Animal Biochemistry, Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Kraków) | 263 |
| J. Ryńca — The Role of Vitamin K in Protein Modification (Biochemistry Department Faculty Veterinary Medicine, Warszawa) | 283 |
| E. Biesiada — Histone Acetylation (Department of Tumor Biology, Institute of Oncology, Gliwice) | 305 |
| M. Witt — Molecular Genetics of the Major Histocompatibility complex (Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań) | 323 |
| E. Ziętkiewicz, R. Słomski — Cellular Ribonucleoprotein Antigens (Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań) | 337 |
| B. Olszańska — Role of Polyadenylic Tracts and RNA Poliadenylation in Embryonic Development (Institute of Genetics and Animal Breeding of the Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec) | 365 |

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy, oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny w sposób syntetyczny omawiać wybrany temat na podstawie możliwie pełnego piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu na podstawie piśmiennictwa z ostatnich dwu lat. Objętość takich artykułów nie powinna przekraczać 20 stron maszynopisu (nie licząc ilustracji i piśmiennictwa). Kwartalnik publikuje także artykuły typu *minterviews*, do 10 stron maszynopisu, z dziedziny zainteresowań autora, opracowane na podstawie najnowszego piśmiennictwa, wystarczającego dla zilustrowania problemu. Ponadto kwartalnik publikuje krótkie noty, do 5 stron maszynopisu, informujące o nowych, interesujących osiągnięciach biochemii i nauk pokrewnych, oraz noty przybliżające historię badań w zakresie różnych dziedzin biochemii. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „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 otrzymuje bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów o przestrzeżenie 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 i nie więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polską.

Układ maszynopisu: strona okładowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakład(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 następane obejmują tekst pracy do spisu piśmiennictwa włącznie, tabele, spis rycin, wzorów oraz tytuły i objaśnienia do rycin na stronach końcowych.

Dla przejrzystości tekstu obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły informować winny rzeczowo 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 rozstrzeżonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ółówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ółówkiem 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. klas 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 bywają używane w pracach obcojęzycznych.

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 omawiając przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem

artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawianej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nie uporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), 271, 1 np.

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

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

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

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

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

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuł tabeli i nagłówki rubryk 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 wzorów cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „górną” 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 z prac innych autorów do artykułu przeznaczonych do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy uzyskać zgodę na przedruk i przedłożyć ją Redakcji.

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

SPIS TREŚCI

Wspomnienia:

| | |
|--|-----|
| O Profesorze Józefie Chmielu | 219 |
| O Profesor Marii Sarneckiej-Keller | 221 |

Artykuły:

| | |
|---|-----|
| G. Bartosz, W. Leyko — Białko błony erytrocytu przenoszące aniony | 223 |
| L. Lachowicz — Transport głównych kationów w zakończeniach komórek nerwowych | 247 |
| A. Kozik — Białka wiążące ryboflawinę | 263 |
| J. Ryńca — Udział witaminy K w modyfikacji białek | 283 |
| E. Biesiada — Acetylacja histonów | 305 |
| M. Witt — Genetyka molekularna głównego kompleksu zgodności tkankowej | 323 |
| E. Ziętkiewicz, R. Słomski — Komórkowe antygeny rybonukleoproteinowe | 337 |
| B. Olszańska — Rola segmentów poliadenylowych i poliadenylacji RNA w rozwoju embrionalnym | 365 |

Recenzja książki:

| | |
|---|-----|
| E. Golovinsky — Biochemie der Antimetabolite (Z. Zielińska) | 385 |
|---|-----|