

„BIOLÓGIAI MEMBRÁNOK ÉS TRANSPORT-FOLYAMATOK V.” KONFERENCIA

Tihany, 1975. május 14—17.

URIDIN TRANSPORT ÉS RNS SZINTÉZIS

SASVÁRI MÁRIA, STAUB MÁRIA és ANTONI FERENC

Semmelweis Orvostudományi Egyetem
I. Kémiai-Biokémiai Intézet, Budapest

A transzportfolyamatok vizsgálatának többféle célja lehet, s ez összefügg a vizsgált objektum típusával is:

1. Vörösvértetek jó modellrendszerként használhatók, ha a transzportfolyamatokat mint kiragadott sejtfunkciót kívánjuk vizsgálni.

2. Osztódó sejt kultúrákban lehetőség nyílik a transzportfolyamatok és az intracelluláris anyagcsere összefüggéseinek vizsgálatára. Az a tény, hogy osztódó sejtekben a makromolekulák szintézisének fokozódását mindig megelőzi egy transzport-növekedés, további kérdéseket vet fel (PLAGEMANN 1974):

— lehet-e a transzportfolyamatok sebességnövekedése közvetlen, vagy közvetett kiváltója a makromolekulák szintézisnövekedésének?

— ha nem, milyen szabályozási mechanizmus hangolja össze a két folyamatot?

3. A limfocita stimuláció kezdeti lépése az antigén vagy mitogén kötődése a membránhoz. A stimuláció folyamatának tehát a membránból kell kiindulnia. Mivel a mitogén stimuláció kezdeti hatásai közé tartozik a transzportfolyamatok sebességének növekedése (PETERS 1971 a, b), ezért a transzportfolyamatok vizsgálata nem érdektelen a stimuláció biokémiai mechanizmusának felderítése szempontjából sem.

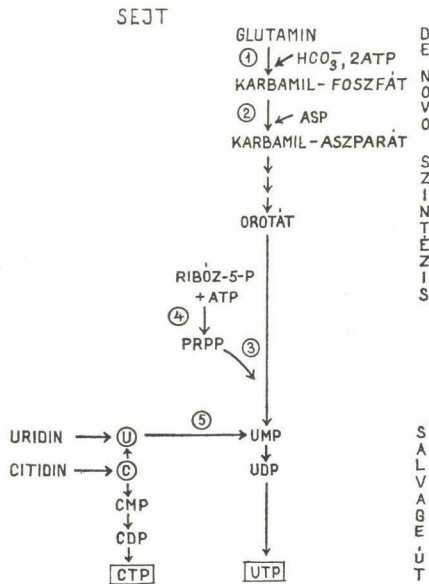
A transzportfolyamatok és a makromolekulák szintézisének funkcionális összefüggése azonban felvet egy igen lényeges metodikai problémát: a két folyamat egymástól elkülöníthető, megbízható mérését. Az uridin transzport és az RNS szintézis összefüggésének vizsgálatában ez a metodikai probléma rendkívül bonyolultnak tűnik elsősorban az RNS szintézis megbízható mérésének szempontjából, ugyanis a sejt kultúrák RNS szintézisének mérésére általánosan használt ^3H -uridin inkorporáció sebességmeghatározó lépése — úgy tűnik — nem az RNS szintézis sebessége (LUKAS 1967, HAUSEN 1968, SCHOLTISSEK 1968, PLAGEMANN 1969). Ebben az esetben viszont az inkorporációs eredmények kiértékelése rendkívüli körültekintést igényel.

Jelen munkánkban elsősorban a probléma utóbb említett metodikai oldalával foglalkozunk, mert ennek ismerete elengedhetetlenül szükséges a funkcionális oldalt vizsgáló munkák megfelelő, kritikus értékeléséhez.

1. Transzportfolyamatok sebességmérése: zéró-transz módszer

A mérés elve (HANKLIN 1972): az extracelluláris térben, a tápoldatban, a transzportra kerülő anyag koncentrációját változtatjuk. Az anyag, bekerülve a sejtbe, rögtön metabolizálódik, tehát az intracelluláris koncentrációja gyakorlatilag nulla. Ez lehetővé teszi a transzport kezdeti sebességének mérését széles koncentrációtartományban. Amennyiben a transzportfolyamat kezdeti sebességének koncentrációfüggése Michaelis-Menten kinetikát mutat, a folyamat látszólagos K_M -je és maximális sebessége meghatározható.

Ez a módszer jól használható ribonukleozidok, pl. uridin transzportfolyamatának vizsgálatára. Ugyanis szabad uridin az UTP de novo szintézise során nem képződik (1. ábra), de az ún. „salvage” úton a sejt fel tudja használni a kívülről felvett uridint. Az uridin, belépve a sejtbe, rögtön foszforilálódik, és UTP formájában halmozódik fel (MURRAY 1971). Az uridin gyors foszforilációját az uridin kinázok magas szintje (PLAGEMANN 1969) és a jelentős intracelluláris ATP koncentráció (1–4 mM: WEBER 1971, PLAGEMANN 1972) teszi lehetővé. Az uridin belső poolja tehát gyakorlatilag nullának tekinthető, s így a transzport sebességmérése különösebb problémát nem okoz.



1. ábra. Az UTP „de novo” szintézise és a külső uridin bekerülése a „salvage” úton keresztül

Az uridin transzport bifázikus jellegű, alacsonyabb koncentrációtartományra a facilitált diffúzió jellemző, mely Michaelis-Menten kinetikát mutat (PLAGEMANN 1971). Magasabb koncentráció tartományban, néhány száz μM felett, az uridin passzív diffúzióval is bekerül a sejtbe (JACQUEZ 1972), a bediffundált

uridin mennyisége azonban a facilitált diffúzióval felvett mennyiséghez képest elhanyagolható (RENNER 1972).

Az uridin transzport látszólagos K_M értéke eléggé széles körű vizsgálati anyagon 8—20 μM közé esik (PETERS 1971, PLAGEMANN 1969, 1972), jellemző a transzportrendszerre, míg a maximális sebesség értéke függ a sejt típusától, valamint növekedési állapotától (PLAGEMANN 1973).

2. Az uridin kináz enzimaktivitása és az uridin transzport sebességének összefüggése

PLAGEMANN (1974) szerint állati sejtekben a nukleozidok foszforilációja a transzporttól elkülöníthető folyamat, mely azonban közvetlenül követi a transzportot. Ennek bizonyítékai:

1. A transzportálódott 3H -uridin azonnal foszforilálódik, mivel a sejtek savoldékony frakciójában 3H -uridin nincs, csak jelölt UMP, UDP és elsősorban UTP mutatható ki (RENNER 1972, PLAGEMANN 1971, SCHOLTISSEK 1968).

2. A transzport látszólagos K_M értéke és az uridin kináz K_M -je nem azonos, tehát a két folyamatért feltehetően más-más enzim felelős (PLAGEMANN 1974).

3. Az uridin transzport foszforiláció hiányában is végbemegy, bár kisebb sebességgel (PLAGEMANN 1974).

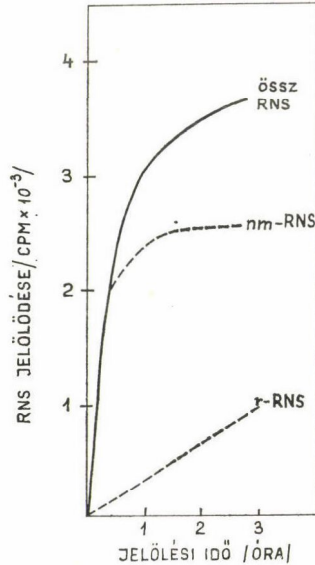
Ezeknek a kísérleteknek az alapján a kinázok és a feltételezett transzport-fehérjék uridin esetében nem azonosak. A két fehérje működése azonban igen szorosan összefügg. Ezt bizonyítják azok a kísérletek, melyekben a fito-hemagglutininnal stimulált limfocitákban (LUCAS 1967, HAUSEN 1968), illetve patkány hepatoma sejtekben (PLAGEMANN 1973) — a 3H -uridin felvétel és az uridin-kináz specifikus enzimaktivitásának paralell növekedését figyelték meg.

3. Humán limfociták RNS szintézise

Nyugvó és stimulált limfociták RNS szintézisét COOPER (1969, 1972a, b) tanulmányozta részletesen. Az izolált RNS frakciók vizsgálata, a 3H -uridin inkorporáció kinetikai elemzése, s a jelölődés megoszlása a különböző RNS frakciókban a következő eredményeket hozta:

A sejtek RNS tartalmának fő tömegét a riboszóma-RNS(r-RNS) képi, amely egy meglehetősen stabil RNS fajta, féléletideje napokban-hetekben mérhető. Ezzel szemben a gyorsan szintetizálódó RNS fajták, amelyek legnagyobb részét a nagy molekulásúlyú, sejtmagban megtalálható RNS alkotja (nm RNS), mennyiségileg kis hányadát alkotja az össz-RNS-nek.

Ezeknek az eredményeknek az alapján COOPER a sejtek RNS frakciójának radioaktív jelölődési kinetikáját a 2. ábrán látható függvényként határozta meg elméleti úton, amely szerint:



2. ábra. RNS szintézis humán limfocitákban (COOPER 1972a).

1. az rRNS szintézis sebessége alacsony, de állandó érték, s mivel lebomlásának sebessége elhanyagolhatóan kicsi a jelölődési periódus alatt, a radioaktivitás inkorporációja az idő függvényében egyenes, melynek meredeksége a szintézis sebességére jellemző érték.

2. Az nmRNS jelölődése rendkívül gyors, rövid idejű jelölések elsősorban ennek a szintézisére utalnak. Azonban az nmRNS radioaktivitás szempontjából hamar egyensúlyba kerül. Ez az egyensúlyi szint az nmRNS össz mennyiségét mutatja. Az egyensúly dinamikus, tehát az nmRNS állandó szintézisét és lebomlását jelenti.

3. Az össz RNS jelölődése a két görbéből additíven tevődik össze.

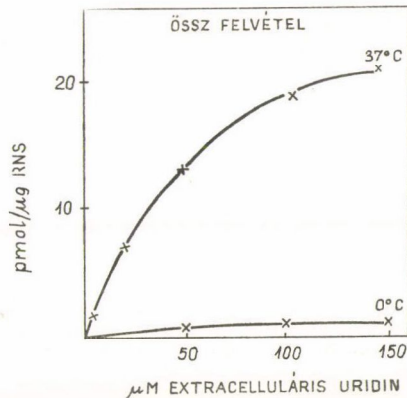
Az elméletileg meghatározott jelölődési görbét COOPER kísérletesen is megkapta, miután a nyugvó és a stimulált limfociták ³H-uridin inkorporációs adatait az általa bevezett matematikai módszerrel (COOPER 1972 b.) korigálta. Az eredmények szerint stimulált limfocitákban az nmRNS össz mennyisége kb. 15-szöröse a nyugvó állapotú limfocitákhoz képest. Az nmRNS féleletideje nyugvó sejtekben 2,5 perc, stimuláltakban 8 perc.

4. Az uridin transzport és az uridin inkorporáció (RNS szintézis) sebességének összefüggései

Osztódó állati sejt kultúrákban (STAMBROOK 1972), illetve stimulált limfocitákban (PETERS 1971) megfigyelhető, hogy a makromolekulák szintézisfokozódásával párhuzamosan, vagy azt megelőzően egy általános transz-

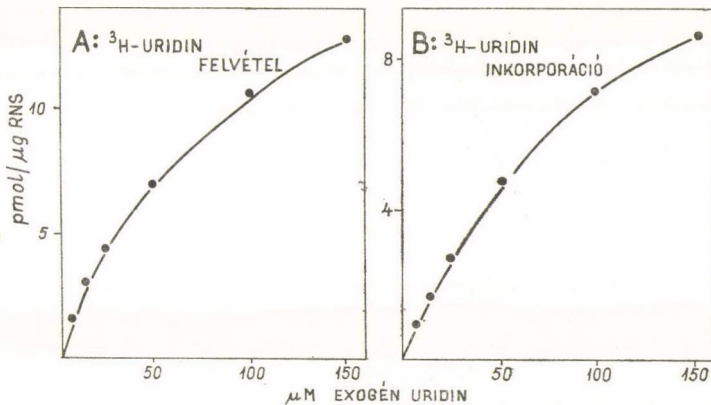
portnövekedés van, az uridin transzport is igen jelentős mértékben nő. A szorosan korreláló két folyamat — a nukleozid transzport és az RNS szintézis — minden valószínűség szerint egy fontos szabályozó rendszerre utal (PLAGEMANN 1974), de hogy milyen óvatosnak kell lennünk az ilyen eredmények interpretálásánál, azt a következő kísérlet sorozattal szeretnénk illusztrálni (M. SASVÁRI—SZÉKELY 1975 a).

Humán tonszilla limfocitákon vizsgálva a ^3H -uridin transzportját és inkorporációját az RNS-be a következő eredményeket kaptuk: A ^3H -uridin transzport sebessége a külső uridin koncentráció függvényében telítési görbét ad (3. ábra) az irodalmi adatokkal egyezően (lásd: előbb). Ha a transzportáló-



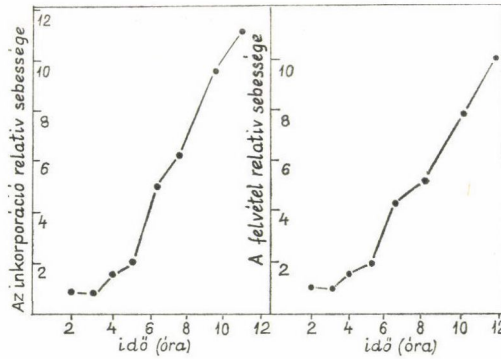
3. ábra. Az uridin transzport koncentrációfüggése.

A frissen preparált tonszilla sejtuszpenzió 10^7 sejtet tartalmazott 1 ml Hanks¹⁷ médiumban. 10, 25, 50, 100, és 150 μM külső uridin koncentráció mellett a sejteket 1 óráig inkubáltuk 37 C°-on 5 μCi ^3H -uridinnal. A transzportálódott uridin össz mennyisége a sejtekben talált radioaktivitás és az izotóp specifikus radioaktivitásból számoltuk ki

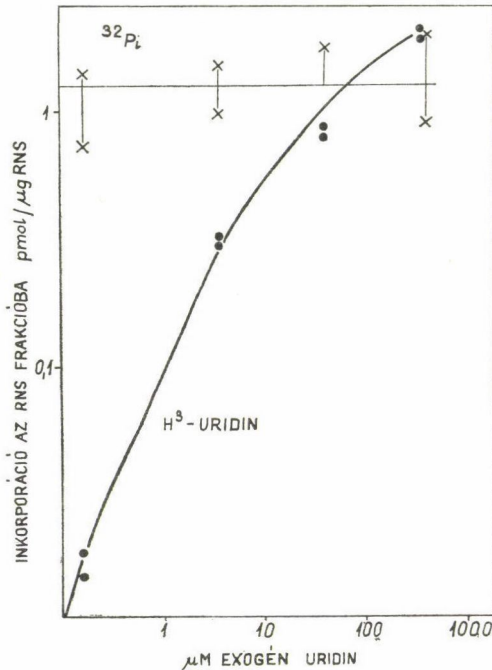


4. ábra. A ^3H -uridin felvétel és inkorporáció paralell változása.

A kísérleti körülmények megegyeznek a 3. ábrában leírtakkal, csak: a felvett radioaktivitás megoszlását mértük a savoldékony (FELVÉTEL) és a savban nem oldódó (INKORPORÁCIÓ) frakciókban. A felvett illetve inkorporálódott pmolokat a mért radioaktivitásból és az alkalmazott izotóp specifikus radioaktivitásából számoltuk



5. ábra. A felvétel és az inkorporáció paralell változása a sejtciklus során (STAMBROCK 1972) Állandó külső koncentrációjú és specifikus radioaktivitású ^3H -uridin jelenlétében a savoldékony (felvétel) és a savban nem oldódó (inkorporáció) frakciók radioaktivitását mérték a sejtciklus során. A különböző időpontokhoz tartozó értékek a kiindulási állapotra lettek vonatkoztatva



6. ábra. A ^3H -uridin és a ^{32}P foszfát inkorporációja az RNS frakcióba különböző külső uridin koncentráció mellett

10^7 sejt/ml tonzilla sejtuszpenzió 1 óráig volt inkubálva 0,15, 4, 40, 400 μM uridin és 4 μCi ^3H -uridin illetve 10 μCi ^{32}P foszfát jelenlétében. A minták anorganikus foszfát koncentrációja minden esetben 100 μM volt

dott uridin részletesebb sorsát megvizsgálva ugyanilyen körülmények közt megmérjük a felvétel (a savolvadékony radioaktivitás mennyisége) és az inkorporáció (az RNS-ben levő radioaktivitás mennyisége) uridin koncentráció függését, két teljesen paralell lefutású görbét kapunk (4. ábra), akár csak egy osztódó sejt kultúrában (5. ábra). Felmerült tehát a kérdés, hogy lehet-e az extracelluláris uridin egyfajta stimulátora a sejtnek? A 6. ábrán látható kísérlet bizonyítja, hogy erről nincs szó, ugyanis ha egy uridin transzporttól független módszerrel, ^{32}P -jelöléssel, mérjük az RNS szintézis sebességét, azt kapjuk, hogy ez független a külső uridin koncentrációtól. Ami egyébként elég nyilvánvalónak tűnik, hiszen az uridin inkorporáció alapján számítható 10—100-szoros szintézis sebesség már eleve irreális ebben az esetben, az inkubálás időtartama mindössze egy óra. Ezt a kísérleti rendszert egy modellnek szánjuk, figyelmeztetőül, hogyan lehet hamis RNS szintézis sebesség növekedést mérni. Természetesen ezek a kísérletek egyáltalán nem zárják ki, hogy az előbb említett rendszerben, osztódó sejt kultúrák, stimulált limfociták esetében a transzportsebesség-növekedést egy tényleges RNS szintézis sebesség növekedés kíséri, csupán a használatban levő módszer, a ^3H -uridin inkorporáció megbízhatóságát kérdőjelezzik meg.

5. Az RNS szintézis sebességének mérése: a ^3H -uridin inkorporáció helyes értékelésének problémái

A ^3H -uridin inkorporáció mérése azért terjedt el olyan széles körben sejt kultúrák RNS szintézisének jellemzésére, mert a módszer könnyűnek és gyorsnak tűnik. Az utóbbi években azonban egyre több probléma merült fel a módszer megbízhatóságával kapcsolatban, mivel az alapvető feltételezések közül egy sem bizonyult igaznak:

1. A ^3H -uridin inkorporáció sebességmeghatározó lépése valószínűleg nem az RNS szintézis sebessége, hanem a transzport vagy az uridin kináz reakció (PLAGEMANN 1969, SANDER 1972, PLAGEMANN 1973, SCHOLTISSEK 1968, LUCAS 1967, HAUSEN 1968, KAY 1970, FORSDYKE 1971).

2. Az RNS szintézis közvetlen prekursorának, az UTP-nek specifikus radioaktivitása *nem* egyenlő a sejtekhez adott ^3H -uridin specifikus radioaktivitásával, sőt, még csak konstansnak sem tekinthető (COOPER 1972 a, FORSDYKE 1968, TSENG 1974).

3. A ^3H -uridin — különösen magas uridin koncentrációk mellett — nemcsak az UTP-ben, hanem a CTP-ben, sőt a TTP-ben is megjelenik, s ezáltal beépül a DNS-be is (PLAGEMANN 1971).

Mindezek alapján a ^3H -uridin inkorporációs technikát feltétlen felül kell vizsgálni. Ezek a kutatások nagyjából három szempont szerint csoportosíthatók:

A. A ^3H -uridin inkorporáció sebességmeghatározó lépésének meghatározása: megoldja-e a problémát, ha a transzport-rendszer maximális sebességgel működik?

B. Az UTP pool specifikus radioaktivitásának meghatározása, és a ^3H -uridin inkorporációs adatok korrekciója ennek alapján.

C. Az UTP pool kompartmentalizációja esetén — ekkor a B pontban javasolt módszer nem használható — a közvetlen prekursor pool specifikus radioaktivitásának meghatározása.

A) A ^3H -uridin inkorporáció sebességmeghatározó lépése

Sebességmeghatározó lépésként két folyamat jöhet szóba a transzport (permeáció), vagy az uridin kináz reakció. Mindezidáig nem sikerült eldönteni, hogy melyik a sebességmeghatározó, ugyanis a két folyamat egymástól nehezen különíthető el (lásd: előbb).

Néhány szerző szerint mind az uridin transzport, mind pedig a ^3H -uridin inkorporáció sebességét az uridin kináz enzimaktivitása és mennyisége határozza meg. Ugyanis az uridin kináz mennyiségével paralell nő a transzport és az inkorporáció sebessége (SCHOLTISSEK 1968, PLAGEMANN 1971).

Más szerzők szerint a limfocita stimuláció hatására létrejövő transzport-növekedés időben megelőzi az uridinkináz derepresszióját, tehát ez utóbbinak enzimaktivitása nem lehet a folyamat sebességmeghatározója (KAY 1970). PLAGEMANN (1973) későbbi munkái alapján is valószínűbb, hogy a transzport-folyamat a sebességmeghatározó.

Végeredményben azonban a kettő közül bármelyik is a sebességmeghatározó lépés, ez nem befolyásolja azt a tényt, hogy ebben az esetben a ^3H -uridin inkorporáció nem minden esetben az RNS szintézis mértéke. Jól mutatják ezt azok a kísérletek, melyekben a transzport vagy a kináz reakció specifikus gátlószerei csökkent ^3H -uridin inkorporációhoz vezettek, holott az RNS szintézis sebessége feltételezhetően nem változott meg, hiszen a sejtek továbbra is normálisan osztódtak (MALAMUD 1968).

Elvben elképzelhető, bár kísérletileg nem igazolt, hogy igen magas külső uridin koncentráció mellett — ahol a transzport rendszer és a kináz maximális sebességgel működik — a sebességmeghatározó lépés az RNS polimeráz reakció lesz. Valószínűleg ezért ajánlja a szerzők egy része a magas uridin koncentráció alkalmazását (GOODY 1975). Ebben az esetben azonban újabb problémák merülnek fel. A nagy mennyiségű uridin gátolja a „de novo” szintézist (ITO 1973, SCHMIDT 1973), emellett mégis az UTP pool igen nagyfokú expanziójához vezet (PLAGEMANN 1971), valamint olyan folyamatokat indít be, melyek alacsony koncentráció mellett elhanyagolhatók, egyszóval lényeges beavatkozást jelent a sejt eredeti egyensúlyaiba, ami a jelzéstechikában nem kívánatos.

B) Az ^3H -UTP pool specifikus radioaktivitásának meghatározása

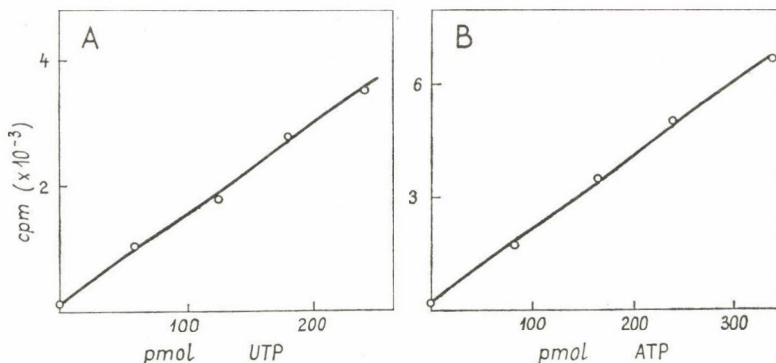
Ha a radioaktív prekursor felvétele viszonylag lassú, és specifikus radioaktivitása a közvetlen prekursor poolban lecsökken, akkor kézenfekvő, hogy a folyamat sebességét a közvetlen prekursor pool specifikus radioaktivitásából kell meghatározni (COOPER 1972 a, FORSDYKE 1968, STAMBROOK 1972). A ^3H -uridin inkorporációt elosztva az UTP pool specifikus radioaktivitásával közvetlenül az RNS szintézis sebességét kapjuk meg — elméletben. Sejtkultúrák UTP mennyiségének kémiai meghatározása azonban nem könnyű feladat, mivel 10^6 sejt UTP tartalma olyan kicsi, hogy ez a kémiai módszerek érzékenységét nem éri el. Ezért vált szükségessé olyan módszerek bevezetése, amelyek az enzimreakciók rendkívüli specifitását és érzékenységét használja ki. HILZ és mti (WIEGERS 1974) dolgoztak ki egy ilyen módszert, melynek mindennapos alkalmazása kissé bonyolult. Egyszerűbb módszernek tűnik az RNS-polimeráz enzim használata, melynek segítségével az UTP mennyisége közvetlenül és igen érzékenyen mérhető (SASVÁRI—SZÉKELY 1975). A mérés elve azonos a LINDBERG és SKOOG (1970) által bevezetett dezoxiribonukleotid meghatározás elvével, ebben a reakcióban DNS polimerázt használnak. Az 1. táblázat tonsilla limfociták UTP pooljára kapott eredményeinket mutatja be.

1. táblázat

Tonsilla limfociták UTP és ATP tartalma
(SASVÁRI—SZÉKELY 1975a).

Kísérlet száma	pmol UTP/ μg RNS	pmol ATP/ μg RNS
1.	70	350
2.	89	326
3.	78	308
4.	80	
átlag	80	340

Az RNS polimeráz teszt lényege a következő: in vitro sejtmentes rendszerben az *E. coli* RNS polimeráz poli(dA-dT) templát jelenlétében egy olyan ribonukleinsavat szintetizál, mely csak UMP-ből és AMP-ből áll. Az enzim tehát két szubsztráttal működik: ATP-vel és UTP-vel. Ha ezek közül az egyik limitáló mennyiségben van jelen, s a feleslegben levő nukleotidot radioaktívan jelöljük, a reakciósebesség (az inkorporáció) egyenesen arányos a limitáló nukleotid koncentrációjával. Megfelelő kalibrációs görbék felvétele (7. ábra) után a módszer alkalmas igen kis mennyiségű ATP vagy UTP meghatározására. Pl. a



7. ábra. Az RNS polimeráz teszt kalibrációs görbéi
(SASVÁRI—SZÉKELY 1975 b).

A: A reakcióelegyben ^{14}C -ATP volt feleslegben (800 pmol/0,04 μCi), s így a reakció kezdeti sebessége egyenesen arányos az UTP koncentrációval (a reakció idő: 10 perc, a végtérfogat 50 μl volt) B: A reakcióelegyben ^3H -UTP volt feleslegben (2500 pmol/0,12 μCi). A reakció kezdeti sebessége az ATP koncentrációval arányos

tonzilla limfociták neutralizált savoldékony frakcióját a reakció elegyhez adva, a kivonatban levő nukleotid tartalom meghatározható (2. táblázat). A módszer megbízhatóságának ellenőrzésére az ún. belső standard módszerét alkalmaztuk. A 2. táblázatban feltüntetett eredményekből látható, hogy a sejt-kivonat nem tartalmaz semmiféle effektort, mely az RNS polimeráz tesztet zavarná, csupán a sejtekben nagymennyiségben jelenlevő ATP izotóp hígítási effektusát kell korrekcióba venni.

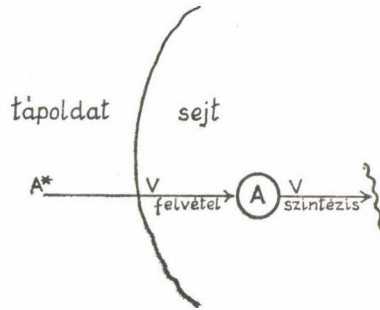
2. táblázat

Vannak-e az RNS polimerázra ható effektorok a tonsilla sejt-kivonatban?
(SASVÁRI—SZÉKELY 1975b).

A Az RNS polimeráz reakcióelegyéhez adva:	kapott inkorporáció	ATP pmol
—	50 cpm	—
60 pmol ATP	1250 cpm	(60)
10 μl sejt-kivonat	1200 cpm	60
20 μl sejt-kivonat	2420 cpm	120
60 pmol ATP + 10 μl sejt-kivonat	2410 cpm	120
B Az RNS polimeráz reakcióelegyéhez adva:	kapott inkorporáció	UTP pmol
—	40 cpm	—
60 pmol UTP	1300 cpm	(60)
10 μl sejt-kivonat	1320 cpm*	60
60 pmol UTP + 10 μl sejt-kivonat	2620 cpm*	120

Megjegyzés: a *-gal jelölt értékek esetében a sejt-kivonatban lévő ATP hígító hatása figyelembe lett véve.

A fenti módszerekkel tehát lehetővé válik a ^3H -uridin inkorporációs kísérletekben az ^3H -UTP pool specifikus radioaktivitásának meghatározása. Hogy ez miért jelentené a problémák megoldását, azt a 8. ábrán bemutatott modellel szeretnénk még egyszer összefoglalni:



$$1. A \ll A^* \rightarrow P_{sa} \simeq A_{sa}^* \Rightarrow I \sim V_{sz}$$

$$2. \frac{A \simeq A^*}{A \gg A^*} \rightarrow P_{sa} f(V_{\text{felvétel}}) \Rightarrow V_{sz} = \frac{I}{P_{sa}}$$

8. ábra. Sejtszuspenziók radioaktív jelölésének általánosított modellje (SASVÁRI—SZÉKELY 1975a).
Jelmagyarázat:

A^* : a felvett radioaktivitás mennyisége
 A : a sejtben levő prekursor pool mennyisége
 P_{sa} : a prekursor pool specifikus radioaktivitása
 V_{sz} : a biokémiai folyamat valódi sebessége
 $V_{\text{felvétel}}$: az izotóp felvétel sebessége

Sejtszuspenziók radioaktív jelölésének két alapvető típusa különböztethető meg. Az első esetben a sejt eredetileg nem tartalmazza az alkalmazott prekuzort, vagy ennek belső poolja olyan kicsi, hogy a felvett mennyiséghez képest elhanyagolható. Ebben az esetben a prekursor pool specifikus radioaktivitása gyakorlatilag megegyezik az alkalmazott izotóp specifikus radioaktivitásával, s így a mért inkorporáció arányos a biokémiai folyamat sebességével.

A második esetben azonban — amely eset igaz a ^3H -uridin inkorporációra és igen sokfajta más jelölési módszerre — a sejt rendelkezik egy jelentős belső poolal, amely csökkenti a kívülről bekerült izotóp specifikus radioaktivitását. Ebben az esetben a prekursor pool specifikus radioaktivitása függ az izotóp felvétel sebességétől, valamint a belső pool méretétől. Ha az utóbbi kettő közül bármelyik megváltozik, ez megváltoztatja az inkorporáció sebességét is, anélkül, hogy a mért biokémiai folyamat sebessége megváltozott volna. Ez okozza pl. a 6. ábrán bemutatott kísérletben a kétfajta jelölési technika ellentmondását. A ^3H -uridin felvétel sebessége függ a külső uridin koncentrációtól, tehát az UTP pool specifikus radioaktivitása a kísérlet során állandóan változik, s ez

jelenik meg a ^3H -uridin inkorporáció változásában, anélkül, hogy az RNS szintézis sebessége ténylegesen megváltozna.

A 8. ábrán bemutatott modell igen fontos feltételezése, hogy csak egy UTP pool van. Ebben az esetben az inkorporáció és a prekursor pool specifikus radioaktivitásának hányadosa az RNS szintézis sebességére jellemző érték.

C) Az UTP pool kompartmentalizációjának lehetősége

Az RNS szintézis mérésének problémáját azért nem tekinthetjük megoldottnak, mert egyre több irodalmi adat valószínűsíti, hogy — a 8. ábra modelljének alapvető feltételezésével szemben — nemcsak egy UTP pool van, hanem legalább kettő, melyeknek specifikus radioaktivitása különböző lehet, és amelyek valószínűleg különböző fajta RNS-ek szintézisére használnak fel (GOODY 1975). Ebben az esetben az RNS szintézis mérése kezd igen bonyolulttá válni, ugyanis feltételezi:

1. a különböző RNS fajták szeparálását
 2. a megfelelő prekursor poolok specifikus aktivitás mérését
- és főképp az utóbbi meghatározása egyáltalán nem megoldott.

Az RNS szintézis transzportsebességtől független, megbízható mérése tehát jelenleg meglehetősen bonyolult problémának tűnik. Megoldása viszont feltétlenül szükséges ahhoz, hogy a két folyamat funkcionális kapcsolatát megbízható módszerekkel vizsgáljuk.

IRODALOM

1. COOPER, H. L.: *J. Biol. Chem.* **243**, 34—35 (1969).
2. COOPER, H. L.: *Transplant. Rev.* **11**, 3—38 (1972/a).
3. COOPER, H. L.: *Anal. Biochem.* (1972/b).
4. FORSDYKE, D. R.: *Biochem. J.* **107**, 195—205 (1968).
5. FORSDYKE, D. R.: *Biochem. J.* **125**, 721—732 (1971).
6. GOODY, H. E., K. A. O. ELLEM: *Biochem. Biophys. Acta* **383**, 30—39 (1975).
7. HANKLIN, B. L., W. D. STEIN: *Biochem. Biophys. Acta* **228**, 127—136 (1972).
8. HAUSEN, P., H. STEIN: *Europ. J. Biochem.* **4**, 401—406 (1968).
9. ITO, K., H. UCHINO: *J. Biol. Chem.* **248**, 4782—4785 (1973).
10. JACQUEZ, J. A.: *Biochem. Biophys. Acta* **61**, 265—277 (1972).
11. KAY, J. E., S. D. HANDMAKER: *Exp. Cell Res.* **63**, 411—421 (1970).
12. LINDBERG, U., L. SKOOG: *Anal. Biochem.* **34**, 152—156 (1970).
13. LUCAS, Z. J.: *Science* **156**, 1237—1240 (1967).
14. MALAMUD, D., R. BASERGA: *Science* **162**, 373—374 (1968).
15. MURRAY, A. W.: *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 811—826 (1971).
16. PETERS, J. H., P. HAUSEN: *Eur. J. Biochem.* **19**, 502—508 (1971 a).
17. PETERS, J. H., P. HAUSEN: *Eur. J. Biochem.* **19**, 509— (1971 b).
18. PLAGEMANN, P. G. W., M. F. ROTH: *Biochemistry* **8**, 4782—4789 (1969).
19. PLAGEMANN, P. G. W.: *Biochem. Biophys. Acta* **233**, 688—701 (1971).
20. PLAGEMANN, P. G. W.: *J. Cell Biol.* **52**, 136—146 (1972).
21. PLAGEMANN, P. G. W.: *J. Cell Physiol.* **73**, 233—250 (1973).
22. PLAGEMANN, P. G. W., RICHEY, D. P.: *Biochem. Biophys. Acta* **344**, 263—305 (1974).

23. RENNER, E. D., PLAGEMANN, P. G. W., BEANLOHR, R. W.: *J. Biol. Chem.* **247**, 5765–5776 (1972).
24. SANDER, G., A. B. PARDEE: *J. Cell Physiol.* **80**, 267–272 (1972).
25. SASVÁRI-SZÉKELY, M., STAUB, M., ANTONI, F.: *Studia Biophysica* **50**, 161–169 (1975a).
26. SASVÁRI-SZÉKELY, M., VITÉZ, M., STAUB, M., ANTONI, F.: *Biochim. Biophys. Acta* **395**, 221–228 (1975 b).
27. SCHOLTISSEK, C.: *Biochim. Biophys. Acta* **158**, 435–447 (1968).
28. SMIDT, P. C., C. E. KNOTT, G. C. TREBMLAY: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 1141–1146 (1973).
29. STAMBROOK, P. J., SISKEN, J. E.: *Biochim. Biophys. Acta* (1972).
30. WEBER, M. J., G. EDLIN: *J. Biol. Chem.* **246**, 1828–1833 (1971).
31. WIEGERS, U., K. KLAPPROTH, H. HILZ: *Febs. Letters* **47**, 307–313 (1974).