

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

TOM 10 - NR 4
1983 (289-404)

Postępy Biologii Komórki

<http://rcin.org.pl> PWN - WARSZAWA

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Jerzy KAWIAK,
Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,
Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Nakład 546 + 94. Ark. wyd. 9. Ark. druk. 7,25. Papier druk. sat. III kl. 80 g, 70 × 100.
Oddano do składania 14 VII 1983 r. Podpisano do druku w grudniu 1983 r. Druk ukończono
w grudniu 1983 r. Zam. 2283/83. Cena zł 80,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

<http://rcin.org.pl>

LINIA PŁCIOWA *TETRODONTOPHORA BIELANENSIS*
(*INSECTA, COLLEMBOLA*). ANALIZA PORÓWNAWCZA
POWSTAWANIA I RÓŻNICOWANIA SIĘ
KOMÓREK PRAPŁCIOWYCH
W ROZWOJU ZARODKOWYM OWADÓW

GERM LINE OF *TETRODONTOPHORA BIELANENSIS*
(*INSECTA, COLLEMBOLA*).
COMPARATIVE ANALYSIS OF PRIMORDIAL GERM CELLS FORMATION
AND DIFFERENTIATION IN EMBRYOGENESIS OF INSECTS

Jerzy KLAG

Zakład Zoologii Systematycznej i Zoogeografii, Instytut Zoologii,
Uniwersytet Jagielloński

Streszczenie. W zarodkach rozwijających się z jaj zaopatrzonych w oosom (ziarna biegunowe) komórki prapłciowe są pierwszymi komórkami uformowanymi całkowicie w danym zarodku, u owadów składających jaja bez oosomu komórki te można zauważyć później, a czasami dopiero w ścianach woreczków celomatycznych. Komórki prapłciowe powstałe w obrębie oosomu są dogodnym przedmiotem badań mechanizmów różnicowania komórkowego, gdyż zawierają one składniki oosomu — ziarna biegunowe. Dzięki tym elementom, dobrze widocznym w mikroskopie świetlnym, można dosyć łatwo śledzić komórki linii płciowej w ciągu całego cyklu życiowego. Liczne doświadczenia polegające na eliminacji oosomu (wirowanie, nakłuwanie, termokauteryzacja, naświetlanie promieniami UV itp.) wykazały, że odgrywa on ważną rolę w determinacji komórek linii płciowej, gdyż bez niego nie tworzą się komórki prapłciowe, a gonady osobników dorosłych, rozwiniętych z zarodków doświadczalnych, pozostają sterylne. Ponadto doświadczenia z przeszczepianiem, zawierającej oosom, plazmy biegunowej do przedniej lub brzusznej części zarodków wykazały, że ma ona zdolność indukowania komórek prapłciowych w dowolnym miejscu zarodka. Komórki prapłciowe owadów powstają poza gonadami i są do nich albo całkowicie biernie transportowane przez wydłużający się prążek zarodkowy (*Haplothrips verbasci*), albo częściowo biernie, częściowo aktywnie (większość owadów), albo komórki te wędrują wyłącznie aktywnie (*Tetradontophora bielensis*). W trakcie rozwoju ontogenetycznego, w cytoplazmie komórek linii płciowej, widoczne są skupienia elektronowo gęstego materiału zwanego „nuage”. Najprawdopodobniej podobną postać elektronowo gęstych skupień ziarnisto-włóknistego materiału przyjmują różne substancje, pełniące w różnych komórkach rozmaite funkcje.

Summary. In insects which lay eggs furnished with oosom (germ plasm, polar granules), the first cells formed in the embryo are primordial germ cells. In insects laying eggs with no oosome in the ooplasm primordial germ cells can be seen later, even after coelomic sacs are formed. Primordial germ cells containing polar granules in their cytoplasm are a handy subject for studies of mechanisms of cell differentiation, because they are easily followed during development under the light microscope. It is widely accepted that germ plasm is involved in germ cell determination. Numerous experiments (pricking, cauterization, centrifugation, UV irradiation etc.) causing germ plasm elimination have shown that in embryos devoid of germ plasm, primordial germ cells do not form and adult insects, developing from such embryos, have sterile gonads. Moreover, transplantation of polar plasm into anterior or ventral parts of cleaving embryos have shown that the germ plasm can induce the primordial germ cells in ectopic locations. Primordial germ cells of insects arise away from the gonads. These cells can be transported entirely passively by growing germ band (*Haplothrips verbasci*), or partly passively by different morphogenetic movements, partly by active movement of primordial germ cells (most of insects), or they can move entirely actively from places of their origin to the gonads (*Tetradontophora bielaniensis*). During ontogenetic development, in the cytoplasm of all germ line cells, as well as in few somatic cells, accumulations of electron dense granulofibrillar material, called "nuage", one can observe. Most probably in different cell types these accumulations are formed by different substances which play different functions in these cells.

Komórki prapłciowe owadów pojawiają się bardzo wcześnie w rozwoju zarodkowym. U niektórych gatunków są pierwszymi, całkowicie ukształtowanymi komórkami w zarodku, u innych pojawiają się nieco później, bo dopiero w ścianach woreczków celomatycznych. Istnieje też wiele gatunków, gdzie komórki te pojawiają się pomiędzy tymi skrajnymi punktami [77]. Z powodu tak wczesnego wyodrębniania się, spośród pozostałych komórek zarodka, komórki prapłciowe od dawna przyciągają uwagę badaczy, zwłaszcza tych, którzy interesują się mechanizmami różnicowania komórkowego. Badacze mają nadzieję, że powstawanie komórek prapłciowych może służyć jako dogodny do badań model działania mechanizmów odpowiedzialnych w czasie różnicowania także za powstawanie komórek somatycznych. Do analizy tego zagadnienia szczególnie dogodne są zarodki, które rozwijają się z jaj posiadających na tylnym biegunie obszar odmiennie barwiącej się cytoplazmy, tzw. plazmę biegunową. Plazma biegunowa zawiera oosom utworzony przez liczne ziarna, które zostają zamknięte w cytoplazmie tworzących się komórek prapłciowych (zwanym tu także komórkami biegunowymi) i stanowią świetny wyznacznik, widoczny nawet w mikroskopie świetlnym. Dzięki temu wyznacznikowi komórki prapłciowe można śledzić w ciągu całego okresu rozwoju zarodkowego, do chwili pojawienia się innych cech charakterystycznych dla komórek linii płciowej. Występuje wśród owadów

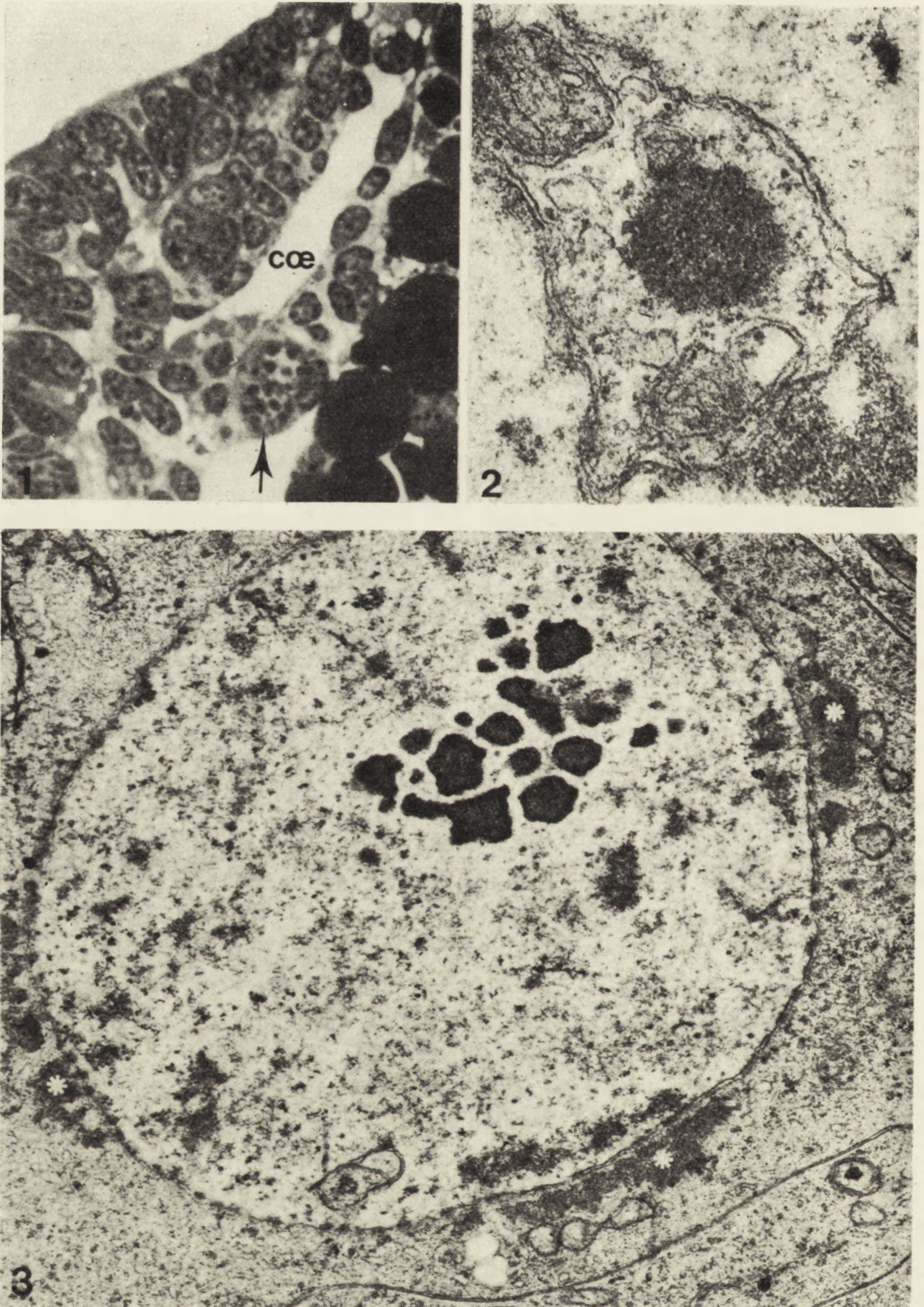
także wiele gatunków, które znoszą jaja bez oosomu. Bardzo trudno jest wysledzić u nich miejsce powstania komórek prapłciowych. Przyпуска się jednak, że u tych gatunków, które nie posiadają w jajach wyznaczników linii płciowej, determinacja komórek prapłciowych zachodzi na podobnych zasadach [86] jak poprzednio opisano.

W niniejszym artykule omówimy różne sposoby powstawania komórek prapłciowych owadów, ich wędrówki do zawiązków gonad, a także omówimy zachowanie się tych komórek w okresie zakładania gonad zarodkowych. Przedyskutowane zostaną ponadto przypuszczenia na temat mechanizmów działania determinantów płciowych, a także znaczenie, charakterystycznego dla komórek linii płciowej, „elektronowo gęstego, ziarnisto-włóknistego materiału, nie otoczonego błoną, zwanego „nuage”. Za przykład, do którego będziemy się najczęściej odwoływać, posłuży *Tetradontophora bielanensis* (*Collembola*), najdokładniej, obok *Drosophila melanogaster*, pod tym względem poznany gatunek, a ponadto prymitywny filogenetycznie w obrębie owadów.

1. POWSTAWANIE KOMÓREK PRAPŁCIOWYCH

Do gatunków, u których najpóźniej pojawiają się komórki prapłciowe, należy szczeciogonek *Thermobia domestica*. Jajo centrolecytalne tego owada ma bardzo cienką warstwę periplazmy. Bruzdkujące jądra przesuwają się ku powierzchni, gdzie powstaje blastoderma. Z jednowarstwowego prążka zarodkowego, powstającego na jednym z biegunów jaja, niektóre komórki wwędrowują w przestrzeń pomiędzy żółtkiem a ektoderma i tworzą mezoderma. Wkrótce, mezoderma zawija swoje brzegi i tworzy woreczki celomatyczne, po parze w każdym segmencie. Kiedy utworzą się woreczki celomatyczne w segmentach odwłokowych (od drugiego do szóstego) w ścianach ich, zwróconych w stronę żółtka, można zauważyć komórki, które mają chromatynę zbitą w charakterystyczne grudki (ryc. 1). Komórki te, określane od tego okresu jako prapłciowe, dzielą się dwa albo trzy razy, tworząc grupę wyraźnie różniącą się od komórek mezodermy [60]. Poza odmiennym wyglądem jądra i charakterystycznym rozłożeniem organelli komórkowych w cytoplazmie, komórki prapłciowe *Thermobia domestica* posiadają typowe, nieobecne w komórkach somatycznych tego gatunku organelle, zwane materiałem chmurkowym [59]. W trakcie rozpadu woreczków celomatycznych komórki mezodermalne przylegające bezpośrednio do komórek prapłciowych tworzą osłonkę gonady zarodkowej i stanowią zawiązek komórek folikularnych [60].

Spośród gatunków, u których bardzo wcześnie powstają komórki prapłciowe najlepiej zbadany jest *Drosophila melanogaster*, jednakże

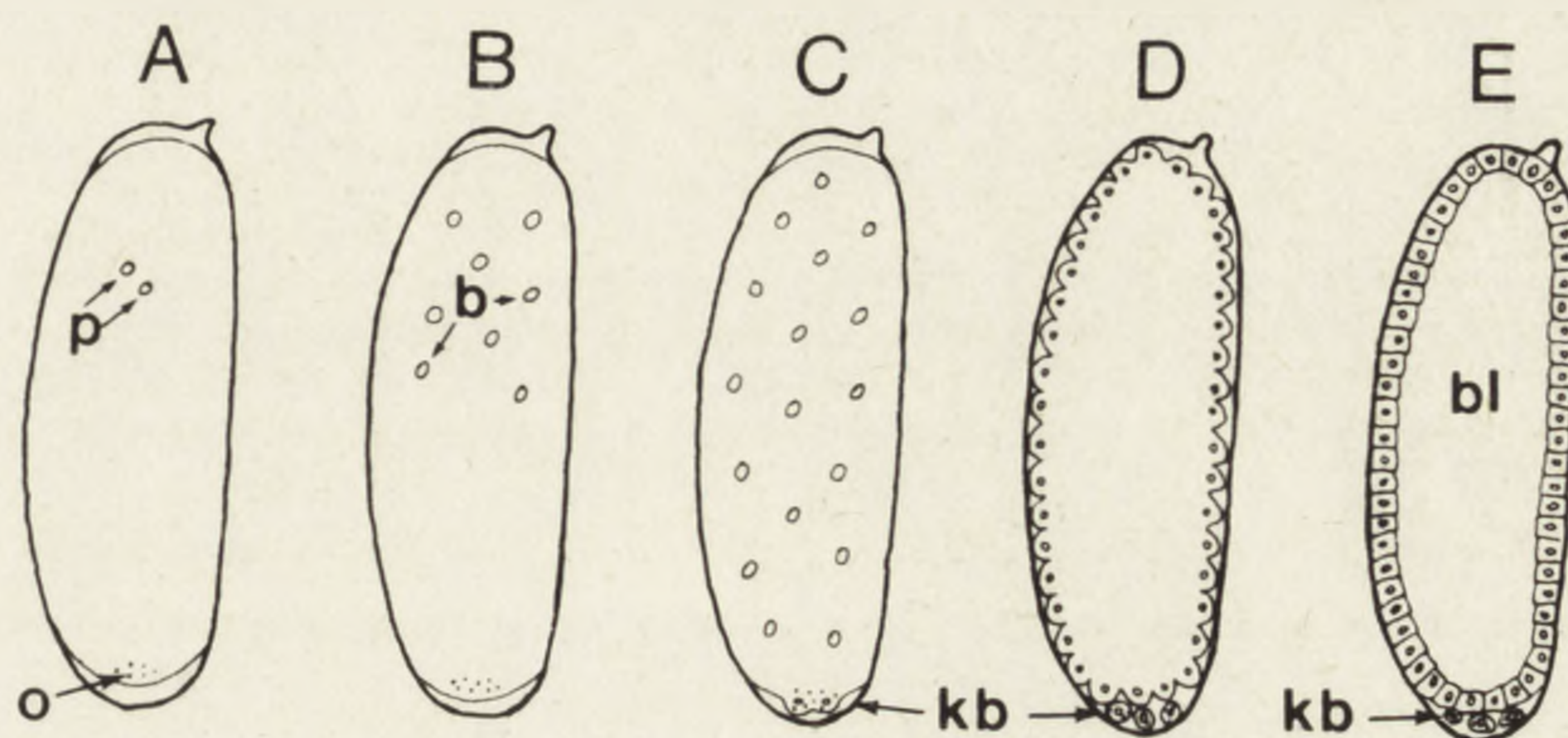


Ryc. 1. Fragment zarodka *Thermobia domestica* przedstawiający przekrój przez woreczek celomatyczny (coe), w którego ścianie tkwią komórki prapłciowe (strzałka). Pow. $\times 1100$

Ryc. 2. Ziarno biegunowe *Tetrodontophora bielensis*. Pow. $\times 47\,000$

Ryc. 3. Przekrój przez kuliste jądro komórki prapłciowej *Melasoma saliceti* w okresie zakładania gonad. Skupienia nuage (białe gwiazdki) znajdują się w bliskim sąsiedztwie otoczki jądrowej. Pow. $\times 22\,000$

u większości *Diptera*, *Coleoptera* i *Hymenoptera* [7] komórki prapłciowe powstają w podobny sposób (ryc. 8). Wszystkie te owady składają jaja zaopatrzone w skupienie bazofilnej cytoplazmy znajdujące się przy tylnym biegunie jaja (ryc. 4). Ten obszar cytoplazmy nazwany został ooso-

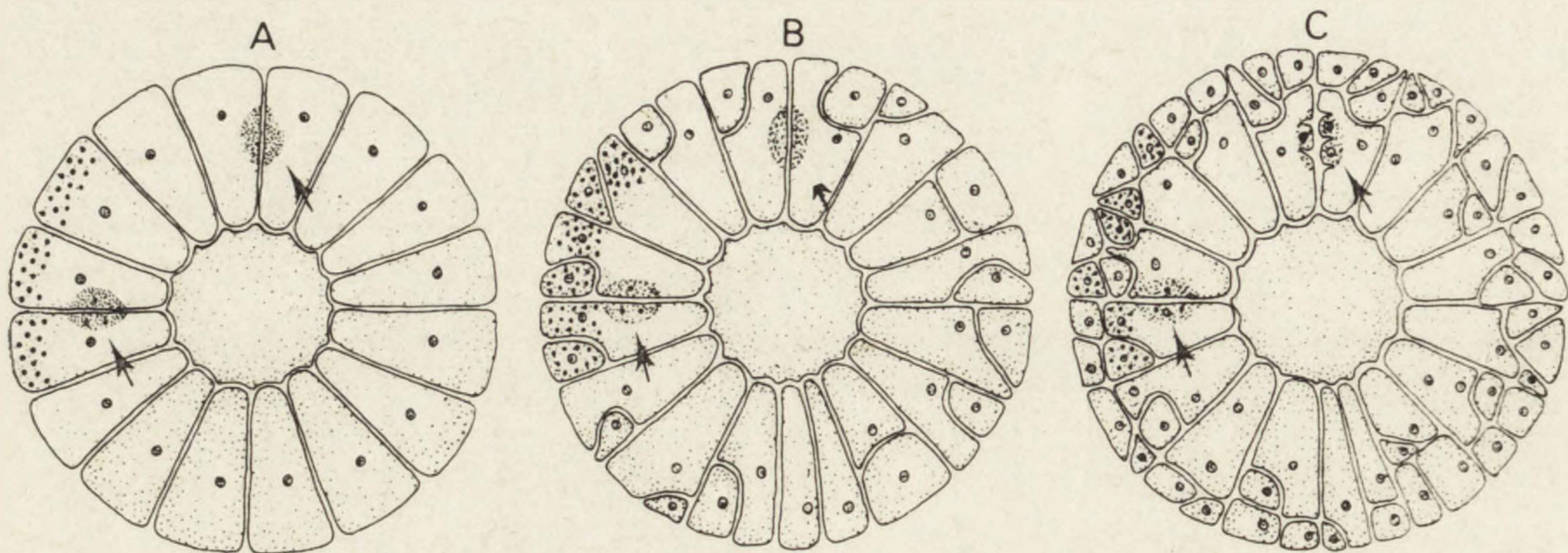


Ryc. 4. Wczesny rozwój zarodkowy *Drosophila melanogaster*. A — zbliżanie się przedjądrzy (p) męskiego i żeńskiego. Na tylnym biegunie jaja kropki przedstawiają ziarna biegunowe skupione w oosom (o). B — pierwsze podziały bruzdkowania. Namnażające się jądra blastomerów rozprzestrzeniają się w ooplazmie. C — najwcześniej do periplazmy wnikają jądra na tylnym biegunie zarodka w obręb oosomu. D — stadium blastodermy syncytialnej. Komórki biegunowe (kb) są już całkowicie otoczone błonami komórkowymi. E — stadium blastodermy komórkowej. Komórki biegunowe (prapłciowe) znajdują się na zewnątrz blastodermy

mem. W czasie bruzdkowania, jądra dzieląc się przesuwają się ku powierzchni, gdzie w końcu tworzą syncytialną blastodermę. Jądra, które weszły w obszar oosomu, natychmiast oddzielają się kompletnymi błonami komórkowymi od cytoplazmy jaja i są pierwszymi, całkowicie uformowanymi komórkami w zarodku. Powstają na tylnym biegunie jaja i dlatego zostały nazwane komórkami biegunowymi. Po wyodrębnieniu się komórek biegunowych, jądra blastodermy syncytialnej zostają oddzielone błonami komórkowymi od siebie, a następnie od strony cytoplazmy centralnej zawierającej żółtko, w wyniku czego powstaje blastoderma komórkowa. Komórki biegunowe reprezentują bardzo wczesnie wyodrębnione komórki prapłciowe (ryc. 4).

Bardzo wczesnie, bo przed uformowaniem blastodermy, ale w nieco inny sposób, powstają komórki prapłciowe *Tetradontophora bielanensis*. Samice tego gatunku składają jaja kuliste, o żółtku rozmieszczonym równomiernie w całej objętości tak, że nie można wyznaczyć żadnej osi symetrii. Oś taką można wyznaczyć jedynie za pomocą reakcji cytochemicznych, dzięki którym ujawnia się biegun bogaty w RNA [25]. Na tym biegunie właśnie powstają w zarodkach *T. bielanensis* komórki prapłciowe (ryc. 5). Bogatą w RNA cytoplazmę pod tym biegunem można więc nazwać oosomem. Jajo *T. bielanensis* bruzduje całkowicie, ale bardzo nieregularnie. Początkowo bruzdy biegną promieniście, ale od stadium 64 komórek zaczynają się podziały tangencjalne, w wyniku któ-

rych powstają blastomery wewnętrzne i zewnętrzne (ryc. 5). W trakcie podziałów tangencjalnych, w obszarze oosomu powstają komórki zawierające

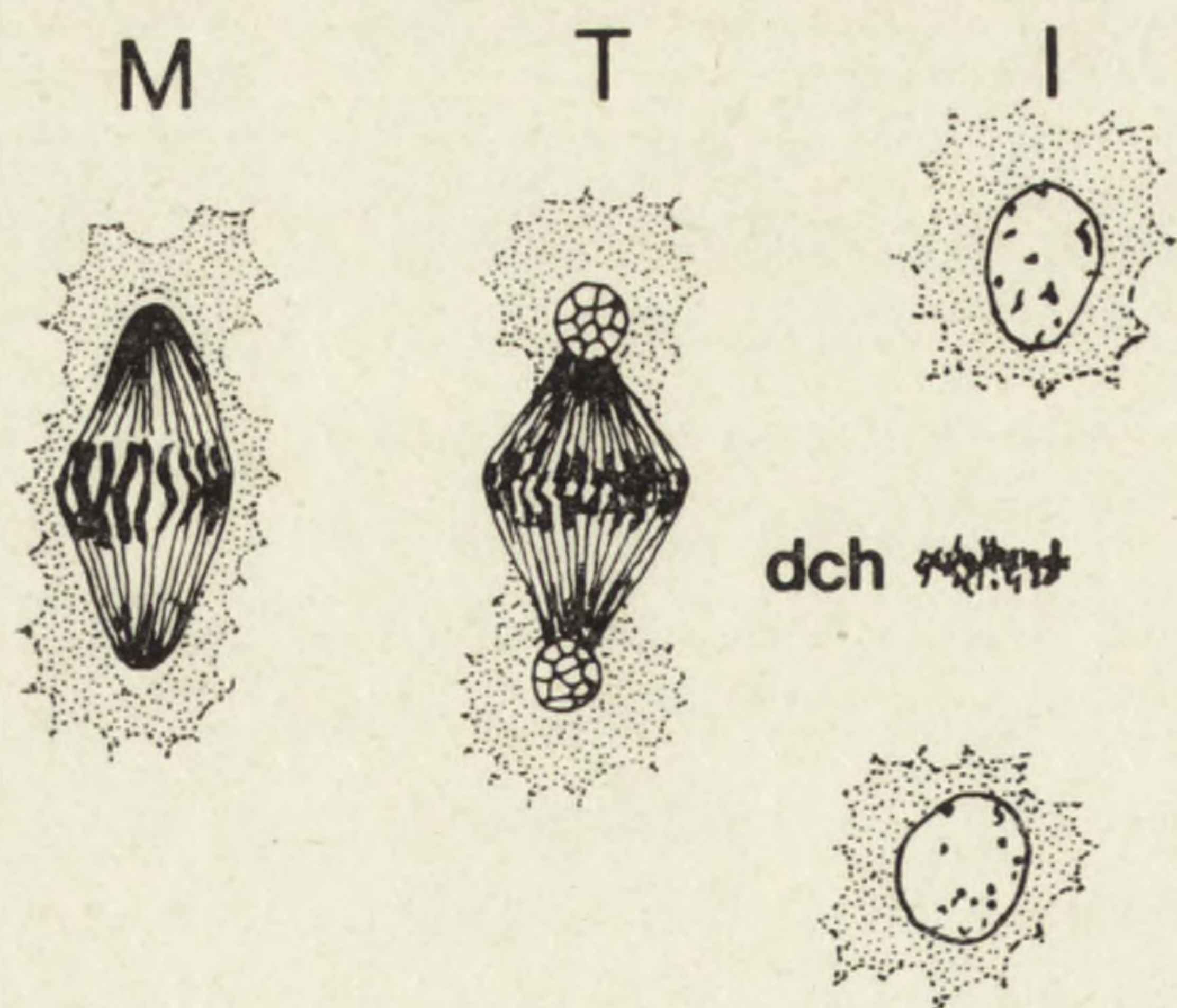


Ryc. 5. Schemat ilustrujący powstawanie komórek prapłciowych *Tetrodonotopora bielensis*. Duże kropki oznaczają obszar zawierający ziarna biegunowe. Strzałki oznaczają miejsca tworzenia się komórek żółtkowych. A — stadium 32 blastomerów. B — stadium 64 blastomerów. C — stadium 128 blastomerów. Komórki powstałe w obszarze zawierającym ziarna biegunowe są komórkami prapłciowymi [61]

rające znaczną liczbę kulistych skupień gęstego dla elektronów, nieobłonionego materiału o strukturze ziarnisto-włóknistej (ryc. 2) [61].

Komórki prapłciowe *T. bielensis*, pomimo zupełnie odmiennego sposobu bruzdkowania, powstają więc podobnie jak u *Diptera*, *Coleoptera* i *Hymenoptera*, w powierzchniowych częściach jaja. W odróżnieniu jednak od wymienionych rzędów *Pterygota*, komórki prapłciowe *T. bielensis* wkrótce po oddzieleniu się od komórek organizującej się blastodermy wędrują do wnętrza żółtka, gdzie zgrupowane po kilkanaście oczekują, aż rozwinię się prątek zarodkowy.

Wśród owadów posiadających w jajach oosom wykryto wiele gatunków, u których w czasie bruzdkowania zachodzi zjawisko eliminacji chromosomów (ryc. 6). Dzielące się jądra w zarodkach tych gatunków



Ryc. 6. Schemat ilustrujący przebieg eliminacji chromosomów w blastomerach somatycznych *Miastor americana*. M — metafaza, T — telofaza, I — interfaza. Pomędzy jądrami potomnymi pozostała grupa degenerujących chromosomów (dch)

[10]

przesuwają się ku powierzchni. Kiedy jądra przesuwające się do bieguna tylnego wejdą w obszar oosomu, pozostałe jądra, znajdujące się w ooplazmie przechodzą podziały, w wyniku których do jąder potomnych wchodzi tylko część chromosomów, a pozostałe chromosomy degenerują. U *Miastor americana* 12 chromosomów, w każdym jądrze komórkowym, zostaje zamkniętą osłonką jądrową, a 36 degeneruje (ryc. 6); u *Mayetiola destructor* po 8 z 40 chromosomów pozostaje w komórkach somatycznych, a 32 degeneruje; u *Wachtliella persicariae* tylko 8 albo 6 (w zależności od płci) z 40 chromosomów pozostaje, a 32 albo 34 degeneruje. W komórkach somatycznych *Sciara coprofila* także zachodzi eliminacja chromosomów, ale bardzo skomplikowana. Należy zwrócić tu uwagę, że u żadnego z tych gatunków nie ma eliminacji chromosomów w jądrach, które znalazły się w obrębie oosomu.

2. ZNACZENIE PLAZMY BIEGUNOWEJ

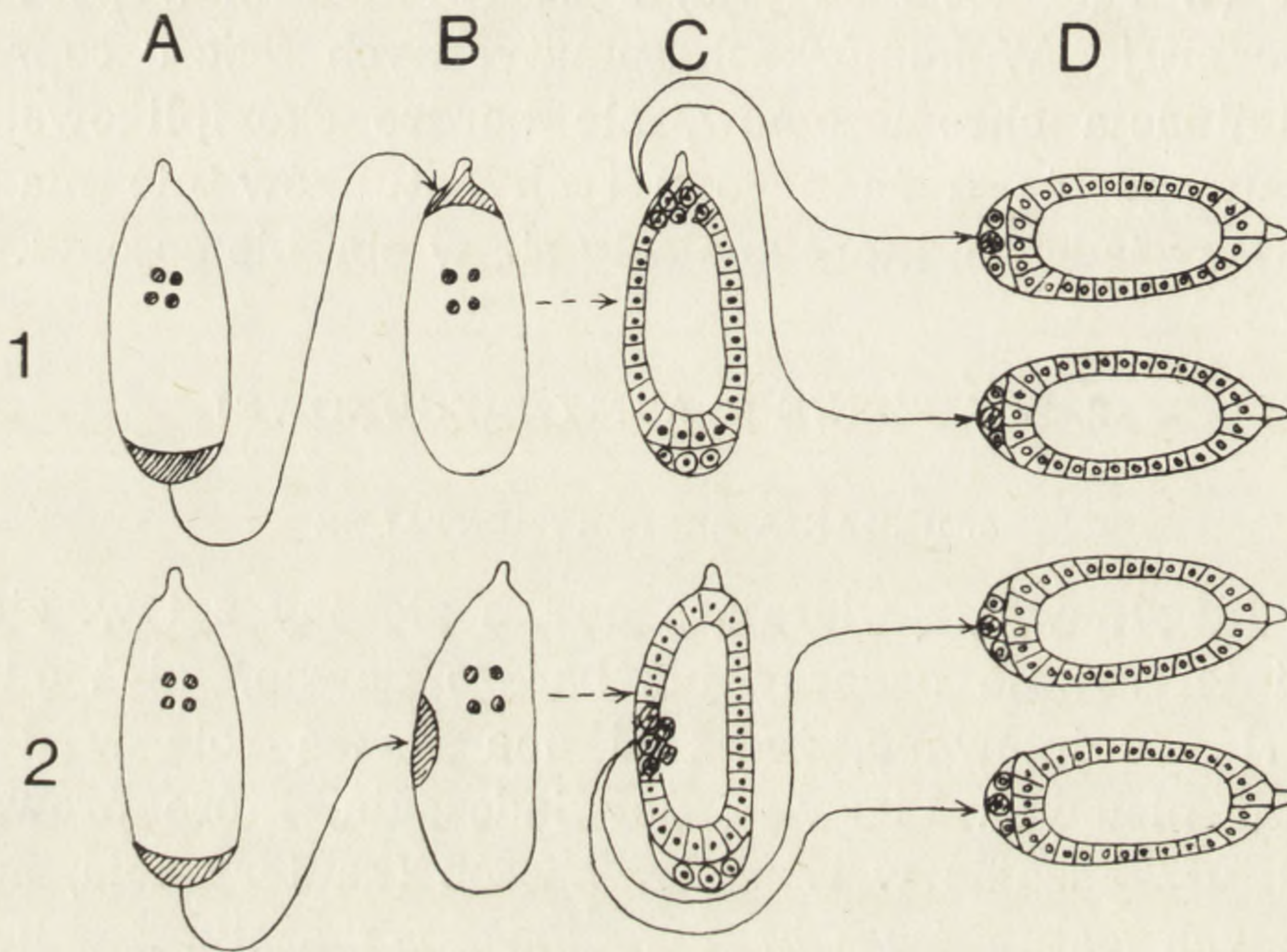
a. BADANIA EKSPERYMENTALNE

Plazma biegunowa (zawierająca oosom złożony z tzw. ziarn biegunowych) zainteresowała badaczy już bardzo dawno, gdyż od czasu jej odkrycia [77] podejrzewano, że pełni ona ważną rolę w determinacji komórek linii płciowej. Pierwsze doświadczenia, które prowadził Hegner [36, 37], uszkadzając w rozmaity sposób (kauteryzacja, nakłuwanie) zarodki różnych gatunków *Chrysomelidae*, wykazały, że bez plazmy biegunowej nie tworzą się komórki prapłciowe, a gonady osobników doświadczalnych pozostają sterylne. Podobne wyniki otrzymała Geyer-Duszyńska [27], uszkadzając termokauterem tylny biegun w jajach *Wachtliella persicariae* i Richard-Mercier [85] przy analogicznym doświadczeniu nad *Leptinotarsa decemlineata*. Przewiązanie wydłużonego jaja *Pimpla turionellae* już przy biegunie tylnym, odcinające oosom od reszty jaja, także doprowadza do sterylizacji gonad w rozwijających się zarodkach [1]. Wirowanie jaj ułożonych biegunami przednimi na zewnątrz powoduje przemieszczenie i rozproszenie ziarn biegunowych, w wyniku czego u *Drosophila melanogaster* nie tworzą się komórki biegunowe [46], a u *Wachtliella persicariae* [27, 106] i *Mayetiola destructor* [19] ponadto zachodzi eliminacja chromosomów w jądrach znajdujących się na tylnym biegunie jaja.

Kiedy Geigy [26] napromieniował jaja *D. melanogaster* promieniami ultrafioletowymi, stwierdził, że dorosłe muchy, które rozwinęły się z takich jaj posiadały sterylne gonady. Sterylizujący wpływ promieniowania był jednak największy, gdy działano na najmłodsze jaja, a w miarę upływu czasu coraz mniejszy procent zarodków wykazywał gonady ste-

rylne [29, 30]. Jednakże wstrzyknięcie do napromieniowanego jaja cytoplazmy z tylnego bieguna jaj zdrowych, odtwarza zdolności tworzenia komórek biegunowych i tym samym płciowych [105].

Bardzo interesująco przedstawiają się wyniki doświadczeń polegających na przeszczepianiu bądź to jąder, bądź też fragmentów cytoplazmy, pomiędzy jajami czy zarodkami *Drosophila* (ryc. 7). Illmensee i Mahowald [44] przeszczepiali plazmę biegunową niezmutowanych zarodków *Drosophila* do przedniego bieguna albo do brzusznej części za-



Ryc. 7. Schemat ilustrujący doświadczenie, które wykazało zdolność plazmy biegunowej (zakreśkowana część zarodka) do indukowania funkcjonalnych komórek płciowych. Górny rząd (1) przedstawia przeszczepianie oosomu do przedniego bieguna; dolny rząd (2) do brzusznej części zarodka. A i B — przeszczepianie cytoplazmy, C i D — przeszczepianie komórek. A. — dawca niezmutowany. B — biorca *mwhe*⁴, C — dawca *mwhe*⁴, D — biorca *y sn*³*mal*. Dalsze objaśnienia w tekście [42]

rodków szczepu *mwhe*⁴. W obręb tej wszczepionej cytoplazmy wchodziły jądra zmutowanego szczepu i wraz z tą cytoplazmą, w nietypowym miejscu, bo na biegunie przednim zarodka albo w połowie jego długości, tworzyły się komórki prapłciowe zawierające genom *mwhe*⁴. Jeśli z kolei te komórki wszczepiono do tylnego bieguna zarodków szczepu *y sn*³*mal*, powstałe z nich muchy zawierały w gonadach komórki płciowe zarówno szczepu *y sn*³*mal*, jak i szczepu *mwhe*⁴. Stąd wydaje się pewny fakt, że plazma biegunowa zawiera rzeczywiście determinanty linii płciowej, które funkcjonują autonomicznie, niezależnie od miejsca, w którym się znajdują [42, 43].

Przeszczepianie plazmy biegunowej *D. immigrans* do zarodków *D. melanogaster* wykazało, że determinanty linii płciowej nie są specyficzne gatunkowo, lecz funkcjonują także w zarodkach innego gatunku indukując w nim powstawanie funkcjonujących komórek płciowych [45, 74].

b. BADANIA CYTOCHEMICZNE I ULTRASTRUKTURALNE

Liczne badania cytochemiczne przeprowadzone na poziomie mikroskopu świetlnego nad oosomem owadów wykazały obecność RNA w tej strukturze [15, 78, 99]. Na poziomie mikroskopu elektronowego stwierdzono, że tworzące oosom ziarna biegunowe zawierają RNA, gdyż gęstość elektronowa powstała po traktowaniu skrawków trójchlorkiem indu zanika, jeśli się je trawi kwasem nadchlorowym [69]. Poulson i Waterhouse [84] naświetlając tylne bieguny zarodków *D. melanogaster* i *Lucilla curpina* promieniami UV o różnej długości fali stwierdzili, że największy efekt powodują promienie o długości fali 253,6 nm, które są najmocniej absorbowane przez RNA. Warto tu jednak zwrócić uwagę, że, jak wykazały badania Mahowalda [69], zdolność ziarn biegunowych do wiązania indu lub barwienia barwnikami zasadowymi zanika u *D. melanogaster* wraz z rozwojem blastodermy, czyli po wyodrębnieniu się komórek biegunowych.

Badania ziarn biegunowych *D. melanogaster*, przeprowadzone za pomocą mikroskopu elektronowego przez Mahowalda [66] i powtórzone przez Ullmann [102] ujawniły, że elementy te zbudowane są z materiału ziarnisto-włóknistego, skupionego w grudki, nie otoczone żadną błoną cytoplazmatyczną i często zawierające jasny rdzeń. Podobnie zbudowane są te ziarna u *Coelopa frigida* [91, 92], a także u wielu innych gatunków owadów (ryc. 2, 8) [67]. Pomimo znacznych podobieństw w wyglądzie tych ziarn, spowodowanych głównie strukturą materiału budującego je, szczegółowe badania wyglądu, rozmieszczenia, a także zachowania się ich w czasie rozwoju u różnych gatunków *Drosophila* ujawniły wiele cech specyficznych gatunkowo [15, 67].

Ziarna biegunowe *Tetrodontophora bielanensis* mają postać regularnych kul zbudowanych z materiału o podobnej strukturze jak u *Diptera* (ryc. 2). Mają one wielkość mitochondriów i często stykają się z tymi organellami [61, 62].

U innych owadów, takich jak *Leptinotarsa decemlineata* [32], *Miasator* sp. [71], *Anurida maritima* czy *Proisotoma minuta* [100], elementy budujące oosom mają wygląd nieregularnej sieci utworzonej z masy elektronowo gęstego, ziarnisto-włóknistego materiału, bardzo podobnego do materiału budującego ziarna biegunowe u opisanych gatunków.

c. MECHANIZMY DZIAŁANIA DETERMINANTÓW PŁCIOWYCH

Mechanizmy determinacji komórek linii płciowej owadów są, moim zdaniem, uniwersalne i dotyczą wszystkich zwierząt posiadających w jajach wyznaczniki toru płciowego (ziarna *P. Aschelminthes*, ciało barwliwe *Chaetognatha*, ektosomy *Copepoda*, ziarna biegunowe owadów, cytoplazma płciowa płazów itp.). O prawidłowości takiego sądu świadczą między innymi dobrze udokumentowane podobieństwa zachowania się tych elementów u owadów i u płazów [10, 28, 73, 93].

U wszystkich gatunków owadów, gdzie ziarna biegunowe badano w trakcie rozwoju zarodkowego, stwierdzono zmiany w ich strukturze i rozmieszczeniu ściśle zależne od stadium rozwojowego [15]. W normalnym rozwoju zmiany prześledzono najlepiej u różnych gatunków *Drosophila* [67, 68], u *Miastor* sp. [71], w pierwszych stadiach rozwojowych *Coelopa frigida* [92] i w czasie rozwoju zarodkowego *T. bielanensis* [62].

Zmiany w strukturze i rozmieszczeniu ziarn biegunowych, w trakcie wyodrębniania się i tworzenia komórek prapłciowych, wiąże się z ich rolą w procesie determinacji tych komórek [91]. Ponadto, przy obserwacji tych elementów w pobudzonych do rozwoju, niezapłodnionych jajach *Coelopa frigida* stwierdzono, że zmiany są autonomiczne i zachodzą w ściśle określonym tempie, niezależnie od tego, czy jądra komórkowe są w pobliżu, czy ich nie ma [91].

Doświadczenia opisane w podrozdziałach a i b sugerują bardzo wyraźnie, że ziarna biegunowe, będące charakterystycznym składnikiem plazmy biegunowej, są siedliskiem determinantów płciowych, czyli substancji, która skierowuje komórki biegunowe na drogę linii płciowej. Zarówno badania cytochemiczne, jak i naświetlanie promieniami UV

Rys. 8. Fragment komórki biegunowej *Melasoma saliceti*. Strzałki wskazują fragmenty oosomu; n — jądro. Pow. $\times 29\ 000$

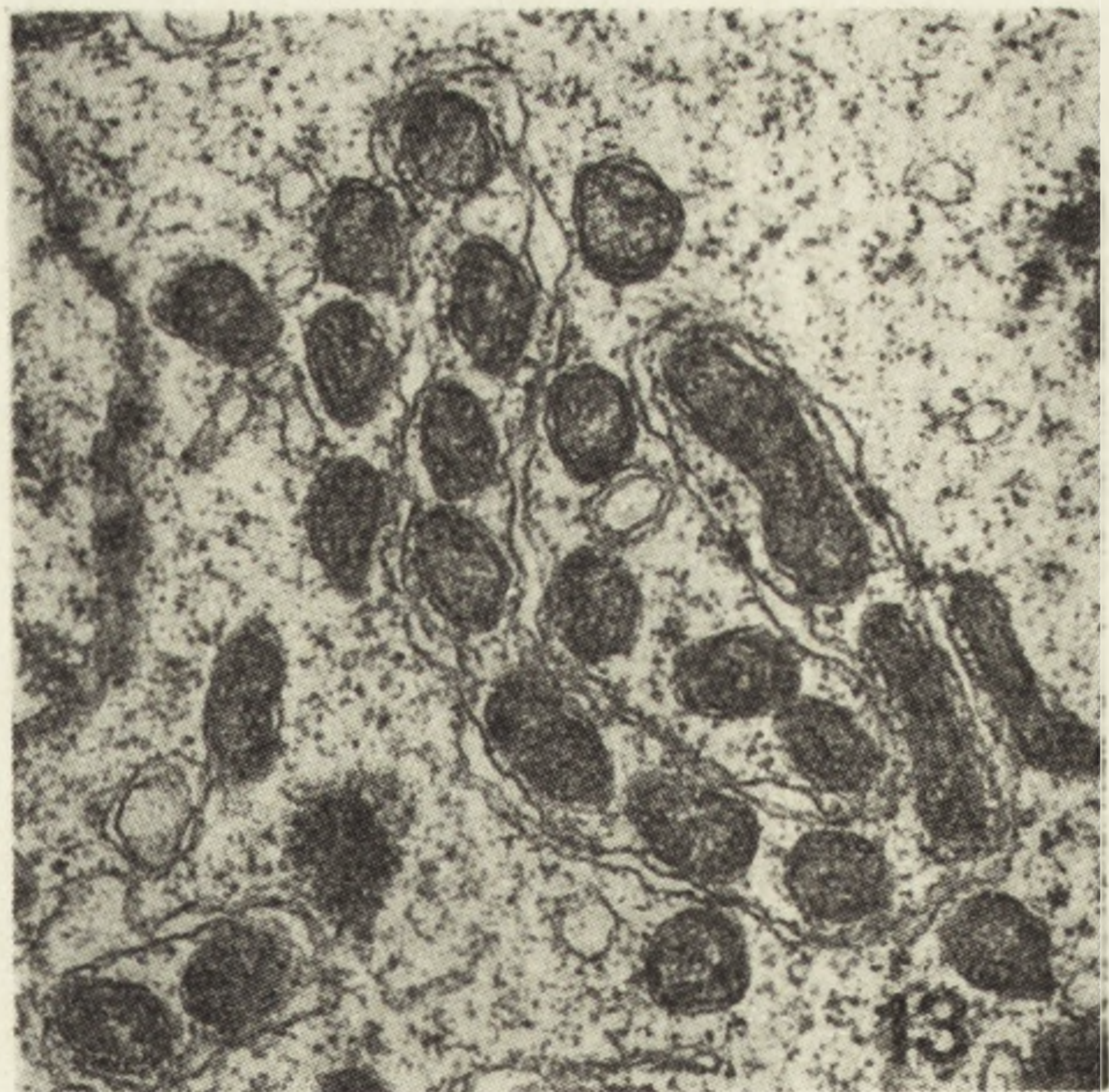
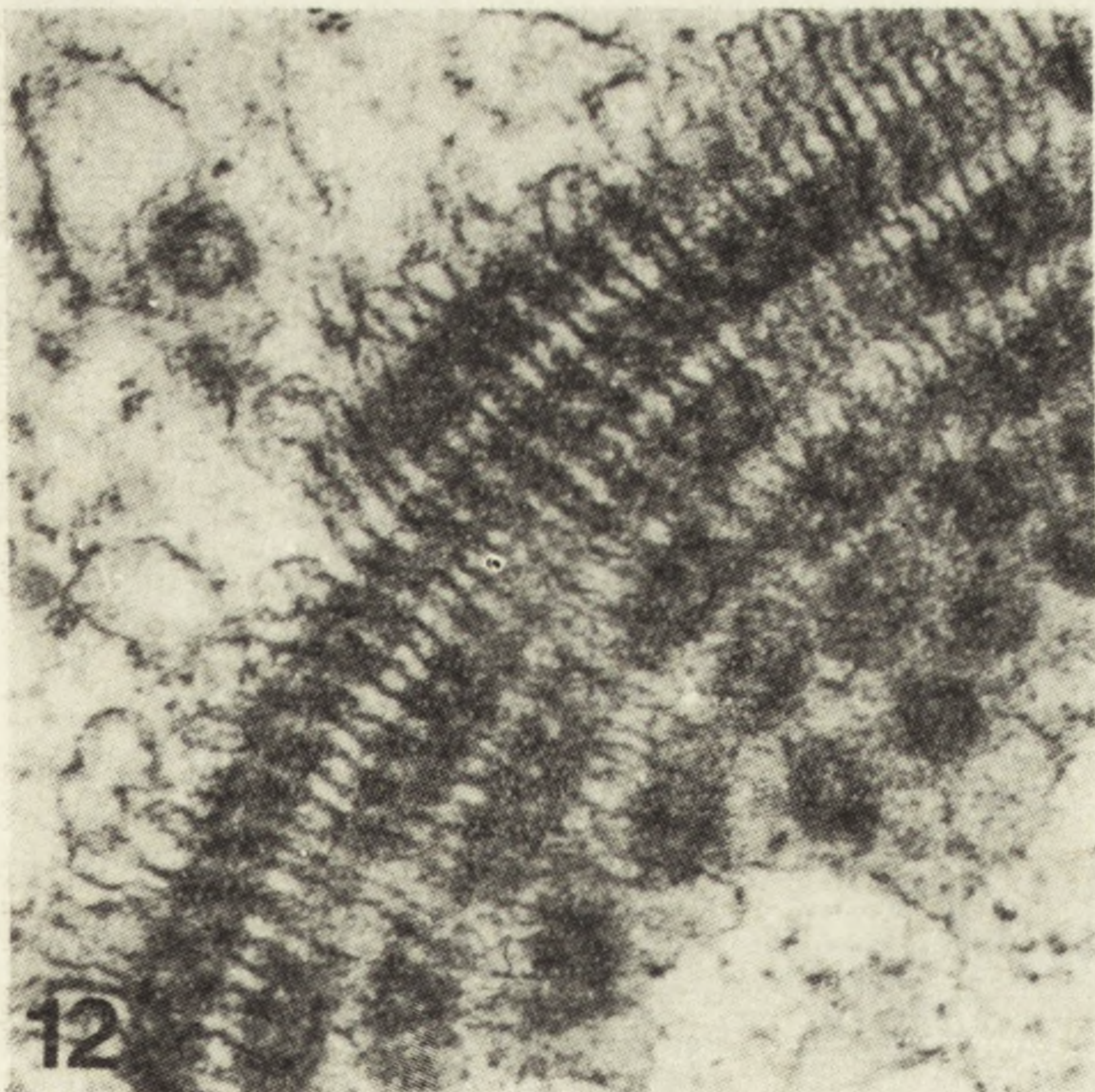
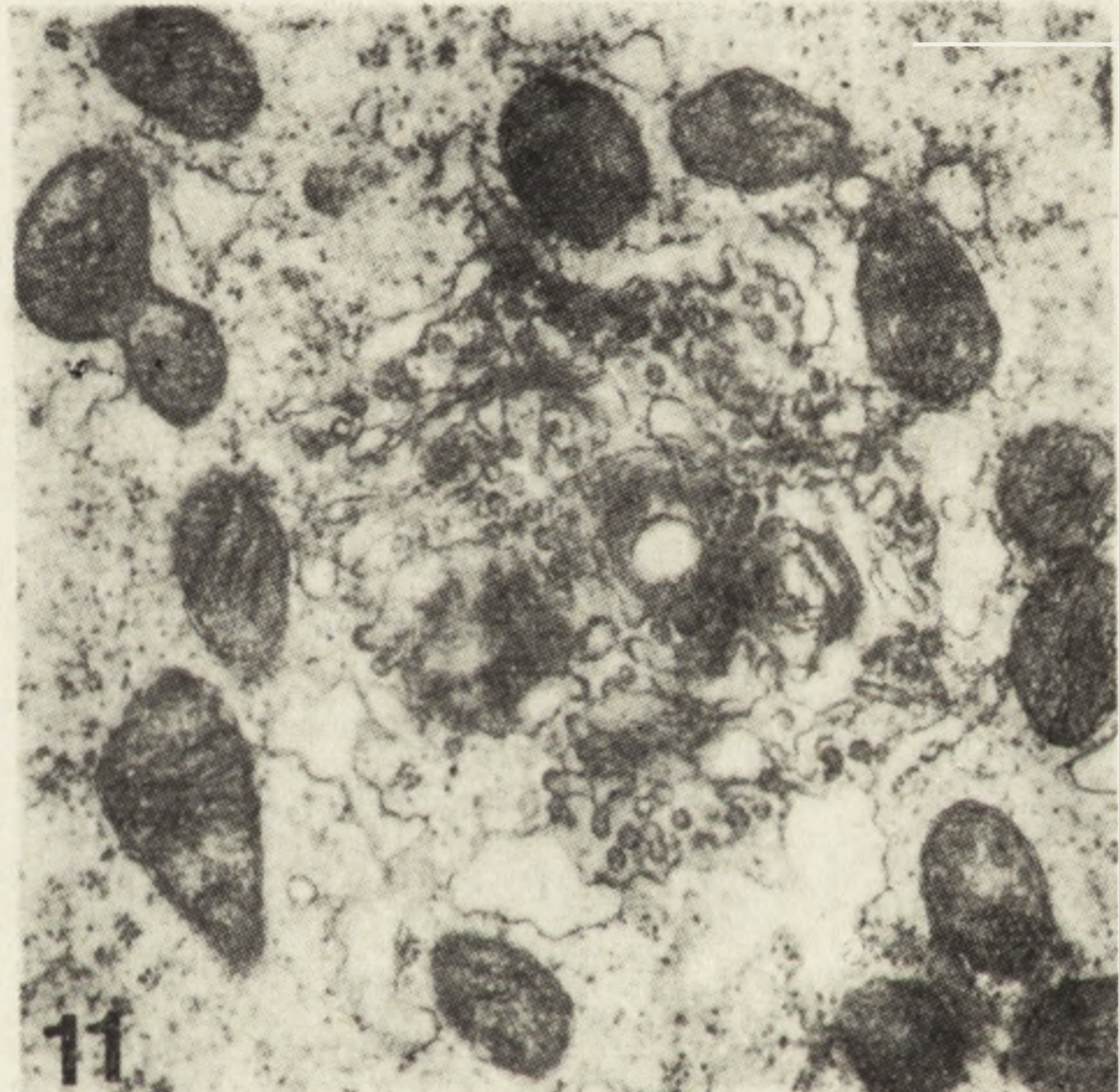
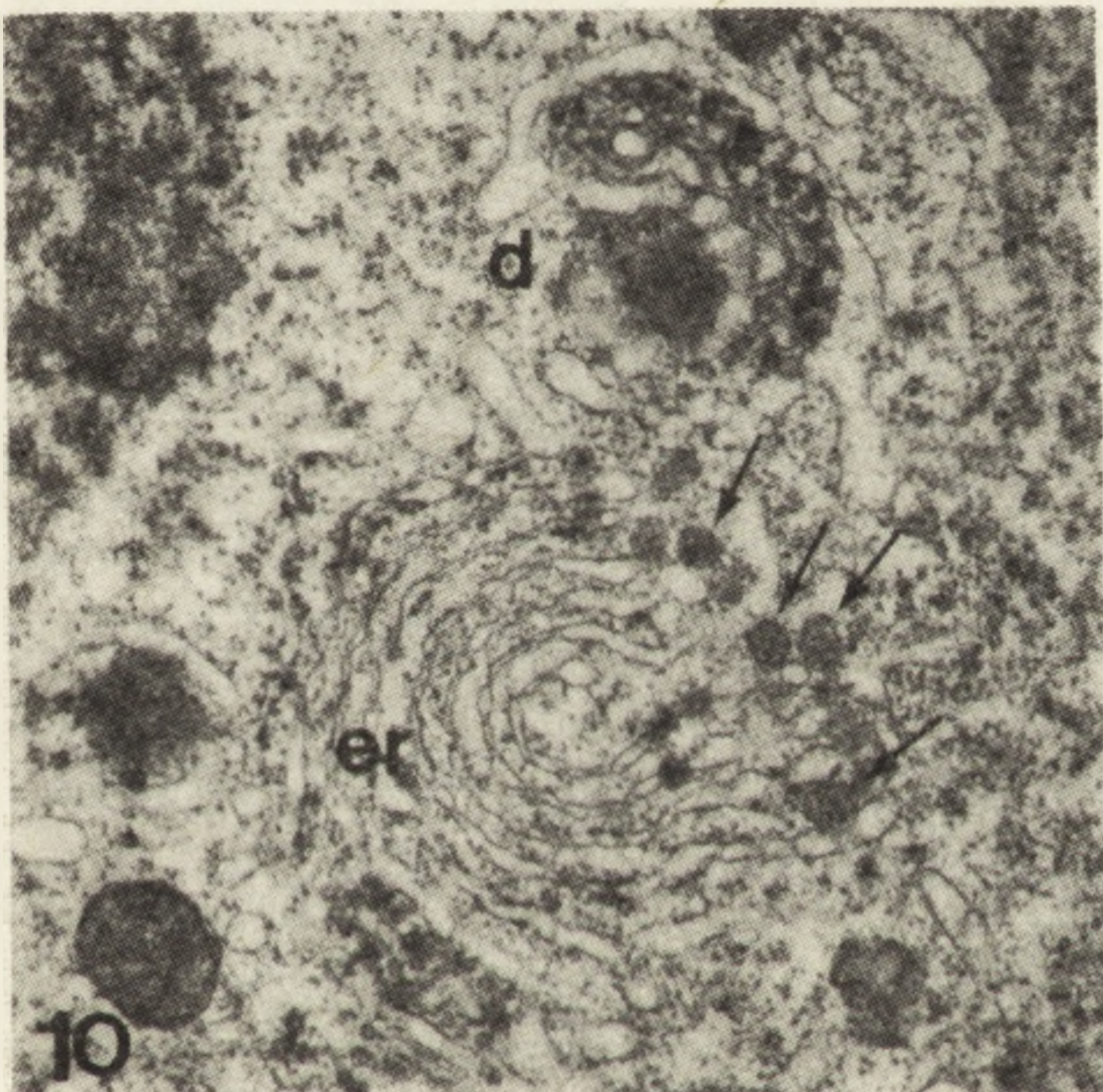
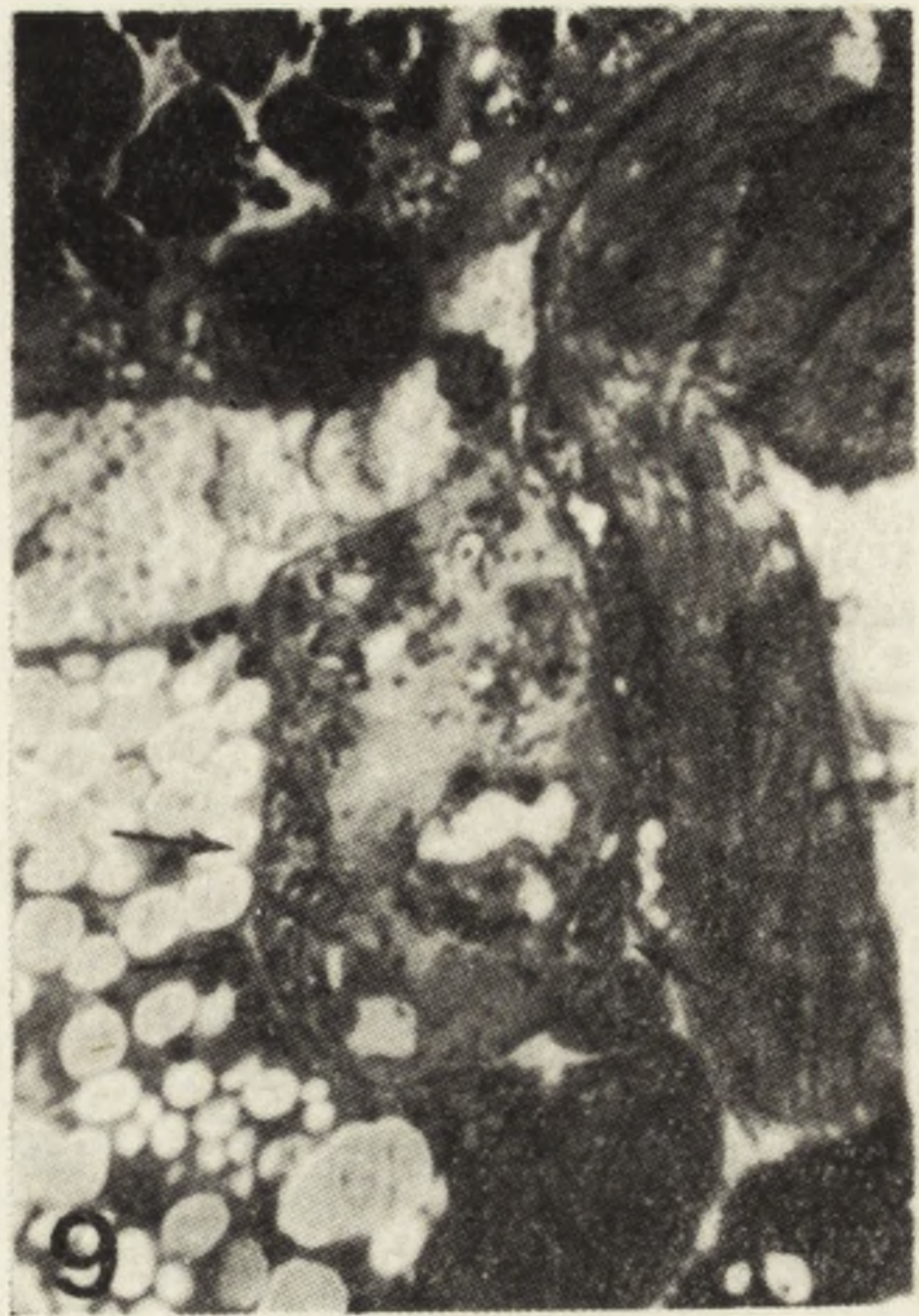
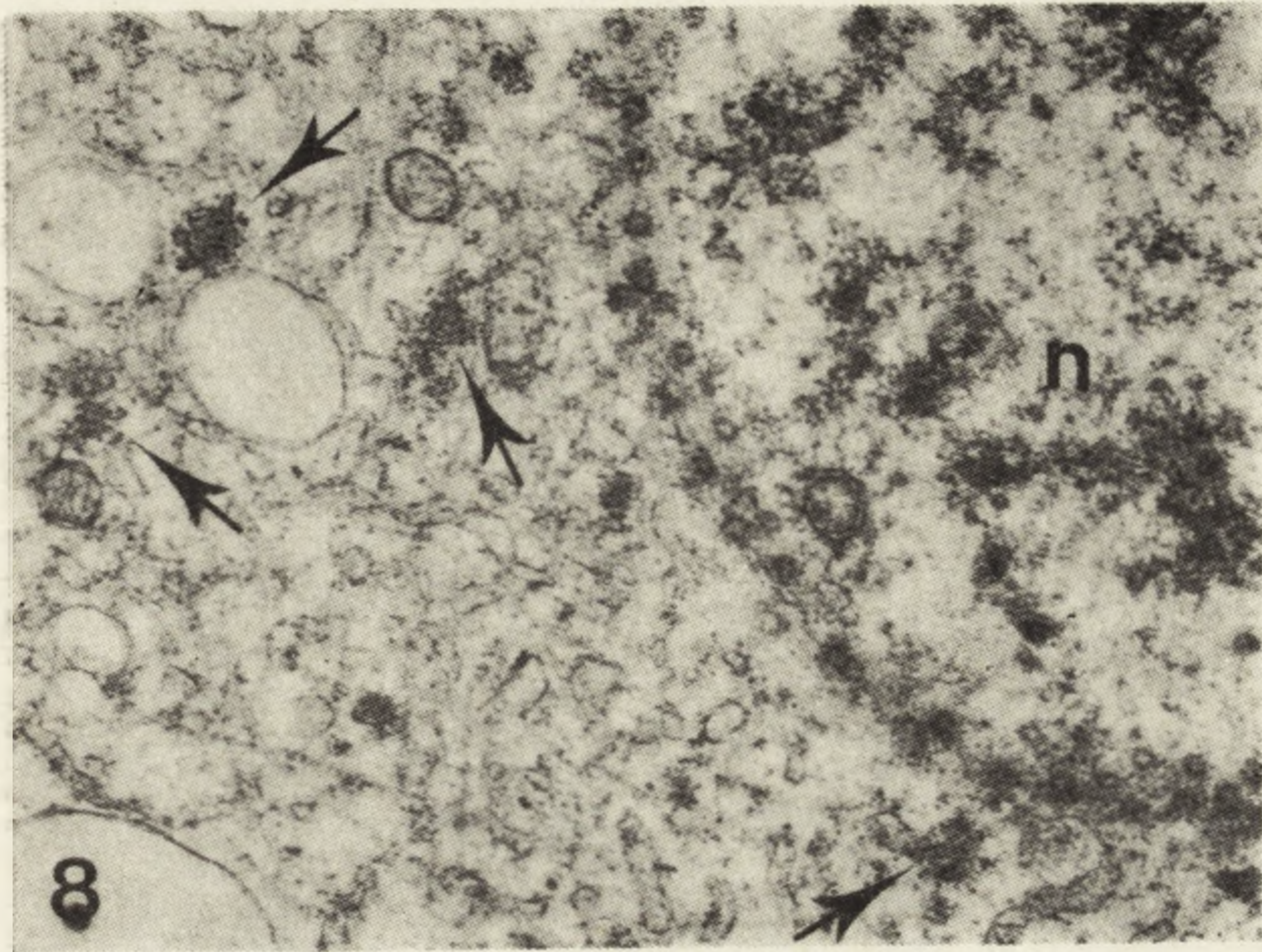
Ryc. 9. Związek gonady *T. bielanensis* zbudowany z nielicznych, mających nieregularne jądra komórek prapłciowych, otoczonych spłaszczonymi komórkami somatycznymi. Strzałki wskazują trzy przekrojone jądra komórek somatycznych gonady. Pow. $\times 550$

Ryc. 10. *T. bielanensis* w okresie zakładania gonad. Aparat Golgiego (d) w sąsiedztwie zwoju siateczki śródplazmatycznej (er) otoczony elektronowo gęstymi pęczkami (strzałki). Pow. $\times 18\ 500$

Rys. 11. *T. bielanensis* w okresie zakładania gonad. Aparat Golgiego otoczony mitochondriami. Pow. $\times 25\ 000$

Ryc. 12. *T. bielanensis* w okresie zakładania gonad. Stos błon pierścieniowych. Pow. $\times 48\ 000$

Ryc. 13. *T. bielanensis* w okresie tworzenia gonad. „Rury” utworzone przez cysterne siateczki śródplazmatycznej wypełnione mitochondriami. Pow. $\times 16\ 000$



wskazują, że tą substancją jest RNA. Najbardziej prawdopodobnym kandydatem, spośród różnych rodzajów tego kwasu jest m-RNA. Odkładany on jest w oocycie w trakcie oogenezy w formie zamaskowanej, a w momencie zapłodnienia komórki jajowej zostaje odblokowany i kieruje produkcją specyficznego białka [65, 72, 104], które wchodzi do jądra komórkowego i wpływa w określony sposób na genom. Zmiany morfologiczne, obserwowane w obrębie ziarn biegunowych, mają na celu wyeksponowanie w cząsteczkach tych miejsc, które w poprzednim ułożeniu były nieaktywne [88-70, 73, 91, 92]. Stąd wynika następane zagadnienie: ile musi być determinantów w komórce, by została ona zdeterminowana w kierunku linii płciowej i co się dzieje, gdy jest ich za mało. Doświadczenia Jazdowskiej-Zagrodzińskiej [46], jak i obliczenia teoretyczne oparte na różnych eksperymentach [41] sugerują, że w komórce musi być dostateczna liczba determinantów, by ich działalność była skuteczna. Gdy są, ale w niewystarczającej ilości, komórka taka degeneruje [61]. Skoro więc determinanty płciowe działają tak zdecydowanie i drastycznie, wydaje się bardzo mało prawdopodobne, by komórki biegunowe, zdeterminowane w kierunku linii płciowej, mogły budować tkanki somatyczne, jak to sugerują niektórzy badacze [3, 4, 38, 82, 83]. Tym bardziej, że znanych jest wiele faktów wskazujących, że komórki prapłciowe, które nie dotarły do gonad, nie stają się komórkami żółtkowymi czy komórkami jelita, lecz degenerują [48, 49, 63, 103].

Możliwe są dwa sposoby oddziaływania determinantów na genom komórki, w której się znalazły. Pierwszy — byłby działaniem pozytywnym i polegałby na odblokowaniu (derepresji) specyficznego odcinka genomu, drugi — negatywnym, a determinanty płciowe uniemożliwiłyby danym komórkom różnicowanie się ich w kierunku linii somatycznej przez blokowanie (represję) specyficznego odcinka genomu. Zagadnienie to wyraźnie uwidacznia wczesny rozwój zarodkowy *T. bielanensis* [62]. U tego gatunku działanie determinantów płciowych jest bez wątpienia pozytywne, gdyż pierwszymi komórkami, które zmieniają wyraźnie swą ultrastrukturę i w rezultacie odróżniają się od pozostałych komórek są, obok pierwotnych komórek żółtkowych, komórki prapłciowe. Pozostałe komórki somatyczne w tym okresie dzielą się, ale nie zmieniają swej ultrastruktury [61, 62].

3. WĘDRÓWKI KOMÓREK PRAPŁCIOWYCH

Proces gametogenezy stawonogów zawsze toczy się w gonadach. Tylko w tych narządach gonocyty znajdują warunki odpowiednie do prawidłowego przeprowadzenia tego procesu. Komórki prapłciowe po-

wstają jednak w miejscach odległych od gonad, muszą więc do nich przewędrować.

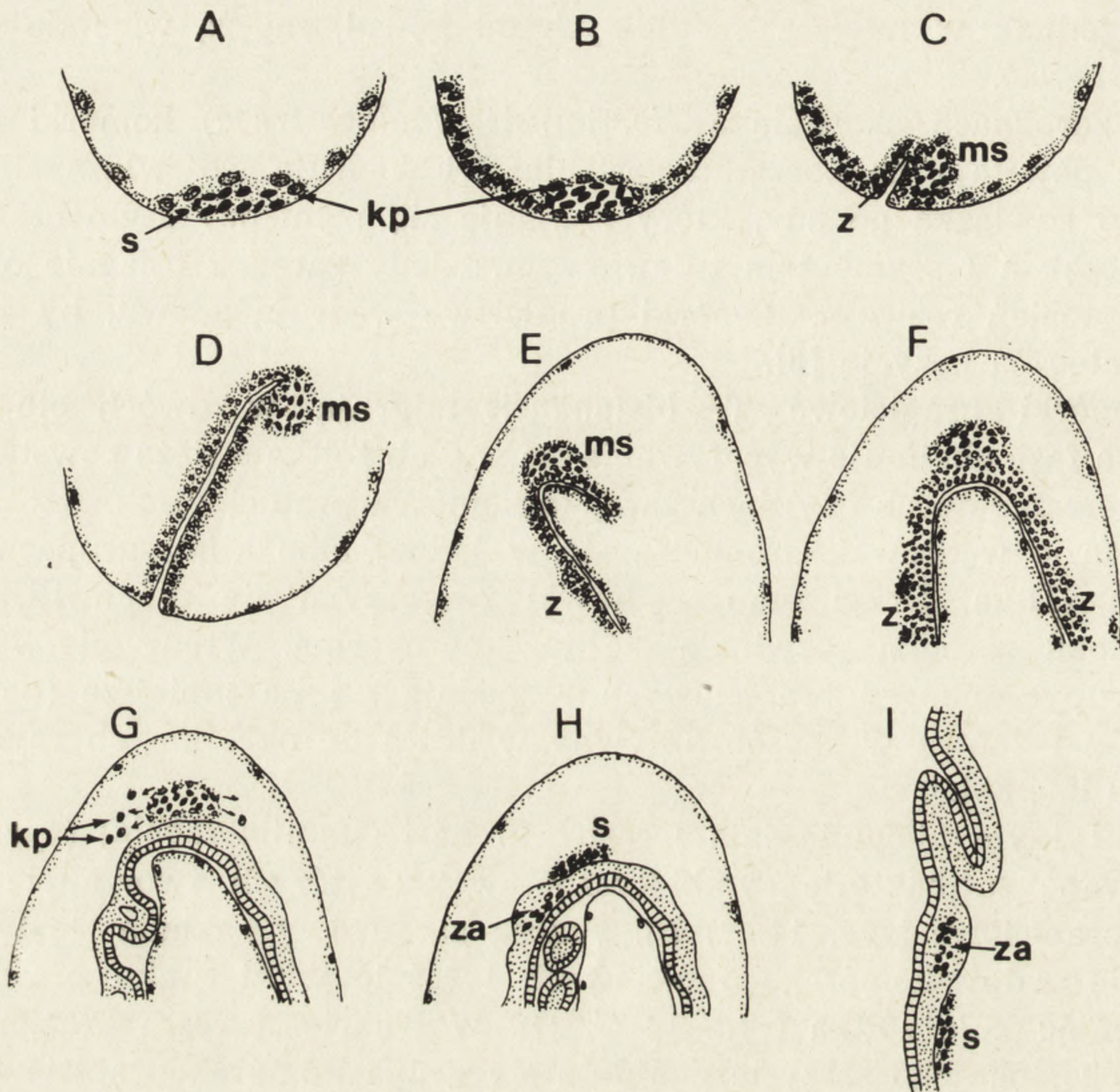
W zarodkach skorupiaka *Hemimysis* (*Malacostraca*) komórki prapłciowe powstają na początku gastrulacji i wędrują „o własnych siłach” do zawiązka gonady, który znajduje się pomiędzy segmentem II pary szczęk a I segmentem tułowiowym. Kiedy zarodek osiągnie odpowiedni stopień rozwoju, komórki prapłciowe wędrują znowu, by zająć swą ostateczną pozycję [8].

Komórki prapłciowe *T. bielanensis* migrują w dwóch etapach. Pierwsza faza obejmuje wycofywanie się w głąb żółtka świeżo powstałych w powierzchniowych częściach zarodka komórek prapłciowych. Komórki, po tej fazie wędrówki, gromadzą się w jednej albo kilku grupach we wnętrzu żółtka. Drugi etap wędrówki rozpoczyna się w chwili, gdy w odwłoku zarodka rozwinęła się już mezoderma. Wtedy pierwotnie duże grupy komórek prapłciowych rozpadają się na mniejsze (po 2-6 komórek) i znowu w sposób aktywny wędrują do określonych rejonów odwłoka [50, 63].

Na tylnym biegunie jaja *Icerya purchasi* (*Hemimetabola*) (ryc. 14) zgrupowane są bakterie symbiotyczne, wokół których tworzą się komórki prapłciowe (ryc. 14 A, B). Prążek zarodkowy zakłada się w sąsiedztwie grupy komórek prapłciowych i rośnie w kierunku przednim rozpychając kule żółtka (ryc. 14 C, D). W trakcie wzrostu prążka zarodkowego, na jego szczycie znajduje się grupa komórek prapłciowych, biernie przenoszona przez rosnący prążek zarodkowy. Kiedy prążek zarodkowy zaczyna się fałdować (ryc. 14 E, F), komórki prapłciowe odrywają się od niego i wchodzą aktywnie pomiędzy komórki rozwijającej się mezodermy odwłoka (ryc. 14 G, H, I) [86]. Podobnie zachowują się komórki prapłciowe wielu innych *Hemimetabola* [3, 8].

Komórki prapłciowe większości *Holometabola* powstają poza obrębem blastodermy (komórki biegunowe). Wraz z rozwojem zarodka, do wpuklającego się proctodaeum, wciskają się komórki prapłciowe i wraz z jego wzrostem są transportowane w kierunku przednim. Kiedy się kończy wzrost proctodaeum, komórki prapłciowe rozdzielają się na dwie grupy i wędrują, tym razem aktywnie, przeciskając się pomiędzy komórkami jelita tylnego zasiedlają odpowiednie obszary mezodermy [4, 48, 103]. Wśród owadów uskrzydłych są i takie gatunki, jak *Haplothrips verbasci* [38] albo *Liposcelis divergens* [3], gdzie komórki prapłciowe są całkowicie biernie transportowane do zawiązków gonad przez wydłużający się prążek zarodkowy (ryc. 15).

Z tego krótkiego omówienia sposobów wędrówki komórek prapłciowych u stawonogów widzimy, że u skorupiaków i *Collembola* komórki prapłciowe poruszają się ruchem aktywnym, a ruchy bierne mają

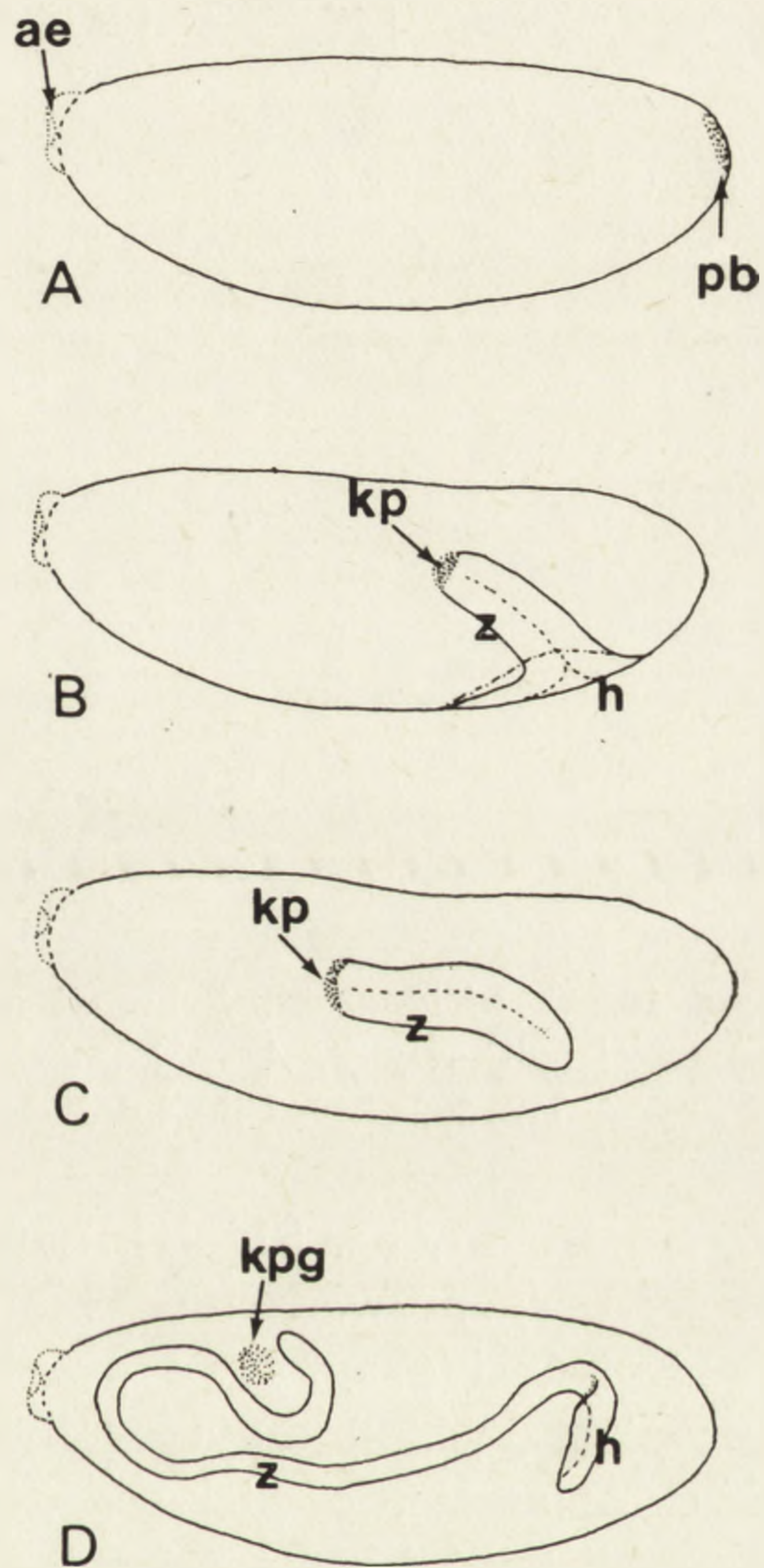


Ryc. 14. Schemat pokazujący drogę komórek prapłciowych. *Icerya purchasi* z bieguna tylnego do związków gonad. s — zgrupowanie symbiontycznych bakterii, wokół których tworzą się komórki prapłciowe (kp) (A i B). Komórki prapłciowe z symbiontami tworzą zespół (ms), który jest transportowany do wnętrza jaja przez wydłużający się prążek zarodkowy (z) (C, D, E i F)

mniejsze znaczenie. Natomiast u owadów uskrzydłonych ruch ten jest albo całkowicie bierny, albo składa się z dwu faz. Pierwsza obejmuje bierny transport komórek prapłciowych wraz z przemieszczającymi się w ruchach morfogenetycznych tkankami organizującego się zarodka [88], druga zaś jest ruchem aktywnym.

Po raz pierwszy ruch komórek prapłciowych dokładnie, bo za pomocą mikroskopu elektronowego, zbadano u *T. bielanensis* [63]. Przebiega on w sposób następujący. W wędrującej grupie komórek prapłciowych występuje komórka prowadząca, często posiadająca cienką wypustkę wciśniętą pomiędzy kule żółtka sąsiednich komórek żółtkowych (ryc. 16) Filopodium takie jest początkowo wypełnione jedynie mikrofilamentami (ryc. 16A), ale wkrótce się rozszerza i wypełnia cytoplazmą z rybosomami (ryc. 16B). Następnie do rozszerzającej się wypustki wcho-

dzą cysterny siateczki śródplazmatycznej, mitochondria i pozostałe organelle, a na końcu wchodzi jądro komórkowe. Jednocześnie cytoplazma komórki prowadzącej wycofuje się z dotychczas zajmowanej pozycji (ryc. 16C). W zarodkach *T. bielanensis* stosunkowo rzadko spotyka się

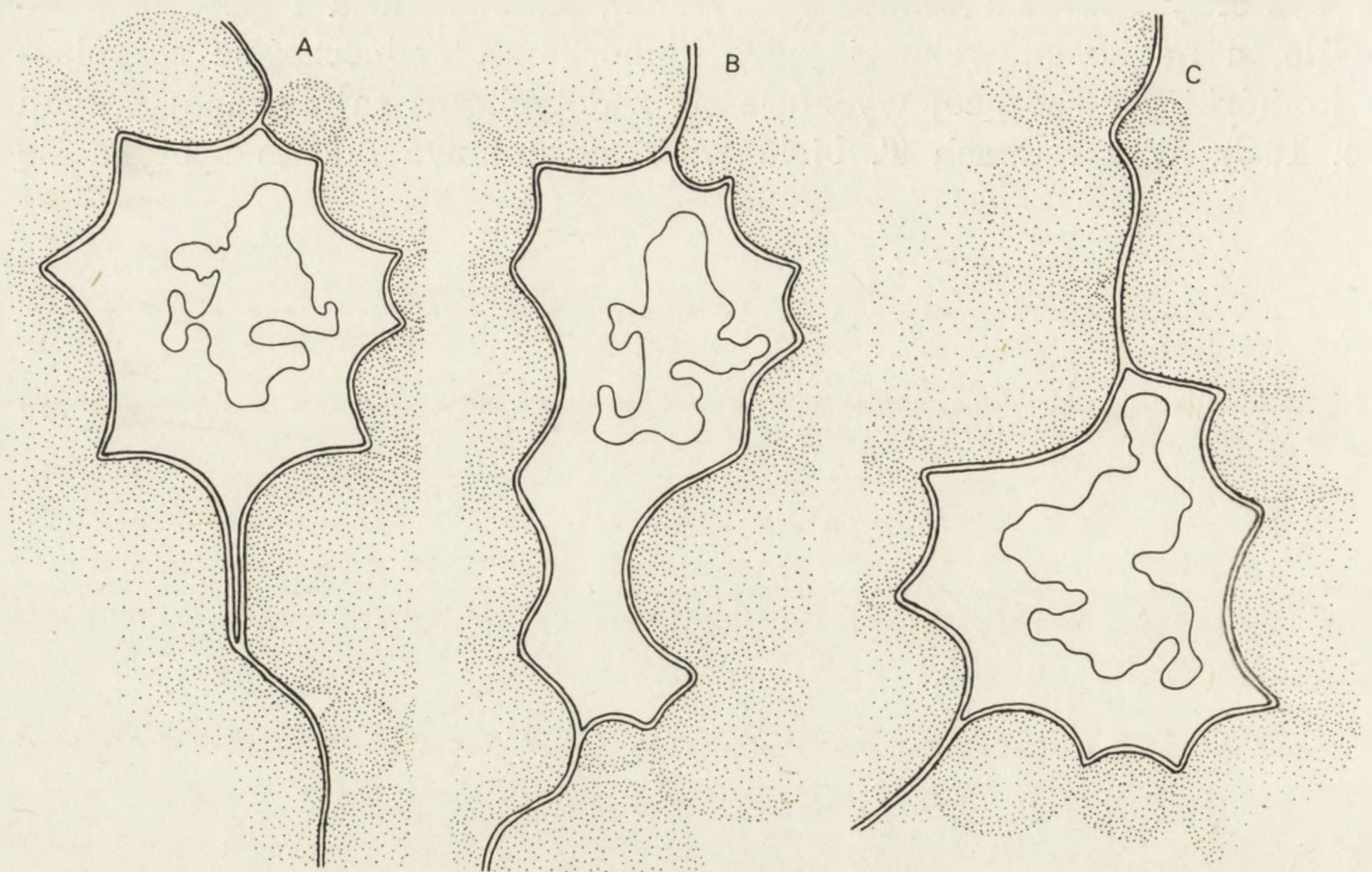


Ryc. 15. Schemat pokazujący drogę komórek prapłciowych *Haplothrips verba-sci* transportowanych całkowicie biernie z miejsca ich powstawania w obrębie plazmy biegunowej (pb) do zawiązków gonad (kpg); ae — aeropyle, kp — komórki prapłciowe, z — prążek zarodkowy, h — część głowowa zarodka [38]

na skrawkach wypustki wędrujących komórek prapłciowych, nawet gdy skrawa się materiał w płaszczyźnie wędrowki. Świadczy to o tym, że wędrują one etapami. To znaczy, że po wysunięciu wypustki i rozepchaniu komórek żółtkowych, wciągana jest w to miejsce cytoplazma i dopiero po pewnym okresie spoczynku wysuwana jest następna wypustka. Nie można więc mówić, że u *T. bielanensis* komórki prapłciowe wędrują ruchem ameboidalnym, gdyż jest to ruch podobny do ruchu robaka płaskiego raczej niż ameby.

4. TWORZENIE SIĘ GONAD

Komórki prapłciowe kręgowców, wchodzące do zawiązków gonad, były dosyć często badane za pomocą mikroskopu elektronowego [12,

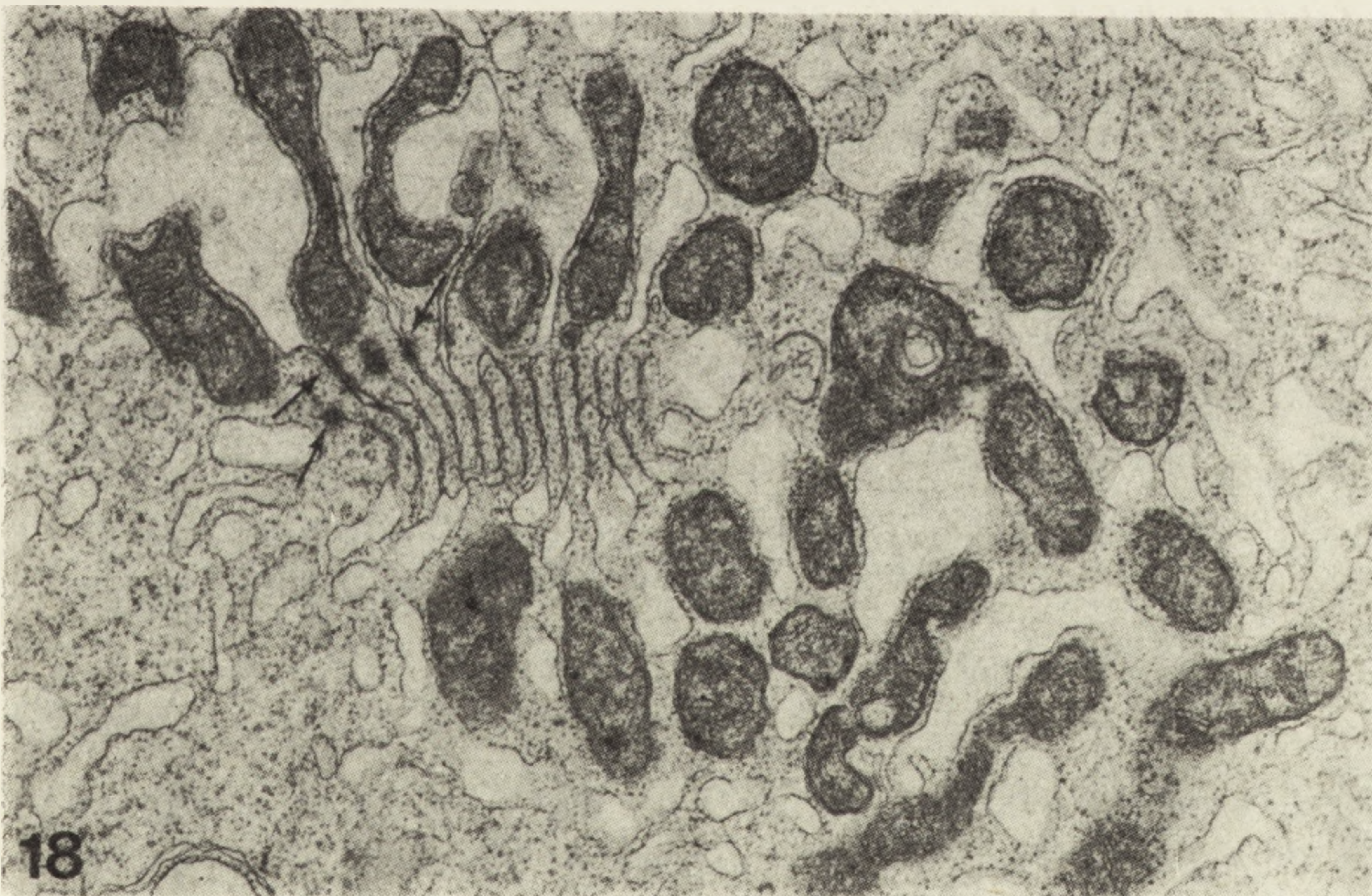
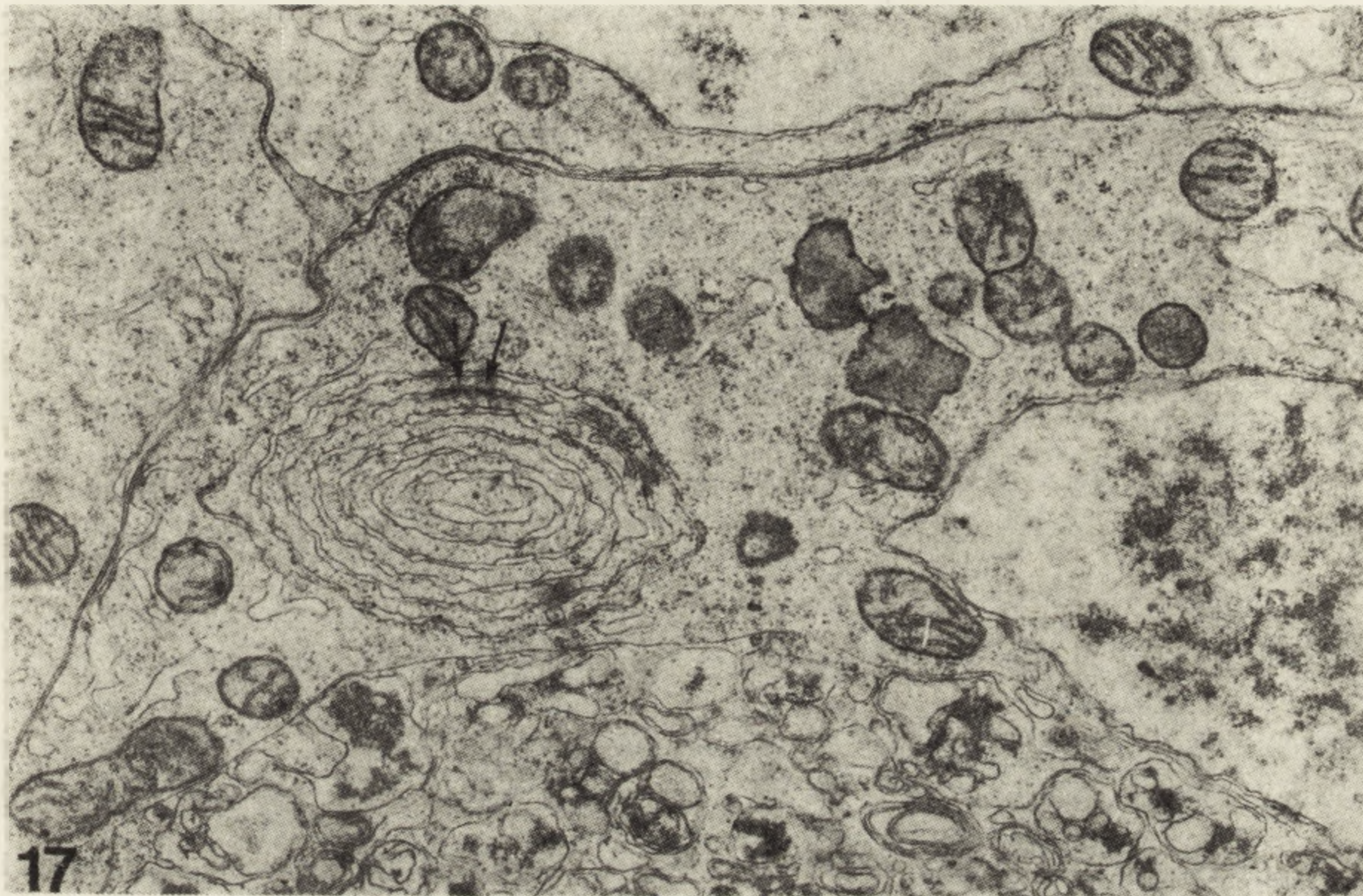


Ryc. 16. *T. bielanensis*. Schemat wędrówki komórek prapłciowych pomiędzy komórkami żółtkowymi, A — komórka wysuwa filopodium, B — filopodium się rozszerza, C — cała komórka znajduje się na nowym miejscu [63]

13, 23, 24, 47, 53, 81, 94], natomiast u bezkręgowców prace takie były do tej pory prowadzone tylko sporadycznie [11, 59, 60, 63, 64, 76].

Komórki prapłciowe owadów wchodzące pomiędzy komórki mezodermalne (ryc. 9) mają ogólny wygląd komórek mało zróżnicowanych. W cytoplazmie, o niezbyt wielkiej liczbie rybosomów, rozmieszczone są mniej więcej równomiernie także niezbyt liczne organelle. Sporadycznie występują pojedyncze, krótkie cysterny, lub pęcherzyki siateczki śródplazmatycznej, drobne mitochondria, pojedyncze diktiosomy. Natomiast jądro, w okresie zakładania gonad, wygląda różnie u różnych gatunków. U takich gatunków jak *Melasoma saliceti* (ryc. 3), *Bombyx mori* [76] czy *Thermobia domestica* [59] jądro jest kuliste, u innych, jak *T. bielanensis* [64], jest niezwykle bogato porozgałęziane.

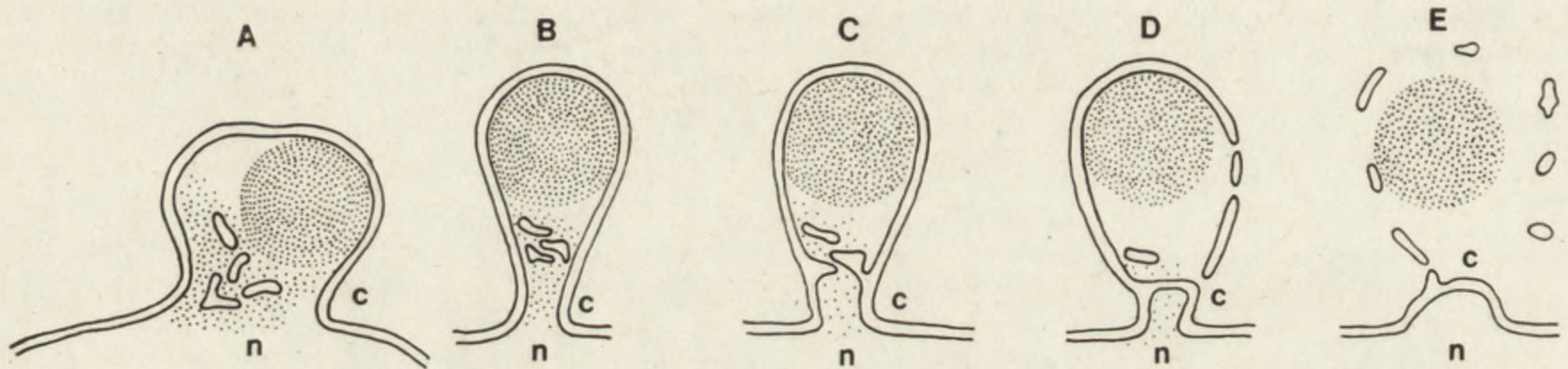
Jak już zostało powiedziane, w komórkach prapłciowych, w okresie powstawania gonad występuje niewiele typowych organelli komórkowych. Jednak zwraca uwagę fakt, że czasami występują one w niezwykle powiązaniach. U *T. bielanensis* spotykamy na przykład stopy błon pierścieniowanych (ryc. 12), zwoje siateczki śródplazmatycznej w towarzysztwie elektronowo gęstych pęcherzyków (ryc. 10), dalej, stopy siateczki śródplazmatycznej, rozdzielające warstwy mitochondriów (ryc. 18), zwo-



Ryc. 17. *T. bielansis* w okresie powstawania gonad. Zwój cystern siateczki śródplazmatycznej zaopatrzonych tu i ówdzie w kompleksy porowe (strzałki) podobne do por otoczki jądrowej. Pow. $\times 18\ 000$

Ryc. 18. *T. bielansis* w okresie zakładania gonad. Elektronogram pokazuje ściśle powiązanie pomiędzy mitochondriami a cysternami siateczki śródplazmatycznej, które zaopatrzone są w sporadycznie rozmieszczone kompleksy porowe (strzałki). Pow. $\times 12\ 500$

je siateczki śródplazmatycznej z rozmieszczonymi sporadycznie pojedynczymi porami, podobnymi do por w otoczce jądrowej (fyc. 17), rury, utworzone przez cysterny siateczki wypełnione mitochondriami (ryc. 13), diktiosomy, otoczone ściśle mitochondriami (ryc. 11) itp. Znaczenie tych nietypowych powiązań nie jest znane [63], chociaż nasuwa się wrażenie, że w komórkach prapłciowych tego okresu toczą się jakieś niezwykle kosztowne energetycznie procesy.



Ryc. 19. Schemat ilustrujący kolejne stadia wydostawania się ciała jąderkopodobnego z jądra (n) do cytoplazmy (c) w komórkach prapłciowych *T. bielansensis* w okresie zakładania gonad [64]

U *T. bielansensis* bardzo bogato ukształtowane jądro komórkowe i liczne kompleksy różnych organelli z mitochondriami świadczą o wysokim stopniu aktywności komórek gonialnych po utworzeniu gonad. Widocznym dowodem na istnienie podwyższonej aktywności jąder u tego gatunku jest powstawanie w jądrach i wydalanie z nich do cytoplazmy ciał jąderkopodobnych (ryc. 19) [64].

Ciała jąderkopodobne zostały znalezione w prewitelogenicznych oocytach, w oogoniach i spermatogoniach, w niektórych bardzo aktywnych komórkach somatycznych, a także w przypadkach zaburzonej nukleogenezy (przeгляд w: [64]). W nielicznych przypadkach ciała jąderkopodobne, a czasami i jąderka właściwe, wydostają się do cytoplazmy w całości. Wydaje się, że zjawisko to zachodzi w przypadkach najwyższej aktywności jąder, kiedy produkty transkrypcji są masowo dostarczane do cytoplazmy, a więc w najwcześniejszych stadiach rozwojowych ssaków [31, 90, 96] oraz w prewitelogenicznych oocytach *Thyone briareus* [54], *Physa acuta* [101] i *Ciona intestinalis* [75]. Wiadomo, że komórki te charakteryzuje ogromna aktywność syntetyczna jąder i cytoplazmy. Fakt, że zjawisko wyrzucania ciał jąderkopodobnych in toto zachodzi w komórkach prapłciowych *T. bielansensis* w okresie tworzenia gonad, świadczy także o niezwykle wysokiej aktywności ich jąder w tym okresie.

5. „NUAGE”

Młode komórki rozrodcze w gonadach badane były dosyć intensywnie u bardzo wielu grup zwierząt [19]. Zwłaszcza oocyty i spermatoocyty, jako komórki, od których rozpoczyna się proces gametogenezy, badane były szczególnie dokładnie. Spośród wielu cech, w ultrastrukturze tych komórek, na które badacze zwrócili uwagę, jedną z najciekawszych jest obecność skupień elektronowo gęstego materiału nie otoczonego błoną, który przez André i Ruillera [9], w oocytach *Taegeneria domestica*, został nazwany „nuage” (chmura). Nazwa ta, która dobrze oddaje wygląd tych struktur, ale nie sugeruje niczego co do ich funkcji, przyjęła się dosyć powszechnie i określa się nią wszelkie podobnie wyglądające skupienia u różnych zwierząt [19]. Na szczególną uwagę zasługuje tu fakt, że u wszystkich gatunków bezkręgowców, jak i kręgowców, materiał tworzący podobne skupienia ma podobną strukturę. Należy tu przypomnieć, że ziarna biegunowe, ciała barwliwe, ektozomy i inne elementy opisywane w jajach i zarodkach różnych zwierząt, a uważane za determinanty płciowe mają także strukturę podobną do nuage.

U kilku gatunków, u których przebadano komórki linii płciowej w ciągu całego cyklu życiowego [2, 18, 22, 51, 67, 68, 70, 80] opisywano ciągłą obecność „charakterystycznych dla komórek linii płciowej skupień elektronowo gęstego nie otoczonego błoną, granulofibrylarnego materiału”. W związku z tym bardzo wielu badaczy nabrało przekonania, że substancja ta, która jest charakterystyczna dla komórek linii płciowej i nie występuje w komórkach somatycznych, pełni funkcję determinacji tych komórek, utrzymywania ich odrębności i kierowania procesami gametogenezy [10, 79]. Próbowano przy tym rozstrzygnąć, czym pod względem chemicznym jest nuage. Okazało się, że w strukturach tych jedni badacze znajdowali RNA i białko zasadowe, a inni samo białko [19]. Sprawa okazała się jeszcze bardziej kontrowersyjna, gdy skupienia nuage odkryto w komórkach somatycznych. Ciała te zostały znalezione zarówno w komórkach blastemy regenerujących wypławków [16, 40, 95], w komórkach nerwowych ssaków [39, 57, 58, 89], jak i w tkankach wczesnych zarodków ssaków [97, 98]. Wiadomo więc teraz na pewno, że „skupienia elektronowo gęstego, nieobłonionego materiału” nie są strukturami spotykanymi wyłącznie w komórkach linii płciowej. Wiadomo także, że nie zawsze jest w nich RNA.

Zauważono także, że nuage jest wprawdzie podobny u wszystkich zwierząt i we wszystkich stadiach, ale nie identyczny i często występuje w różnych postaciach morfologicznych. Na przykład, w jednym ze stadiów rozwojowych spermatogenezy szczura wykryto aż sześć różnych

postaci nuage [87]. W różnych stadiach embriogenezy *D. melanogaster* [68], czy *T. bielanensis* [62, 64], skupienia nuage mają także nieco inną postać. Ponadto, w nuage tego ostatniego gatunku, kilka razy w trakcie rozwoju zarodkowego pojawia się RNA i zanika, a pod koniec rozwoju w każdej komórce prapłciowej łączą się ze sobą dwie postacie nuage, z których jedna zawiera RNA, a druga nie [64].

Nasuwa się więc oczywisty wniosek, że w różnych stadiach rozwojowych tego samego gatunku, a nawet w obrębie jednej komórki w danym stadium, „elektronowo gęste skupienia materiału ziarnisto-włóknistego nie otoczone błoną” są czymś innym i pełnią różną funkcję. A jeśli tak, to z pewnością czym innym są skupienia nuage w komórkach układu nerwowego szczura, a czym innym w zapłodnionym jajku *Drosophila*, a jeszcze czymś innym w somatycznych komórkach wypławków, czy w tkankach zarodków szczura. Nuage posiadające RNA może zawierać rybosomalny RNA [5, 54-56], albo m-RNA [34-36], natomiast nuage białkowe, pozbawione RNA, w takich zróżnicowanych komórkach, jak komórki układu nerwowego ssaków [39, 57, 58, 89], czy pewne rodzaje nuage w spermatogenezie różnych zwierząt [17, 21, 52] mogą być, jak to sugerują doświadczenia Kalta i wsp. [52], magazynami tubuliny. W innych przypadkach, inny rodzaj białkowego nuage może pełnić rolę w biogenezie mitochondriów [14, 20].

Dalsze badania pozwolą, z pewnością określić, przy jakich stanach komórki pojawia się w cytoplazmie ten czy inny rodzaj nuage i jaką, w tej sytuacji pełni on rolę.

6. PODSUMOWANIE

Nie ma obecnie wątpliwości, że komórki prapłciowe owadów stanowią jedyne źródło gamet. Trudno także negować rolę, jaką u wszystkich gatunków odgrywają ziarna biegunowe (oosom) w determinacji tych komórek we wczesnych stadiach rozwojowych. Jednakże widoczne w mikroskopie elektronowym skupienia nieobłonionego materiału tworzące oosom są, jak się wydaje, jedynie siedzibą substancji będących właściwymi determinantami. Dalsze badania są więc konieczne w celu określenia natury tych substancji i sposobu ich działania.

Jak to już podkreśliłem, uważam, że mechanizmy działania determinantów płciowych są uniwersalne. Nie uważam jednak, by wszystkie morfologiczne postaci nuage spotykane w różnicujących się gametach i niektórych komórkach somatycznych były kontynuacją ziarn biegunowych (czy analogicznych struktur będących siedliskiem determinantów płciowych). Z pewnością, są pewne postaci nuage, które powsta-

ją przez transformację materiału ziarn biegunowych, są ich kontynuacją przez pewien okres życia danego pokolenia i pełnią w komórkach linii płciowej jakieś ważne, a nie znane funkcje. Jednakże większość postaci nuage spotykanych w oocytach i spermatocytach, a zwłaszcza w komórkach somatycznych, nie pochodzi, z pewnością, od ziarn biegunowych. Te postaci nuage mają inne pochodzenie i, najprawdopodobniej, pełnią też zupełnie inne funkcje. Określenie tych funkcji, bez wątplenia, przybliży nas do rozwiązania problemu różnicowania komórkowego.

Autor składa serdeczne podziękowanie pani mgr Stanisławie Kuzyk za wykonanie rysunków do tego artykułu.

LITERATURA

- [1] ACHELING M., KRAUSE G., Experimente am Ungefurchten Ei von *Pimpla turionellae* (Hymenoptera) zur Funktionsanalyse des Oosombereichs, Wilhelm Roux's Arch., **167**: 164—182, 1971.
- [2] AIMUKHTAR K. A. K., WEBB A. C., An ultrastructural study of primordial germ cells, oogonia and early oocytes in *Xenopus laevis*, J. Embr. exp. Morph., **26**: 195—217, 1971.
- [3] ANDERSON D. T., The embryology of *Dacus tryoni* (Diptera) the Queensland fruit fly, J. Embr. exp. Morph., **10**: 248—292, 1962a.
- [4] ANDERSON D. T., The epigenetics of the larva in *Diptera*, Acta Zool., **43**: 221—228, 1962b.
- [5] ANDERSON E., Oocyte differentiation and vitellogenesis in the roach *Periplaneta americana*, J. Cell Biol., **20**: 131—155, 1964.
- [6] ANDERSON D.T., Development of Hemimetabolous insects, [w] Developmental Systems Insects, red. S. J. Counce, C. H. Waddington, Pergamon Press, New York 1972a, s. 95—164.
- [7] ANDERSON D. T., Development of Holometabolous insects, [w] Developmental Systems Insects, red. S. J. Counce, C. H. Waddington, Pergamon Press, New York, 1972b, s. 165—241.
- [8] ANDERSON D. T., Embryology and Phylogeny in *Annelids and Arthropods*. Pergamon Press, Oxford, New York, 1973.
- [9] ANDRÉ J., ROUILLER C., L'ultrastructure des la membrane nucléaire des ovocytes de l'araignée (*Tegenaria domestica* Clark), [w] Proc. European Region. Conf. Electron Mic., Stockholm 1956, Academic Press, New York 1957, s. 162—164.
- [10] BEAMS H. W., KESSEL R. G., The problem of germ cell determinants, Int. Rev. Cytol., **39**: 413—479, 1974.
- [11] BRISSON P., Observation ultrastructurale des cellules germinales chez l'embryon d'*Acroloxus lacustris* (Gasteropode Pulmoné), C. R. Acad. Sci. Paris, **277**: 2205—2208, 1973.
- [12] BRUSLÉ S., Etude ultrastructurale des cellules germinales primordiales et leur différenciation chez *Mugil cephalus*, Bull. Assoc. Anatomistes, **64**: 207—216, 1980.
- [13] CLARK J. M., EDDY E. M., Fine structural observations on the origin

- and associations of primordial germ cells of the mouse, *Developm. Biol.*, **47**: 136—155, 1975.
- [14] CLEROT J. C., Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons téléostéens *Cyprinidés*. I. Étude ultrastructurale, *J. Ultrastruct. Res.*, **54**: 461—475, 1976.
- [15] COUNCE S. J., Developmental morphology of polar granules in *Drosophila* including observations on pole cell behaviour and distribution during embryogenesis, *J. Morphol.*, **112**: 129—145, 1963.
- [16] COWARD S. J., Chromatoid bodies in somatic cells of the planarian: observations on their behaviour during mitosis, *Anat. Rec.*, **180**: 533—546, 1974.
- [17] EDDY E. M., Cytochemical observations on the chromatoid body of the male germ cells, *Biol. Reprod.*, **2**: 114—128, 1970.
- [18] EDDY E. M., Fine structural observation on the form and distribution of nuage in germ cells of the rat, *Anat. Rec.*, **178**: 731—738, 1974.
- [19] EDDY E. M., Germ plasm and the differentiation of the germ cell line, *Int. Rev. Cytol.*, **43**: 229—280, 1975.
- [20] EDDY E. M., ITO S., Fine structural and radioautographic observations on dense perinuclear cytoplasmic material in tadpole oocytes, *J. Cell Biol.*, **49**: 90—108, 1971.
- [21] FAWCETT D. W., EDDY E. M., PHILLIPS D. M., Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis, *Biol. Reprod.*, **2**: 129—153, 1970.
- [22] FRANCHI L. L., MANDL A., The ultrastructure of germ cells in foetal and neonatal male rats, *J. Embr. exp. Morph.*, **12**: 289—308, 1964.
- [23] FUJIMOTO T., MIYAYAMA Y., FUYUTA M., The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells, *Anat. Rec.*, **188**: 315—330, 1977.
- [24] FUJIMOTO T., UKESHIMA A., FUYUTA M., The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo, *Anat. Rec.*, **185**: 139—154, 1976.
- [25] GANCARZEWICZ B., RNA we wczesnych stadiach rozwoju zarodkowego *Tetradontophora bielensis*. Analiza histochemiczna, *Zesz. Nauk. UJ, Zool.*, **393**: 85—94, 1975.
- [26] GEIGY R., Action de l'ultraviolet sur le pôle germinale dans l'oeuf de *Drosophila melanogaster*, *Rev. Suisse Zool.*, **38**: 187—288, 1931.
- [27] GEYER-DUSZYŃSKA I., Experimental research on chromosome elimination in *Cecidomyidae* (Diptera), *J. exp. Zool.*, **141**: 391—488, 1959.
- [28] GIPOULOUX J. D., „Cytoplasme germinale” et détermination germinale chez les amphibiens anoures, *Ann. Biol.*, **14**: 475—487, 1975.
- [29] GRAZIOSI G., MARCARI R., Differential responses to ultraviolet irradiation of the polar cytoplasm of *Drosophila* eggs: II. Response to dose, *Wilhelm Roux's Arch.*, **179**: 291—300, 1976.
- [30] GRAZIOSI G., MICALI F., Differential responses to ultraviolet irradiation of the polar cytoplasm of *Drosophila* eggs, *Wilhelm Roux's Arch.*, **175**: 1—11, 1974.
- [31] HADEK R., SWIFT H., Nuclear extrusion and intracisternal inclusions in the rabbit blastocyst, *J. Cell Biol.*, **13**: 445—451, 1962.
- [32] HAGET A., Caractéristiques ultrastructurales du pôle postérieur et de l'oosome, dans l'oeuf jeune du Coléoptère *Leptinotarsa decemlineata*, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **275**: 2737—2740, 1972.

- [33] HALKKA L., Accumulation of gene products in the previtellogenic oocytes of the dragonfly *Cordulia aenea*. An ultrastructural and cytochemical study, Academic Dissertation, Dept. Genetics, University of Helsinki, 1980.
- [34] HALKKA L., HALKKA O., Accumulation of gene products in the oocytes of the dragonfly *Cordulia aenea*. I. The nematosomes, *J. Cell Sci.*, **19**: 103—115, 1975.
- [35] HALKKA L., HALKKA O., Accumulation of gene products in the oocytes of the dragonfly *Cordulia aenea*. II. Induction of annulate lamellae within dense masses during diapause, *J. Cell Sci.*, **26**: 217—228, 1977.
- [36] HEGNER R. W., Effects of removing the germ cell determinants from the eggs of some chrysomelid beetles, *Biol. Bull.*, **16**: 19—26, 1908.
- [37] HEGNER R. W., Studies on germ cells. I. The history of germ cells in insects. II. The origin and significance of the keimbahn determinants in animals, *J. Morphol.*, **25**: 375—499, 1914.
- [38] HEMING B. S., Origin and fate of germ cells in male and female embryos of *Haplothrips verbasci* (Insecta, Thysanoptera), *J. Morphol.*, **160**: 323—344, 1979.
- [39] HINDELANG-GERTNER C., STOECKEL M., PORTE A., DELLMAN H., MADARÁSZ B., Nematosomes or nucleolus-like bodies in hypothalamic neurons, the subfornical organ and adenohypophysial cells of the rat, *Cell Tissue Res.*, **155**: 211—219, 1974.
- [40] HORI I., An ultrastructural study of the chromatoid body in planarian regenerative cells, *J. Electron Mic.*, **31**: 63—72, 1982.
- [41] IJIRI K., EGAMI N., A mathematical model for germ cell determination process and effect of ultraviolet light on the process, *J. theor. Biol.* **58**: 15—32, 1976.
- [42] ILLMENSEE K., Nuclear and cytoplasmic transplantation in *Drosophila*, [w] *Insect Development*, red. P. A. Lawrence, Blakwell Sci. Publ., London 1976, 76—96.
- [43] ILLMENSEE K., *Drosophila* chimeras and the problem of determination, [w] *Genetic Mosaics and Cell Differentiation*, red. W. J. Gehring, Springer Verl., Berlin 1978, 51—69.
- [44] ILLMENSEE K., MAHOWALD A. P., The autonomous function of germ plasm in a somatic region of the *Drosophila* egg, *Exp. Cell Res.*, **97**: 127—140, 1976.
- [45] ILLMENSEE K., MAHOWALD A. P., LOOMIS M., The ontogeny of germ plasm during oogenesis in *Drosophila*, *Devl Biol.*, **49**: 40—65, 1976.
- [46] JAZDOWSKA-ZAGRODZIŃSKA B., Experimental studies on the role of polar granules in the segregation of pole cells in *Drosophila melanogaster*, *J. Embryol. exp. Morph.*, **16**: 391—399, 1966.
- [47] JEON K. W., KENNEDY J. R., The primordial germ cells in early mouse embryos: light and electron microscopic studies, *Developm. Biol.*, **31**: 275—284, 1973.
- [48] JURA C., Cytological and experimental observations on the origin and fate of pole cells in *Drosophila virilis* Sturt. I. Cytological analysis, *Acta Biol. Crac.*, **7**: 59—73, 1964a.
- [49] JURA C., Cytological and experimental observations on the origin and fate of pole cells in *Drosophila virilis* Sturt. II. Experimental analysis, *Acta Biol. Crac.*, **7**: 89—103, 1964b.
- [50] JURA C., Origin of germ cells and gonads formation in embryogenesis of

- Tetrodontophora bielanensis* (Waga) (Collembola), Acta Biol. Crac., 9: 97—103, 1967.
- [51] KALT M. R., Ultrastructural observations on the germ line of *Xenopus laevis*, Z. Zellforsch., 138: 41—62, 1973.
- [52] KALT M. R., PINNEY H., GRAVES K., Inhibitor induced alterations of chromatoid bodies in male germ line cells of *Xenopus laevis*, Cell Tissue Res., 161: 193—210, 1975.
- [53] KAMIMURA M., KOTANI M., YAMAGATA K., The migration of presumptive primordial germ cells through the endodermal cell mass in *Xenopus laevis*: A light and electron microscopic study, J. Embryol. exp. Morph., 59: 1—17, 1980.
- [54] KESSEL R. G., Some observations of the ultrastructure of the oocyte of *Thyone briareus* with special reference to the relationship of the Golgi complex and endoplasmic reticulum in the formation of yolk, J. Ultrastruct. Res., 16: 305—319, 1966.
- [55] KESSEL R. G., Differentiation of *Acmaea digitalis* oocytes with special reference to lipid-endoplasmic reticulum-annulate lamellae-polyribosome relationships, J. Morphol., 171: 225—243, 1982.
- [56] KESSEL R. G., BEAMS H., Intranucleolar membranes and nuclear cytoplasmic exchange in young cryfish oocytes, J. Cell Biol., 39: 735—741, 1968.
- [57] KISHI K., Two types of cytoplasmic nucleolus-like bodies. Observation of the serial sections of rat neurons, Arch. Histol. Jap., 35: 83—87, 1972a.
- [58] KISHI K., Fine structural and cytochemical observations on cytoplasmic nucleolus-like bodies in nerve cells of rat medulla oblongata, Z. Zellforsch., 132: 523—532, 1972b.
- [59] KLAG J., Differentiation of primordial germ cells in the embryonic development of *Thermobia domestica* (Thysanura): an ultrastructural study, J. Embr. exp. Morph., 38: 93—114, 1977a.
- [60] KLAG J., Light and electron microscopis study of embryonic development of gonads in *Thermobia domestica* (Thysanura) with special reference to intercellular contacts, Acta Biol. Crac., 20: 229—240, 1977b.
- [61] KLAG J., Germ line of *Tetrodontophora bielanensis* (Insecta, Collembola). Ultrastructural study on the origin of primordial germ cells, J. Embr. exp. Morph., 72: 183—195, 1982a.
- [62] KLAG J., Germ line of *Tetrodontophora bielanensis* (Insecta, Collembola). 2. Ultrastructural differentiation of primordial germ cells during early embryogenesis, Cytobios, 33: 173—182, 1928b.
- [63] KLAG J., Germ line of *Tetrodontophora bielanensis* (Insecta, Collembola). 3. Migration of primordial germ cells, Cytobios (w druku).
- [64] KLAG J., Germ line of *Tetrodontophora bielanensis* (Insecta, Collembola). 4. Nucleolus-like bodies extruded from the nucleus of primordial germ cells become a kind of „nuage”, Cytobios (w druku).
- [65] LUNDQUIST A., EMANUELSSON H., Polar granules and pole cells in the embryo of *Colliphora erythrocephala*: ultrastructure and (³H) leucine labelling J. Embr. exp. Morph., 57: 79—93, 1980.
- [66] MAHOWALD A. P., Fine structure of pole cells and polar granules in *Drosophila melanogaster*, J. exp. Zool., 151: 201—215, 1962.
- [67] MAHOWALD A. P., Polar granules of *Drosophila*. II. Ultrastructural changes during early embryogenesis, J. exp. Zool., 167: 237—262, 1968.

- [68] MAHOWALD A. P., Polar granules of *Drosophila*. III. The continuity of polar granules during the life cycle of *Drosophila*, *J. exp. Zool.*, **176**: 329—344, 1971a.
- [69] MAHOWALD A. P., Polar granules of *Drosophila*. IV. Loss of RNA from polar granules during early stages of embryogenesis, *J. exp. Zool.*, **176**: 345—352, 1971b.
- [70] MAHOWALD A. P., Origin and continuity of polar granules. [w] Origin and Continuity of Cell Organelles, red. J. Reinert, H. Ursprung, Springer Verlag, New York 1971c, s. 159—169.
- [71] MAHOWALD A. P., Ultrastructural changes in the germ plasm during the life cycle of *Miastor* (*Cecidomyidae*, *Diptera*), *Wilhelm Roux's Arch.*, **176**: 223—240, 1975.
- [72] MAHOWALD A. P., The germ plasm of *Drosophila*: an experimental system for the analysis of determination, *Amer. Zool.*, **17**: 551—563, 1977.
- [73] MAHOWALD A. P., ALLIS C. D., KARRER K., UNDERWOOD E., WARRING G., Germ plasm and pole cells of *Drosophila*, [w] Determinants of Spatial Organization, red. S. Subtelny, Academic Press, London, New York 1979, s. 127—146.
- [74] MAHOWALD A. P., ILLMENSEE K., TURNER F. R., Interspecific transplantation of polar plasm between *Drosophila* embryos, *J. Cell Biol.*, **70**: 358—373, 1976.
- [75] MANCUSO V., Ultrastructural aspects of the nucleus of *Ciona intestinalis* oocyte, *Acta Embryol. Exp.*, **1**: 93—106, 1972.
- [76] MIYA K., Ultrastructural changes of embryonic cells during organogenesis in the silkworm, *Bombyx mori*. I. The gonad, *J. Fac. Agric. Iwate Univ.*, **12**: 329—364, 1975.
- [77] NELSON O. E., The segregation of germ cells in the grasshopper *Melanoplus differentialis* (*Acrididae*, *Orthoptera*), *J. Morphol.*, **55**: 515—544, 1934.
- [78] NICKLAS R. B., An experimental and descriptive study of chromosome elimination in *Miastor* sp. (*Cecidomyidae*, *Diptera*), *Chromosoma*, **10**: 310—336, 1959.
- [79] NIEUWKOOP P. D., SUTASURYA L. A., Primordial Germ Cells of Vertebrates, Cambridge Univ. Press, London, New York 1979.
- [80] NIEUWKOOP P. D., SUTASURYA L. A., Primordial Germ Cells of Invertebrates, Cambridge Univ. Press, London, New York 1979.
- [81] PELLINIEMI L. J., Ultrastructure of gonadal ridge in male and female pig embryos, *Anat. Embryol.*, **147**: 19—34, 1975.
- [82] POULSON D. F., The pole cells of *Diptera*, their fate and significance, *proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **33**: 182—184, 1947.
- [83] POULSON D. F., Histogenesis, organogenesis and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster*, [w] *The Biology of Drosophila*, red. M. Demerec, Wiley, New York 1950, s. 168—274.
- [84] POULSON D. F., WATERHOUSE D. F., Experimental studies on pole cells and midgut differentiation in *Diptera*, *Aust. J. Biol. Sci.*, **13**: 541—567, 1960.
- [85] RICHARD-MERCIER N., Organogenèse d'ovaries et de testicules steriles après cautérisation des cellules polaires de l'embryon du *Doryphore* (*Leptinotarsa decemlineata* Say), *Wilhelm Roux's Arch.*, **183**: 171—176, 1977.
- [86] ROYER M. M., La formation des ébauches gonadiques dans l'embryon de l'insecte hermaphrodite *Icerya purchasi*, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **276**: 1605—1608, 1973.

- [87] RUSSEL L., FRANK B., Ultrastructural characterization of nuage in spermatocytes of the rat testis, *Anat. Rec.*, **190**: 79—98, 1978.
- [88] SANDER K., Morphogenetic movements in insect embryogenesis, [w] *Insect Development*, red. P. A. Lawrence, Blackwell Sci. Publ., London 1976, s. 35—52.
- [89] SANTOLAYA R. C., Nucleolus-like bodies in the neuronal cytoplasm of the mouse arcuate nucleus, *Z. Zellforsch.*, **146**: 319—328, 1973.
- [90] SCHUCHNER E. B., Ultrastructural changes of the nucleoli during early development of fertilized rat eggs, *Biol. Reprod.*, **3**: 265—274, 1970.
- [91] SCHWALM F. E., Autonomous structural changes in polar granules of unfertilized eggs of *Coelopa frigida* (Diptera), *Wilhelm Roux's Archiv.*, **175**: 129—133, 1974.
- [92] SCHWALM F. E., SIMPSON R., BENDER H. A., Early development of the Kelp fly *Coelopa frigida* (Diptera). Ultrastructural changes within the polar granules during pole cell formation, *Wilhelm Roux's Arch.*, **166**: 205—218, 1971.
- [93] SMITH L. D., WILLIAMS M. A., Germinal plasm and determination of the primordial germ cells, [w] *The Developmental Biology of Reproduction*, red. C. L. Market, J. Papaconstantinou, Academic Press, New York 1975, s. 3—24.
- [94] SPIEGELMAN M., BENNETT D., A light and electron microscopic study of primordial germ cells in the early mouse embryo, *J. Embryol. exp. Morph.*, **30**: 97—118, 1973.
- [95] SPIEGELMAN D. F., DUDLEY P. L., Morphological stages of regeneration in the planarian *Dugesia tigrina*: a light and electron microscopic study, *J. Morphol.*, **139**: 155—184, 1973.
- [96] SZOLOSÍ D., Extrusion of nucleoli from pronuclei of the rat, *J. Cell Biol.*, **25**: 545—562, 1965.
- [97] TAKEUCHI I. K., Nucleolus-like bodies in the embryonic ectodermal and mesodermal cells of postimplantation rat embryos, *J. Electron Microsc.*, **29**: 186—189, 1980.
- [98] TAKEUCHI I. K., Nucleolus-like bodies in rat egg cylinders; their presence in the embryonic ectodermal cells and absence in the extraembryonic ectodermal cells, *Zool. Magazine*, **90**: 374—377, 1981.
- [99] TAMARELLE M., Contribution à l'embryologie des Collemboles Arthropléones. Thèse à l'Université de Bordeaux I, N° 80, 1972.
- [100] TAMARELLE M., Recherches ultrastructurales sur la ségrégation et le développement de la lignée germinale chez les embryons de quatre collembolles (*Insecta, Apterygota*), *Int. J. Insect. Morphol. Embryol.*, **8**: 95—111, 1979.
- [101] TERAKADO K., Extrusion of intact nucleolus in oocytes of *Physa acuta*, *J. Electron Microsc.*, **24**: 295—297, 1975.
- [102] ULLMANN S. L., Epsilon granules in *Drosophila* pole cells and oocytes, *J. Embryol. exp. Morph.*, **13**: 73—81, 1965.
- [103] UNDERWOOD E. M., CAULTON J. H., ALLIS C. D., MAHOWALD A. P., Developmental fate of pole cells in *Drosophila melanogaster*. *Developm. Biol.*, **77**: 303—314, 1980.
- [104] WARING G. L., ALLIS C. D., MAHOWALD A. P., Isolation of polar granules and the identification of polar granule specific protein, *Developm. Biol.*, **66**: 197—206, 1978.
- [105] WARN R., Restoration of fertility in UV irradiated *Drosophila* embryos by injection of posterior pole plasm, *J. Embr. exp. Morph.*, **33**: 1003—1011, 1975.

- [106] WOLF R., Kinematik und Feinstruktur plasmatischer Faktorenbereiche des Eies von *Wachtliella persicariae* L. (Diptera). II. Das Verhalten ooplasmatischer Teilsysteme nach Zentrifugierung in 4-Kern-Stadium, Wilhelm Roux's Arch., **163**: 40—80, 1969.
- [107] ZAMBONI L., MERCHANT H., The fine morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal locations, Am. J. Anat., **137**: 299—336.

Otrzymano: 25 marca 1983.

Przyjęto: 6 maja 1983.

Adres autora: ul. Karasia 6, 30—060 Kraków.

1901 WROCLAW, POLSKA
1902 WROCLAW, POLSKA
1903 WROCLAW, POLSKA
1904 WROCLAW, POLSKA
1905 WROCLAW, POLSKA
1906 WROCLAW, POLSKA
1907 WROCLAW, POLSKA
1908 WROCLAW, POLSKA
1909 WROCLAW, POLSKA
1910 WROCLAW, POLSKA

HETEROCHROMATYNA. BUDOWA I FUNKCJE W OBREBIE GENOMU

HETEROCHROMATIN. STRUCTURE AND FUNCTION IN A GENOME

Andrzej JOACHIMIAK

Zakład Cytologii i Embriologii Roślin
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Streszczenie. W artykule przedstawiono klasyfikację skondensowanej w jądrach interfazowych zwierząt i roślin chromatyny oraz przedyskutowano właściwości poszczególnych jej typów: heterochromatyny, funkcjonalnie zespiralizowanej euchromatyny u zwierząt oraz konstytutywnie zespiralizowanej euchromatyny u roślin. Przedstawiono przegląd współczesnej literatury dotyczącej budowy i funkcji heterochromatyny w genomie oraz zmian w obrębie tej części jądrowego DNA towarzyszących ewolucyjnemu różnicowaniu się organizmów. Wszystkie te dane uzasadniają pogląd, iż heterochromatyna, obok innych niekodujących sekwencji DNA, pełni szereg ważnych regulacyjnych funkcji w obrębie genomu, a zmiany w obrębie tej klasy jądrowego DNA wpływają w istotny sposób na wiele ważnych funkcji organizmu oraz posiadają duże znaczenie w ewolucji.

Summary. This article introduces the classification of condensed chromatin in plant and animal interphase nuclei. It also discusses the features of its particular types, as: heterochromatin, functionally condensed euchromatin in animals and constitutively condensed euchromatin in plants. It gives the review of contemporary literature dealing with structure, function and evolutionary changes of heterochromatin in eukaryotic genome. All these data strongly justify the opinion that heterochromatin, apart from other non-coding DNA sequences, is the important structural and regulatory element within a genome, and the changes in amount and composition of this portion of nuclear DNA considerably influence many important functions of an organism and are the essential factor in the evolution of higher organisms.

WSTĘP

Terminu „heterochromatyna” użył po raz pierwszy Heitz [45] w celu określenia tej części chromatyny, która pozostaje skondensowana przez większą część cyklu komórkowego. Przeciwstawił ją euchromatynie, która ulega w interfazie daleko posuniętej dekondensacji.

Rozwój badań nad ultrastrukturą, funkcją i budową chemiczną chromatyny pociągnął za sobą próby stworzenia bardziej wielostronnej i precyzyjnej charakterystyki heterochromatyny. Doprowadziło to do wielu nieporozumień, ponieważ chromatyna skondensowana w jądrach interfazowych zwierząt i roślin okazała się niejednorodna, tj. zróżnicowana chemicznie, strukturalnie i funkcjonalnie.

Obecnie znamy trzy typy chromatyny zespiralizowanej w jądrach interfazowych. Pierwszy z nich to funkcjonalnie skondensowana chromatyna obserwowana u zwierząt. Jej występowanie i ilość uzależnione są w znacznym stopniu od rodzaju tkanki lub płci osobnika (tzw. „heterochromatyna fakultatywna”). Występowanie dwóch pozostałych uzależnione jest ściśle od struktury genomu i jest wysoce specyficzne gatunkowo. Są to tzw. „heterochromatyna konstytutywna” obserwowana zarówno u zwierząt, jak i roślin oraz konstytutywnie zespiralizowana

TABELA 1

Klasyfikacja chromatyny skondensowanej w jądrach interfazowych

HETEROCHROMATYNA	ZESPIRALIZOWANA	EUCHROMATYNA
„Heterochromatyna konstytutywna”	funkcjonalnie	konstytutywnie
	„Heterochromatyna fakultatywna”	
u roślin i zwierząt	występowanie u zwierząt ilość	u roślin
stała we wszystkich* tkankach danego osobnika; wykazuje dużą specyficzność gatunkową	wykazuje wahania w zależności od: płci osobnika lub rodzaju tkanki budowa	stała we wszystkich tkankach danego osobnika; wykazuje dużą specyficzność gatunkową
często odbiega procentowym udziałem par zasad od głównej frakcji DNA danego gatunku, nie zawiera kodujących genów	nie odbiega procentowym udziałem par zasad od głównej frakcji DNA danego gatunku, zawiera kodujące geny	nie odbiega procentowym udziałem par zasad od głównej frakcji DNA danego gatunku, nie zawiera kodujących genów
mała lub brak	aktywność transkrypcyjna mała lub brak	mała lub brak
silna	barwliwość metodą C-prążków słaba	słaba
kondensacja obserwowana w mikroskopie świetlnym		
kondensacja obserwowana w mikroskopie elektronowym		

* — w niektórych komórkach poliploidalnych jej % udział zmniejszony na skutek niedoreplikowania lub zwiększony na skutek dodatkowej replikacji

chromatyna bogatych w DNA gatunków roślin okrytozalążkowych (tab. 1).

Badania nad funkcjonalnie zespiralizowaną chromatyną zwierząt doprowadziły wielu badaczy do wniosku, iż o kondensacji i dekon-densacji chromatyny w jądrach interfazowych decydują wyłącznie czynniki natury regulacyjnej (regulacja zróżnicowanej ekspresji genów), a nie konstytucyjnej (struktura pewnych partii genomu) [29, 66]. Spiralizacja pewnych segmentów chromosomowych, całych chromosomów (np. jednego z chromosomów X u samic ssaków), a wyjątkowo nawet całych genomów ma bowiem duże znaczenie w regulacji zróżnicowanej ekspresji genów na poziomie tkanki, czy nawet całego osobnika u zwierząt [1, 29, 66]. W tkankach roślinnych z reguły ten typ chromatyny nie jest obserwowany [84, 87, 88], chociaż nie można wykluczyć jego występowania [59].

Istnienie pozostałych (tab. 1) typów skondensowanej w jądrach interfazowych chromatyny dowodzi, iż kondensacja w interfazie może być stałą cechą pewnych partii genomu. Do tej pory nie wyjaśniono, jaką rolę pełni ona w tych przypadkach, ale z całą pewnością nie polega ona na zróżnicowanym blokowaniu aktywności transkrypcyjnej części kodujących genów. Liczne obserwacje dowodzą, iż zarówno „heterochromatyna konstytutywna”, jak i konstytutywnie zespiralizowana euchromatyna roślin nie zawierają kodujących genów [84, 88, 95, 96], chociaż nie można wykluczyć możliwości istnienia wyjątków od tej reguły [88, 96, 115].

Chromosomy metafazowe zwierząt i roślin wykazują, oprócz regionów centromerów i przewężeń wtórnych, prawie jednolitą kondensację chromatyny na całej swej długości. Odmienne reagowanie niektórych ich segmentów na różne czynniki fizykochemiczne dowodzi zróżnicowania chromatyny *Eukaryota* pod względem budowy i podstawowych właściwości. Pierwszych obserwacji tego typu zróżnicowania dokonali w latach czterdziestych Darlington i La Cour [21, 22] oraz Geitler [33] traktując materiał przeznaczony do badań obniżoną temperaturą. W 1956 r. Yamasaki [124] obserwował różnicowe zabarwienie chromosomów storczyka *Cypripedium debile* po traktowaniu ich gorącymi kwasami. Obserwacje te potwierdził Takehisa [118] badając chromosomy *Vicia faba*. Pogłębieniem i kontynuacją wymienionych badań są dynamicznie rozwijające się w ciągu ostatnich lat badania chromosomów metodami prążkowymi. Umożliwiły one dość dokładną klasyfikację typów chromatyny występujących u *Eukaryota* i dostarczyły wielu danych na temat ich występowania i lokalizacji w obrębie genomu. Za początek prążkowych badań chromosomów uważa się obserwacje Casperssona i wsp. [17] nad fluorescencją chromosomów *Vicia faba*. Omówienie aktualnego stanu badań w tym zakresie, stosowanych metod oraz perspektyw ich rozwoju

dają artykuły przeglądowe [20, 44, 46, 48, 73, 115] oraz podręczniki [95].

Z czasem terminu „heterochromatyna” zaczęto powszechnie używać w odniesieniu do pozytywnie reagujących na niektóre metodyki różnicowego barwienia (przede wszystkim metodę prążków C) segmentów chromosomowych. Pozostałą chromatynę chromosomów określa się mianem euchromatyny. Heterochromatyna tak zdefiniowana odpowiada dość ściśle wcześniej opisaną heterochromatynie konstytutywną. Dlatego też terminy: heterochromatyna i heterochromatyna konstytutywna używane są przez wielu autorów zamiennie.

W niniejszej pracy termin „heterochromatyna” stosuję, zgodnie z sugestiami Nagla [88] i Olszewskiej [96], dla tej części chromatyny, która nie zawiera kodujących genów i wykazuje ściłą, wykrywalną najnowszymi metodami cytologicznymi lokalizację w obrębie genomu (metoda prążków C). W jądrach interfazowych obserwowana jest ona w postaci silnie skondensowanych obszarów (chromocentrow).

DNA HETEROCHROMATYNY

Uderzające różnice w zawartości DNA pomiędzy poszczególnymi gatunkami nie odpowiadają bardzo często różnicom w komplikacji ich budowy i funkcji. Liczne przykłady ilustrujące tę tezę znaleźć można w opracowaniach szczegółowych i podręcznikach [32, 66, 85, 88, 90, 95, 114, 117]. Mamy wszelkie dane po temu, aby sądzić, iż większość organizmów eukariotycznych dysponuje znaczną ilością DNA, którego funkcje nie zostały do tej pory wyjaśnione. Fakt ten próbują naświetlić dwie hipotezy. W myśl jednej z nich geny występują w postaci wielu kopii na genom, w myśl drugiej — niecały DNA jest nośnikiem informacji genetycznej, lecz znaczna jego część pełni inne funkcje, przypuszczalnie regulacyjne. Badania ostatnich lat wykazały, iż tylko nieliczne geny kodujące występują w formie zwielokrotnionej [81, 95]. Szacuje się, że u niektórych organizmów wyższych do 99% DNA nie bierze udziału w kodowaniu [90, 93]. Można obecnie przypuścić, że właśnie ta niekodująca frakcja DNA stanowi główny budulec heterochromatyny. Nie można jednak w całości jej z nią identyfikować, ponieważ wykazuje duże zróżnicowanie pod względem procentowego składu par zasad, stopnia repetytywności oraz właściwości fizykochemicznych.

Satelitarny DNA jest charakterystycznym składnikiem heterochromatyny wielu gatunków zwierząt i roślin [53, 82, 83, 85, 99] oraz człowieka [116, 121]. Ze względu na to, że wyizolowanie go z głównej masy DNA danego gatunku jest stosunkowo łatwe, jest on najlepiej poznany pod względem biochemicznym składnikiem niekodującej frakcji DNA. Zbudowany jest przede wszystkim z krótkich sekwencji występujących

w postaci wielu tysięcy, a nawet milionów kopii na genom. Sekwencje te były szczegółowo badane u wielu gatunków [1, 95, 114].

Zależności między heterochromatyną a satelitarnym DNA są bardzo złożone. Heterochromatyna nie jest zbudowana wyłącznie z satelitarnego DNA [53, 121], ale i niecały występujący u danego gatunku satelitarny DNA zlokalizowany jest, być może, w heterochromatynie [106].

WIELKOŚĆ SEGMENTÓW HETEROCHROMATYNOWYCH I ICH LOKALIZACJA W OBRĘBIE GENOMU

Wielkość segmentów heterochromatynowych występujących w obrębie chromosomów *Eukaryota* może być różna. Zwykle poszczególne ramiona chromosomów zbudowane są w znacznej części z euchromatyny, z którą sąsiadują w różnych pozycjach stosunkowo wąskie segmenty heterochromatynowe. U wielu roślin i zwierząt istnieją jednak chromosomy, w obrębie których heterochromatyna tworzy duże skupienia, czasem nawet przewyższające rozmiarami segmenty zbudowane z euchromatyny. Typowymi przykładami takich chromosomów są standardowe B-chromosomy żyta [53], nietypowe chromosomy 10 pary (K10) u kukurydzy z dużym, heterochromatynowym segmentem na końcu dłuższego ramienia [63, 113] oraz niektóre chromosomy *Scilla* [41]. U człowieka dłuższe ramię chromosomu Y zbudowane jest w znacznej części z heterochromatyny [44, 116]. W skrajnych przypadkach całe lub prawie całe chromosomy są heterochromatynowe. U zwierząt taką budowę mają chromosomy płci [1, 8]. Także B-chromosomy zwierząt i roślin zbudowane mogą być w całości lub w znacznej części z heterochromatyny [41, 53, 102, 123].

Ważną cechą heterochromatyny jest to, iż stanowi ona dodatkowy element w budowie genomu, tzn. że jej akumulacja związana jest ze wzrostem ogólnej ilości DNA w jądrze, a nie z „heterochromatynizacją” pewnych istniejących już w jądrze sekwencji euchromatynowych [39].

Heterochromatyna tworzy ściśle zlokalizowane w obrębie genomu skupienia. Nie wydaje się, jak zostanie to wykazane, aby pozycja segmentów heterochromatynowych była obojętna w funkcjonowaniu genotypu. Szereg ważnych przejawów oddziaływania heterochromatyny na różne funkcje genomu wynika wprost z określonego położenia segmentów heterochromatynowych w jego obrębie.

Heterochromatyna telomerowa jest charakterystycznym składnikiem genomu różnych gatunków *Secale*; fakt ten ma duże znaczenie praktyczne, gdyż pozwala na odróżnienie chromosomów żyta od chromosomów pszenicy u różnych odmian *Triticale* [101]. Także u licznych rodzajów w obrębie *Triticineae* [53], u *Allium* [26-28], *Scilla*

[37-39, 41, 42] i *Adoxa* [40] heterochromatyna telomerowa jest ważnym elementem w budowie genomu.

Heterochromatyna centromerowa występuje powszechnie u zwierząt i człowieka [1, 44, 60, 112, 116]. U roślin także stanowić może istotny element budowy genomu, m. in. u *Cymbidium* [110] oraz u różnych gatunków *Anacyclus* [25, 111]. Obecność tego typu heterochromatyny obserwowano także u wielu innych gatunków roślin, np. *Allium* [28].

Oprócz tych dwóch podstawowych typów heterochromatyny, u roślin oraz owadów obserwuje się stosunkowo często występowanie segmentów heterochromatyny interkalarniej w obrębie ramion niektórych chromosomów. Ich obecność stwierdzono m. in. u *Crepis*, *Fritillaria*, *Scilla*, *Allium*, *Anacyclus* oraz *Vicia* [36-39, 41, 42, 62, 107, 109, 111].

W jądrach interfazowych heterochromatyna występuje z reguły w postaci silnie skondensowanych obszarów (chromocentrow). Są one często obserwowane w pobliżu otoczki jądrowej i wszystko wskazuje na to, iż są z nią połączone [19, 88].

Występowanie heterochromatyny w postaci ściśle zlokalizowanych w obrębie genomu segmentów sugeruje, iż reprezentuje ona duże skupienia sekwencji niekodujących leżące poza genami kodującymi. Sekwencje te, wraz z niekodującymi sekwencjami, będącymi składnikiem euchromatyny i występującymi w postaci rozproszonych wstawek pomiędzy genami kodującymi, stanowią istotny element budowy genomu *Eukaryota* [85, 88]. Coraz liczniejsze ostatnio doniesienia o występowaniu „genów w kawałkach” sugerują, iż strukturę genetyczną organizmów wyższych tworzą nie tyle ciągłe sekwencje kodonów, co rozrzucone w obrębie długich sekwencji niekodujących ich fragmenty [34, 47].

FUNKCJE HETEROCHROMATYNY W OBRĘBIE GENOMU

Funkcje niekodujących sekwencji są przedmiotem wielu spekulacji [53, 83, 85, 90, 115]. Bennett [9, 10] sugeruje, iż sama ilość DNA w jądrze może wywierać duży wpływ na wiele aspektów jego funkcjonowania (tzw. efekt nukleotypowy). Wpływ ten jest, jak się wydaje, niezależny od zawartości informacyjnej DNA i sekwencji par zasad w jego obrębie [61]. W dużej zgodności z tymi poglądami pozostaje teoria Cavaliera-Smitha [18]. Zwiększenie ilości jądrowego DNA pociąga za sobą m. in. wydłużenie czasu trwania cyklu komórkowego [9, 10] i wszystkich zależnych od niego parametrów rozwojowych (minimalny czas trwania pokolenia, pora kwitnienia itp.). Nagl [79, 80] oraz Nagl i Ehrendorfer [91] wykazali, iż u niektórych przedstawicieli *Anthemideae* istnieje pozytyw-

na korelacja pomiędzy ilością euchromatyny w jądrze a długością cyklu komórkowego. Wykazali oni ponadto, iż zwiększony udział (‰) heterochromatyny, przy tej samej zawartości 2C DNA i tym samym typie życiowym, skraca czas trwania cyklu komórkowego (tab. 2). Badania ostatnich lat wykazały, że replikacja segmentów heterochromatynowych w fazie S następuje bardzo szybko w porównaniu z euchromatyną [59].

Obecnie mamy wiele dowodów na to, iż heterochromatyna, reprezentująca skupienia niekodujących sekwencji w genomie zwierząt i roślin pełnić może wiele specyficznych funkcji zarówno w regulacji ekspresji genów, jak i modyfikacji przebiegu innych procesów zachodzących w komórce (np. mejozy). Funkcje te zostaną omówione na kilku wybranych przykładach.

TABELA 2

Zawartość jądrowego DNA, heterochromatyny oraz długość cyklu komórkowego u niektórych wieloletnich i jednorocznych gatunków *Anthemideas**

Gatunek	DNA (10^{-12} g na 2C jądro)	Heterochromatyna (% całego DNA)	Czas trwania cyklu komórkowego (godz.)		
			spodziewany	wyznaczony	różnica
<i>Anacyclus depressus</i> wieloletni	12,42	1,62	14,3	15,9	+1,6
<i>A. clavatus</i> (Desf.) Pers. jednoroczny	10,48	8,55	13,0	11,0	-2,0
<i>A. radiatus</i> Lois. jednoroczny	16,92	6,84	16,2	13,6	-2,6
<i>Anthemis tinctoria</i> L. wieloletni	7,46	2,43	12,3	12,3	0,0
<i>A. cota</i> L. jednoroczny	15,78	9,89	16,0	6,5	-9,5
<i>A. austriaca</i> Jacq. jednoroczny	9,63	34,11	13,0	7,0	-6,0
<i>Artemisia absinthium</i> L. wieloletni	7,28	45,45	11,5	9,5	-2,0
<i>A. annua</i> L. jednoroczny	4,05	14,13	10,5	7,7	-2,8

* Według Nagla [80].

WPLYW HETEROCHROMATYNY NA EKSPRESJĘ GENÓW

Obecność dodatkowej porcji heterochromatyny może, jak się wydaje, mieć duży wpływ na ekspresję genów zawartych w genomie. Ruiz-Rejon i wsp. [102] badali wpływ heterochromatynowych B-chromosomów *Scilla autumnalis* na syntezę izoenzymów esterazy u różnych osobników tego gatunku. Poszczególne rośliny różniły się między sobą liczbą B-chromosomów występujących w genomie. U roślin posiada-

jących B-chromosomy stwierdzono występowanie dodatkowego izoenzymu esterazy, nie występującego nigdy u roślin bez B-chromosomów. Zjawisko to można wytłumaczyć na dwa sposoby: albo heterochromatynowe B-chromosomy zawierają gen kodujący dodatkowy izoenzym, albo obecność tych chromosomów wpływa na odblokowanie obecnego już w kompleksie, ale nie funkcjonującego genu. Druga możliwość jest bardziej prawdopodobna, gdyż stwierdzono, że ilość dodatkowego izoenzymu pozostaje na stałym poziomie bez względu na liczbę B-chromosomów u danego osobnika. Gdyby badany gen zlokalizowany był w obrębie B-chromosomu, to ze wzrostem liczby B-chromosomów wzrastałaby także liczba jego kopii w komórkach badanych roślin. Pociągałoby to za sobą zwiększenie ilości białka kodowanego przez ten gen. Przypuszczenia autorów znalazły potwierdzenie w późniejszych, bardzo pomysłowo przeprowadzonych badaniach nad tym samym gatunkiem [97].

WPLYW HETEROCHROMATYNY NA MEJOTYCZNĄ SEGREGACJĘ CHROMOSOMÓW

Longley [63] opisał nietypowy chromosom 10 pary u kukurydzy (K10). Chromosom ten posiada na końcu dłuższego ramienia duży segment heterochromatynowy. Późniejsze badania wykazały, że jego obecność wpływa na koniugację chromosomów, rekombinację genów oraz ich segregację u diploidalnych form kukurydzy [57, 64, 103-105]. U diploidów heterozygotycznych pod względem chromosomów 10 pary około 70% komórek jajowych otrzymuje ten chromosom, a więc mamy do czynienia z preferencyjnym przekazywaniem chromosomu z dodatkowym segmentem do tej makrospory, z której rozwinię się później woreczek zalążkowy. Przy obecności chromosomu K10 preferencyjna segregacja obejmuje także inne chromosomy, których homologi różnią się pod względem heterochromatynowych segmentów, mimo iż przy braku chromosomu K10 ulegają one zupełnie losowej segregacji. Co ciekawsze, stopień preferencyjnej segregacji wykazuje ścisłą zależność od wielkości segmentu, która może być zmienna i wykazuje duże wahania. Wykazano, iż preferencyjna segregacja spowodowana jest przedwczesną aktywnością neocentryczną heterochromatynowego segmentu oraz jego wpływem na pojawienie się tego typu aktywności w obrębie innych segmentów heterochromatynowych występujących w kariotypie.

Bardzo ciekawym aspektem zagadnienia preferencyjnego przekazywania chromosomu z heterochromatynowym segmentem do komórki jajowej jest wartość przystosowawcza tego zjawiska, gdyż wraz z nim do komórki jajowej przekazywane są także i geny do niego przylegające, i to bez względu na ich wartość przystosowawczą. Doprowadza to do

wniosku, iż decydującym czynnikiem powodującym preferencyjną segregację jest struktura chromosomu, a nie zespół genów w nim zlokalizowanych.

Poza wymienionymi cechami chromosomu K10 na uwagę zasługuje jego wpływ na zwiększenie stopnia rekombinacji innych chromosomów. Zwiększony stopień crossing-over występuje przede wszystkim w rejonach proksymalnych chromosomów oraz tam, gdzie jest ono zredukowane na skutek heterozygotyczności strukturalnej. U tetraploidalnej odmiany kukurydzy chromosom K10 zmniejsza frekwencję kwadriwalentów na rzecz biwalentów oraz zmniejsza częstość non-disjunction chromosomów 6 pary [113].

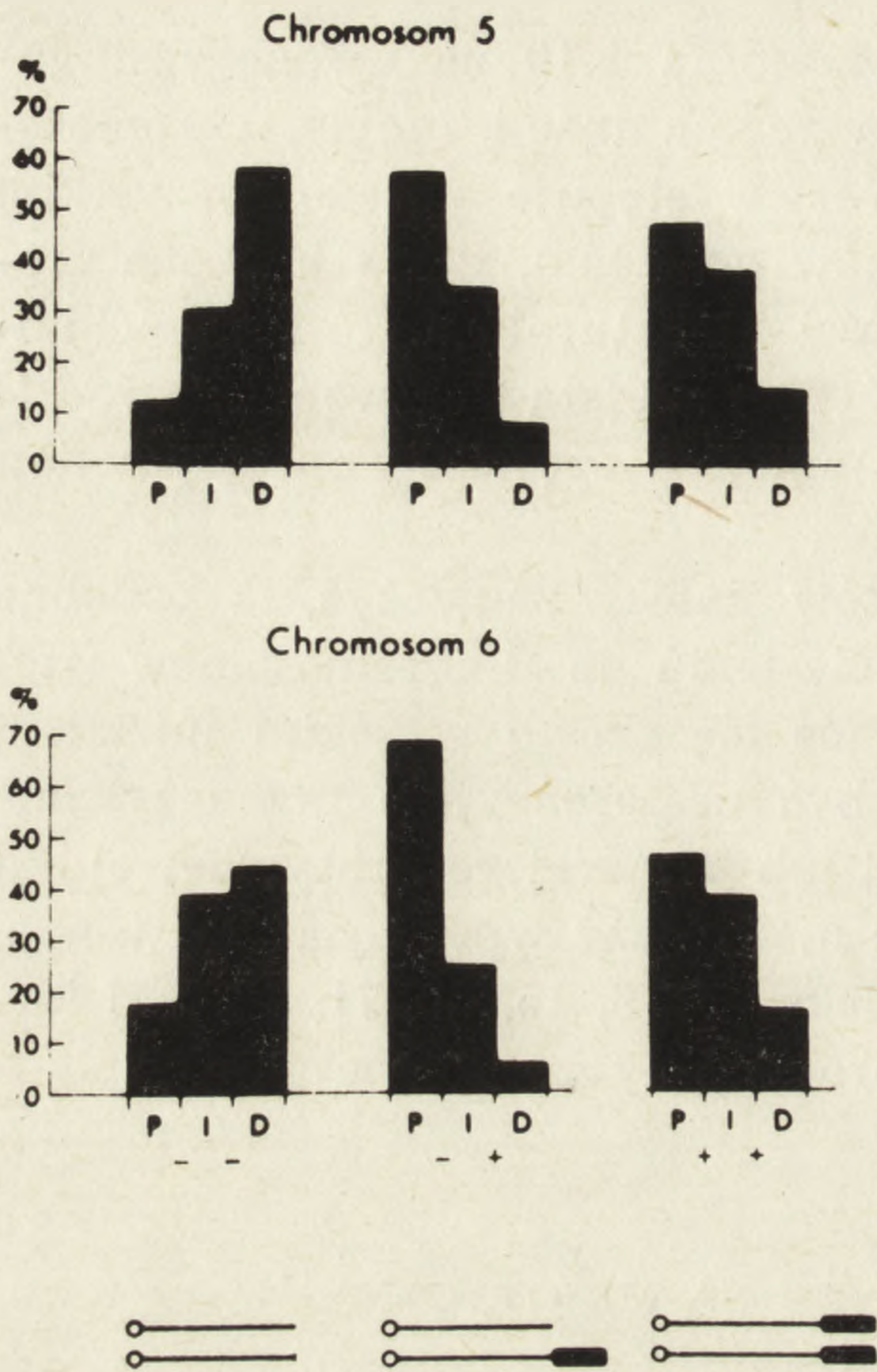
Na marginesie przytoczonych faktów należy zauważyć, iż podobne zjawiska opisywano wielokrotnie w odniesieniu do B-chromosomów wielu gatunków roślin. Te charakteryzujące się często wysokim udziałem heterochromatyny chromosomy mogą być preferencyjnie przekazywane do komórki jajowej [13, 30, 55, 56, 108] lub komórki generatywnej pyłku [13, 31, 75, 76]. Ich obecność wywierać może duży wpływ na frekwencję chiazm w obrębie biwalentów A-kompleksu [5, 6, 15, 16, 71, 122]. U kukurydzy plemniki posiadające B-chromosomy preferencyjnie zapładniają komórkę jajową [66].

WPLYW HETEROCHROMATYNY NA MEJOTYCZNĄ REKOMBINACJĘ GENÓW

Liczba oraz pozycja segmentów heterochromatynowych występujących w obrębie chromosomów wpływa regulująco na częstotliwość, a także lokalizację chiazm w mejozie. Wszystko wskazuje na to, iż występowanie chiazm ograniczone jest zwykle do euchromatynowych segmentów chromosomów [49, 70]. Zupełny brak chiazm w obrębie heterochromatyny stwierdzono u żyta [54], *Allium* [62], *Anemone* [68], *Triturus* [72], *Carausius* [100] i wielu innych gatunków zwierząt i roślin. U gatunków posiadających duże ilości heterochromatyny, szczególnie interkalarnej, ogranicza to znacznie ilość oraz obszar wymian zachodzących między chromosomami homologicznymi w mejozie.

Pojawienie się dodatkowych segmentów heterochromatynowych w obrębie niektórych chromosomów wpływać może w sposób zasadniczy na zmianę rozkładu chiazm w utworzonych przez nie biwalentach. Wpływ ten szczególnie zaznacza się w przypadku dystalnie położonych segmentów heterochromatynowych [50] i polega on na zwiększeniu stopnia rekombinacji w rejonach proksymalnych chromosomów (ryc. 1). Duże bloki heterochromatyny zmieniać mogą przebieg mejozy wpływa-

jąc między innymi na powstawanie asocjacji chromosomowych wyższego rzędu lub blokując proces powstawania chiazm [51].



Ryc. 1. Frekwencja chiazm w biwalentach 5 i 6 pary chromosomów *Atractomorpha similis*. Poszczególne osobniki mogą nie posiadać terminalnych heterochromatynowych segmentów w obrębie analizowanych par chromosomowych, albo są hetero- lub homozygotami ze względu na obecność takich segmentów. W celu przeanalizowania rozłożenia chiazm w obrębie biwalentów euchromatynowa część każdego z chromosomów została podzielona na trzy równej długości odcinki: proksymalny (P), interstycjalny (I) i dystalny (D). Według Johna [48], nieco zmienione

HETEROCHROMATYNA A ZMIENNOŚĆ CHROMOSOMÓW

Heterozygotyczność strukturalna chromosomów dotycząca heterochromatyny jest ważnym źródłem zmienności kariotypu zwierząt i roślin.

Dużą zmienność pod względem wielkości segmentów heterochromatynowych wykazuje większość chromosomów człowieka. Dotyczy ona zarówno heterochromatyny centromerowej [2, 43, 112, 120], jak i heterochromatyny przewężeń wtórnych [65, 121]. Obserwowane różnice dotyczą zarówno chromosomów homologicznych w obrębie jednego kariotypu (heterozygotyczność strukturalna), jak i chromosomów danego typu występujących u różnych osobników. Dużą zmienność pod względem wielkości heterochromatynowego segmentu na końcu dłuższego ramienia wykazuje w kariotypie człowieka chromosom Y [14, 44].

U żyta obserwowano wielokrotnie [55, 77, 78] deficyjencję obejmującą część heterochromatynowego segmentu standardowych B-chromosomów. Prowadziło to do powstania nowego typu B-chromosomów u tego gatunku. U rośliny tej obserwuje się ponadto duże wahania w wielkości segmentów heterochromatyny telomerowej w obrębie większości typów

chromosomowych [101]. Zmiany wielkości segmentów heterochromatyny telomerowej są też jednymi z najczęstszych zmian chromosomowych u różnych gatunków *Scilla* [41, 42] i *Allium* [62]. Obserwowane były także w obrębie chromosomów kukurydzy.

Innym aspektem ilościowym zmian w obrębie heterochromatyny jest pojawienie się dodatkowych jej segmentów w obrębie różnych typów chromosomowych. Tego typu heterozygotyczność strukturalną opisywano u *Allium* [62], *Anemone* [68] oraz *Scilla* [41, 42]. Ponadto była ona wielokrotnie obserwowana u owadów [50, 51].

W obrębie kariotypów zwierząt i roślin obserwuje się czasem translokacje segmentów heterochromatynowych. Tak na przykład w kariotypie *Scilla furseorum* wykazano translokację dużego segmentu heterochromatyny telomerowej [41], u człowieka zaś znane są przypadki translokacji części heterochromatyny z chromosomu Y na jeden z autosomów [44].

Obecność segmentów heterochromatynowych warunkuje przypuszczalnie także występowanie innych niż opisane zmian w obrębie genomu. Pęknięcia w obrębie tych segmentów mogą stanowić warunek zajścia fragmentacji chromosomów czy też ich fuzji. Mogą być także przyczyną powstawania inwersji [85]. W większości przypadków dane dotyczące tego aspektu oddziaływania heterochromatyny na strukturę genomu mają jednak charakter spekulatywny i nie znajdują potwierdzenia w najnowszych badaniach kariotypu. Coraz więcej danych wskazuje na to, iż miejscem zachodzenia pęknięć chromosomów są segmenty euchromatynowe lub połączenia między euchromatyną i heterochromatyną [115].

ROLA HETEROCHROMATYNY W EWOLUCJI

Segmenty heterochromatynowe mogą pełnić w obrębie eukariotycznego genomu szereg funkcji ważnych z ewolucyjnego punktu widzenia. Jedną z najważniejszych jest kontrola przebiegu rekombinacji i segregacji genów w czasie mejozy. Na rolę segmentów heterochromatynowych w procesach płciowych wskazuje pośrednio duży ich udział w budowie chromosomów płci. Segmenty te mają bez wątpienia wpływ na preferencyjną segregację chromosomów, częstotliwość występowania chiasm oraz ograniczenie ich rozlokowania do ściśle określonych miejsc w obrębie chromosomów. Miklos i Nankivell [70], John [50] oraz Edström [24] uważają, że właśnie wymienione właściwości heterochromatyny decydują o jej znaczeniu w ewolucji organizmów eukariotycznych. Ten ostatni autor twierdzi nawet, że duża frakcja jądrowego DNA pełni wyłącznie funkcję kontrolowania przebiegu mejozy.

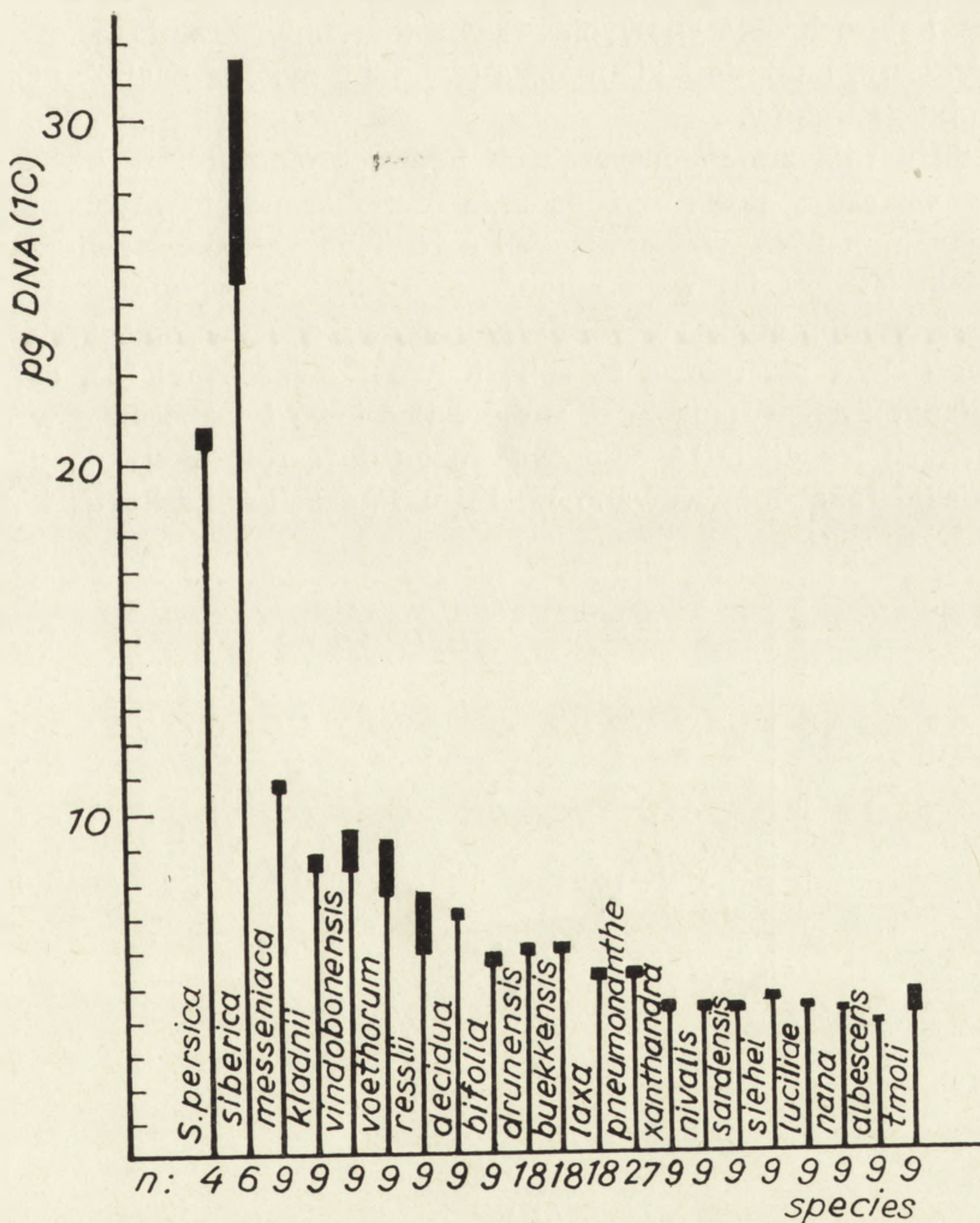
W świetle przytoczonej teorii zrozumiałe stają się często obserwo-

wane niedoreplikowania segmentów heterochromatynowych w czasie różnicowania i wzrostu różnych tkanek somatycznych. Zarówno u zwierząt, jak i roślin obserwowano zróżnicowaną replikację DNA w czasie poliploidyzacji komórek [119] i stwierdzono, że jednym z najczęstszych jej przejawów jest niedoreplikowanie heterochromatynowych segmentów genomu. Zjawisko to ma miejsce np. w czasie różnicowania suspensora u *Tropaeolum* [92]. Omówienie innych przykładów niedoreplikowania heterochromatyny w czasie poliploidyzacji i różnicowania tkanek znaleźć można w pracach przeglądowych Nagla [68, 89]. Procesy tego typu prowadzą do zmiany ilościowych proporcji pomiędzy heterochromatyną a euchromatyną na korzyść tej ostatniej. Skoro heterochromatyna (lub jej część) pełni wyłącznie funkcję kontrolowania przebiegu mejozy, to jej obecność w tkankach somatycznych nie jest konieczna, replikacja zaś tej frakcji jądrowego DNA podczas różnicowania i wzrostu tkanek somatycznych stanowiłaby zbędne obciążenie dla aparatu replikacyjnego komórki. U szarańczy *Chorizanthe terminifera* Webb i Neuhaus [123] obserwowali nawet niedoreplikowanie całego heterochromatynowego B-chromosomu w tkankach somatycznych, u roślin zaś obserwowano eliminację B-chromosomów (często heterochromatynowych) z tkanek somatycznych z zachowaniem ich obecności w tkankach generatywnych [11, 12, 23, 74, 98]. W czasie różnicowania tkanek zwierząt i roślin obserwowano także zjawisko odwrotne: amplifikację heterochromatynowych segmentów chromosomowych, ale należy podkreślić fakt, iż obserwacje te ograniczone są do tej pory do tkanek nowotworowych i tkanek pozostających przez dłuższy czas w hodowli poza organizmem. Amplifikację heterochromatyny obserwowano na przykład w hodowanych in vitro protokormach storczyka *Cymbidium* [110] oraz w hodowlach tkankowych wielu innych gatunków roślin [86, 89].

Obecność segmentów heterochromatynowych oraz różne rodzaje uwarunkowanej nią heterozygotyczności stanowić mogą dobre zabezpieczenie dla nowych kombinacji genowych, obiecujących z ewolucyjnego punktu widzenia. W skrajnych przypadkach zmiany chromosomowe prowadzić mogą do częściowej lub całkowitej izolacji rozrodczej nowo powstałych form. Natarajan i Ahnström [94] oraz Jones i wsp. [52] podkreślają, iż gatunki z dużą ilością ściśle zlokalizowanej heterochromatyny posiadają większe możliwości ewolucyjne. Wielu ewolucjonistów uważa obecnie, że zmiany w makrostrukturze genomu odgrywają większą rolę w ewolucji niż mutacje genowe [4, 7, 85]. Mayr [69] podkreśla, iż w większości przypadków nowe cechy nie powstają przez mutacje genowe, lecz przez reorganizację genotypu (powstanie nowych supergenów). Uważa on, iż większość zmian hamuje lub utrudnia przebieg crossing-over u heterozygot. Nowy układ może „zablokować” koadaptowaną ko-

lejność genów i chroniąc ją przed crossing-over utworzyć nowy supergen.

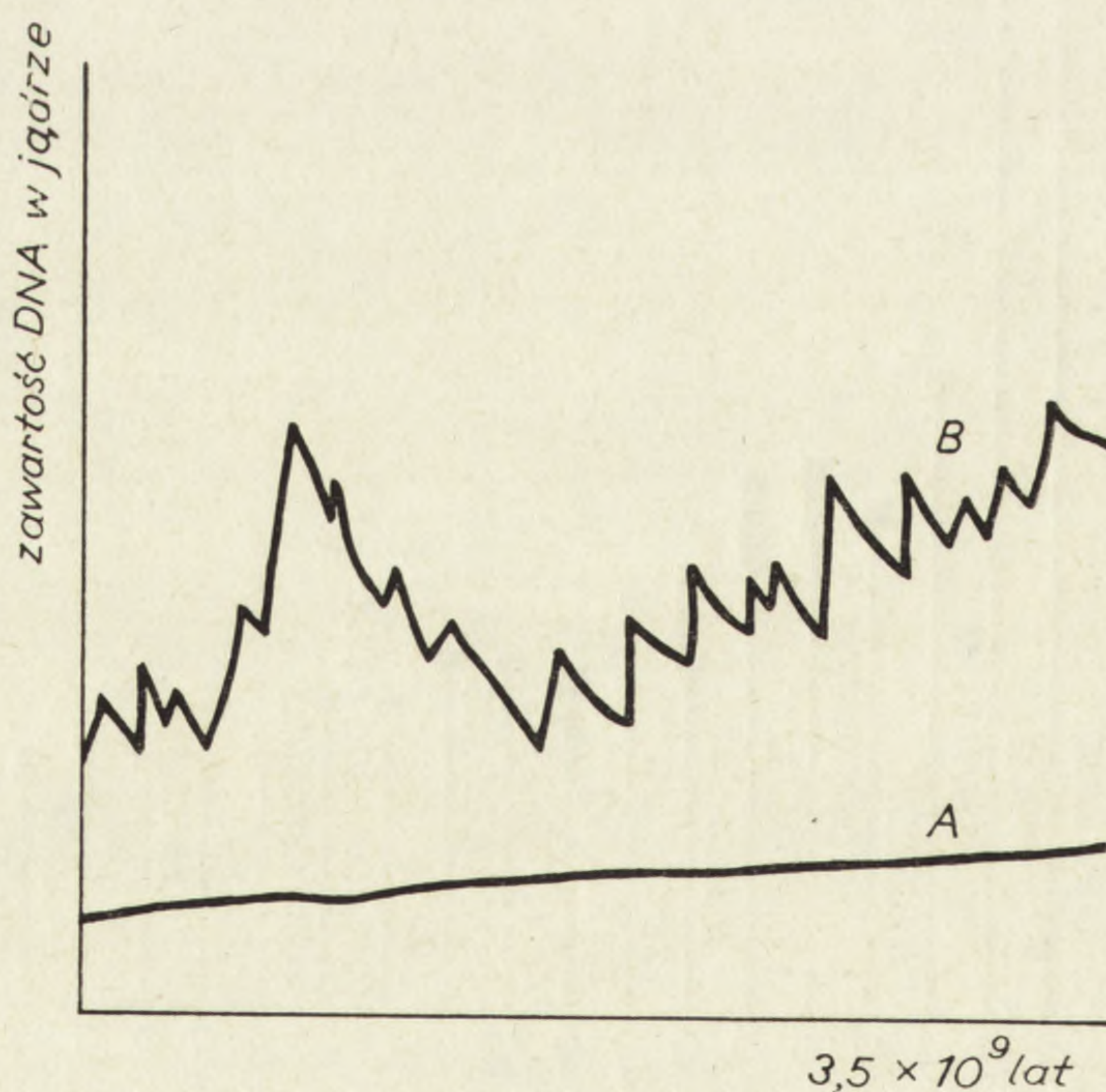
Zmiany ilościowe heterochromatyny odgrywają dużą rolę w specjacji i ich zachodzenie obserwowano z zastosowaniem metody prążków C w obrębie licznych rodzajów *Angiospermae*. Greilhuber [37—39] oraz Greilhuber i Speta [41, 42] obserwowali duże różnice pod tym względem między różnymi gatunkami *Scilla* (ryc. 2). Nagl i Ehrendorfer [91] wykazali, iż zmiany dotyczące ilości heterochromatyny odegrały dużą rolę w ewolucji różnych gatunków *Anthemideae*, szczególnie jednorocznych.



Ryc. 2. Relacje pomiędzy ogólną ilością DNA jądrowego a zawartością heterochromatyny u różnych gatunków *Scilla*. Grubą linią zaznaczono heterochromatynę, cienką euchromatynę. Według Greilhubera [39]

Dane te zostały potwierdzone w badaniach nad rodzajem *Anacyclus* [111]. W obrębie tego rodzaju występuje wyraźna tendencja do zwiększania wielkości i liczby segmentów heterochromatynowych w genomie. O ile starsze, wieloletnie gatunki tego rodzaju posiadają prawie wyłącznie heterochromatynę centromerową, o tyle młodsze od nich gatunki roczne wykazują zwiększony udział heterochromatyny telomerowej i interkalarnej. U zwierząt także obserwuje się zmiany ilości heterochromatyny związane ze specjacją. Arrighi i wsp. [3] wykazali, że różnice między genomami *Peromyscus crinitus* a *P. boylei* wynikają z pojawienia się nowych, heterochromatynowych (barwiących się metodą prążków C) segmentów heterochromatynowych. Euchromatynowe ramiona chromosomów wykazują natomiast identyczną (wykrytą metodą prążków C) strukturę u obu gatunków.

Na dużą rolę zmian dotyczących heterochromatyny w ewolucji *Eukaryota* wskazują pośrednio badania wysokorepetytywnych, satelitarnych sekwencji DNA występujących u różnych gatunków zwierząt i roślin. Jak już wcześniej wspomniano, sekwencje te są ważnym składnikiem heterochromatyny u wielu gatunków, chociaż obu tych frakcji jądrowego DNA nie można ze sobą identyfikować. Nagl [83, 85] cytuje szereg danych sugerujących, iż zmiany ilościowe i jakościowe w obrębie satelitarnych frakcji DNA odgrywać mogą dużą rolę w specjacji. U roślin sytuację taką obserwowano m. in. u *Phaseolus*, *Lathyrus* i *Anemo-*



Ryc. 3. Interpretacja ewolucyjnych zmian ilości jądrowego DNA w czasie ewolucji. A — „pierwotny DNA” lub geny, B — „wtórny DNA” zawierający sekwencje repetytywne, regulacyjne itp. Według Nagla [88], nieco zmienione

ne. Marks [68] postuluje, iż różnice fenotypowe u *Anemone* spowodowane są głównie różnicami w obrębie satelitarnego DNA. Pojawienie się specyficznych typów satelitarnego DNA odegrało dużą rolę w ewolucji roślin zbożowych.

Analiza zmian ilościowych i jakościowych w obrębie heterochromatyny i innych niekodujących frakcji DNA zwierząt i roślin wskazuje, że zmiany te towarzyszą nieodłącznie ewolucyjnemu różnicowaniu się organizmów [90]. Z pewnością nie są one przypadkowe, chociaż mogą zachodzić zarówno w kierunku redukcji, jak i zwiększania zawartości tych frakcji w genomie. Sytuację tę dobrze ilustruje ryc. 3, zaczerpnięta z pracy Nagla [88].

LITERATURA

- [1] ARRIGHI F. E., Mammalian chromosomes, [w] *The Cell Nucleus*, II, red. H. Busch, Academic Press 1974, 1—32.
- [2] ARRIGHI F. E., HSU T. C., Localization of heterochromatin in human chromosomes, *Cytogenetics*, **10**: 81—86, 1971.
- [3] ARRIGHI F. E., STOCK A. D., PATHAK S., Chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia, Cricetidae). V. Evidence of pericentric inversions, *Chromosomes Today*, **5**: 323—329, 1976.
- [4] AYALA F. J., Genetic differentiation during the speciation process, *Evol. Biol.*, **8**: 1—78, 1975.
- [5] AYNOADU U., REES H., The influence of B-chromosomes on chiasma frequencies in Black Mexican Sweet Corn, *Genetica*, **39**: 75—81, 1968.
- [6] BARLOW P. W., VOSA C. G., The effect of supernumerary chromosomes on meiosis in *Pushkinia libanotica* (Liliaceae), *Chromosoma* (Berl.), **30**: 344—355, 1970.
- [7] BEDO D. G., Cytogenetics and evolution of *Simulium ornatipes* Skuse (Diptera: Simuliidae). I. Sibling speciation. *Chromosoma* (Berl.), **64**: 37—65, 1977.
- [8] BEDO D. G., C, Q, and H-banding in the analysis of Y chromosome rearrangements in *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), *Chromosoma* (Berl.), **77**: 299—308, 1980.
- [9] BENNETT M. D., Nuclear characters in plants, *Brookhaven Symp. Biol.*, **25**: 344—366, 1973.
- [10] BENNETT M. D., DNA amount, latitude, and corp plant distribution, *Environm. Exp. Bot.*, **16**: 93—108, 1976.
- [11] BERGER C. A., WITKUS E. R., The cytology of *Xanthisma texanum* D. C. I. Differences in the chromosome number of root and shoot, *Bull. Torrey Bot. Club*, **81**: 489—491, 1954.
- [12] BERGER C. A., McMAHON R. M., WITKUS E. R., The cytology of *Xanthisma texanum* D. C. III. Differential somatic reduction, *Bull. Torrey Bot. Club*, **82**: 377—382, 1955.
- [13] BOSEMARK N. O., Further studies on accessory chromosomes in grasses, *Hereditas*, **43**: 236—297, 1957.
- [14] BRATKOWSKA W., HÜBNER H., Częstość występowania w populacji no-

- worodków niektórych cech polimorficznych chromosomów, V Ogólnopolska Konferencja Cytogenetyczna, Streszczenia referatów, Łódź 1981, 35.
- [15] BRANDHAM P. E., BHATTARAI S., The effect of B chromosome number on chiasma frequency within and between individuals of *Gibasis linearis* (Comelinaceae), *Chromosoma* (Berl.), **64**: 343—348, 1977.
- [16] CAMERON F. M., REES H., The influence of B chromosomes on meiosis in *Lolium*, *Heredity*, **22**: 446—450, 1967.
- [17] CASPERSSON T., ZECH L., MODEST E. J., FOLEY G. E., WAGH U., SIMONSSON E., Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **58**: 128—140, 1969.
- [18] CAVALIER-SMITH T., Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox, *J. Cell Sci.*, **34**: 247—278, 1978.
- [19] CHIARELLI B., BRØGGER A., Superchromosomal organization and its cytogenetics consequences in the *Eukaryota*, *Genetica*, **49**: 109—126, 1978.
- [20] COMINGS D. E., Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure, *Ann. Rev. Genet.*, **12**: 25—46, 1978.
- [21] DARLINGTON C. D., La COUR L. F. Differential reactivity of the chromosomes, *Ann. Bot.*, **2**: 615—625, 1938.
- [22] DARLINGTON C. D., La COUR L. F., Nucleic acid starvation of chromosomes in *Trillium*, *J. Genet.*, **40**: 185—212, 1940.
- [23] DARLINGTON C. D., THOMAS P. T., Morbid mitoses and the activity of inert chromosomes in *Sorghum*, *Proc. R. Soc. Ser. Biol. Sci.*, **130**: 127—150, 1941.
- [24] EDSTRÖM J. E., Meiotic versus somatic transcription with special reference to *Diptera*, [w] Dahlem Workshops on Organization and Expression of Chromosomes, Berlin: Dahlem Workshops, 1976, 301—316.
- [25] EHRENDORFER F., SCHWEIZER D., GREGER H., HUMPHRIES C., Chromosome banding and synthetic systematics in *Anacyclus* (Asteraceae-Anthemideae), *Taxon*, **26**: 387—394, 1977.
- [26] EL-GADI A., ELKINGTON T. T., Comparison of the Giemsa C-band karyotypes and the relationships of *Allium cepa*, *A. fistulosum* and *A. galanthum*, *Chromosoma* (Berl.), **51**: 19—23, 1975.
- [27] FISKESJÖ G., Two types of constitutive heterochromatin made visible in *Allium* by rapid C-banding method, *Hereditas*, **78**: 153—156, 1974.
- [28] FISKESJÖ G., Chromosomal relationships between three species of *Allium* as revealed by C-banding, *Hereditas*, **81**: 23—32, 1975.
- [29] FRENSTER J. H., Ultrastructure and function of heterochromatin and euchromatin, [w] *The Cell Nucleus*, I., red. H. Busch, Academic Press 1974, 565—580.
- [30] FRÖST S., The cytological behaviour and mode of transmission of accessory chromosomes in *Plantago serraria*, *Hereditas*, **45**: 191—210, 1959.
- [31] FRÖST S., The inheritance of accessory chromosomes in plants, especially in *Ranunculus acris* and *Phleum nodosum*, *Hereditas*, **61**: 317—362, 1969.
- [32] GAJEWSKI W., Molekularne podstawy procesów życiowych, [w] *Biologia molekularna*, red. Z. Lassota, PWN, Warszawa 1980, 15—39.
- [33] GEITLER L., Temperaturbedingte Ausbildung von Spezialsegmenten and Chromosomenenden, *Chromosoma*, **1**: 554—561, 1940.
- [34] GILBERT W., DNA sequencing and gene structure, *Biosc. Reports*, **1**: 353—375, 1981.

- [35] GILL B. S., Evolutionary relationships based on heterochromatin bands in six species of the *Triticinae*, *J. Hered.*, **72**: 391—394, 1981.
- [36] GREILHUBER J., Heterogeneity of heterochromatin in plants: comparison of Hy- and C-bands in *Vicia faba*, *Pl. Syst. Evol.*, **124**: 139—156, 1975.
- [37] GREILHUBER J., Nuclear DNA and heterochromatin contents in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica*, and *Puschkinia scilloides* (*Liliaceae*), *Pl. Syst. Evol.*, **128**: 243—257, 1977.
- [38] GREILHUBER J., DNA contents, Giemsa banding, and systematics in *Scilla bifolia*, *S. drunensis*, and *S. vindobonensis* (*Liliaceae*), *Pl. Syst. Evol.*, **130**: 223—233, 1978.
- [39] GREILHUBER J., Evolutionary changes of DNA and heterochromatin amounts in the *Scilla bifolia* group (*Liliaceae*), *Pl. Syst. Evol. Suppl.*, **2**: 263—280, 1979.
- [40] GREILHUBER J., C-band distribution, DNA content and base composition in *Adoxa moschatellina* (*Adoxaceae*), a plant with cold-sensitive chromosome segments, *Pl. Syst. Evol.*, **131**: 243—259, 1979.
- [41] GREILHUBER J., SPETA F., C-band karyotypes in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica*, and *Puschkinia* (*Liliaceae*), *Pl. Syst. Evol.*, **126**: 149—188, 1976.
- [42] GREILHUBER J., SPETA F., Giemsa karyotypes and their evolutionary significance in *Scilla bifolia*, *S. drunensis*, and *S. vindobonensis* (*Liliaceae*), *Pl. Syst. Evol.*, **127**: 171—190, 1977.
- [43] HANSMANN I., Structural variability of human chromosome 9 in relation to its evolution, *Hum. Genet.*, **32**: 247—262, 1976.
- [44] HECHT F., WYANDT H. E., MAGENIS R. E. H., The human cell nucleus: quinacrine and other differential stains in the study of chromatin and chromosomes, [w] *The Cell Nucleus*, II., red. H. Busch, Academic Press 1974, 33—121.
- [45] HEITZ E., Heterochromatin der Moose, *I. Jahrb. Wiss. Bot.*, **69**: 762—818, 1928.
- [46] HÜBNER H., KONONOWICZ A. K., Postulowane mechanizmy powstawania wzorów prążkowych w chromosomach metafazowych, *Post. Biol. Kom.*, **4**: 339—370, 1977.
- [47] HÜBNER H., DZWONKOWSKA A., OSIECKA R., Postępy w poznaniu materiału genetycznego u *Eukaryota*, II., *Struktura genów*, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 149—176, 1982.
- [48] JOACHIMIAK A., Metody różnicowego barwienia chromosomów, *Wiad. Bot.*, **27**: 11—30, 1983.
- [49] JOHN B., Myths and mechanisms of meiosis, *Chromosoma (Berl.)*, **54**: 295—325, 1976.
- [50] JOHN B., Heterochromatin variation in natural populations, *Chromosomes Today*, **7**: 128—137, 1981.
- [51] JOHN B., KING M., Meiotic effects of supernumerary heterochromatin in *Heteropternis obscurella*, *Chromosoma (Berl.)*, **85**: 39—65, 1982.
- [52] JONES K. W., POSSER J., CORNEO G., GINELLI E., BOBROW M., Satellite DNA constitutive heterochromatin and human evolution, [w] *Modern aspects of cytogenetics: constitutive heterochromatin in man*, red. R. A. Pfeiffer, Stuttgart: Schattauer 1972, 45—61.
- [53] JONES R. N., Genome organization in higher plants, *Chromosomes Today*, **5**: 117—130, 1976.
- [54] JONES G. H., Giemsa C-banding of rye meiotic chromosomes and the nature of „terminal” chiasmata, *Chromosoma (Berl.)*, **66**: 45—57, 1978.

- [55] KAVANO H., Cytogenetic studies in *Lilium callosum*. II. Preferential segregation of a supernumerary chromosome, Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ. Ser. E, 2: 53—60, 1956.
- [56] KAVANO H., Cytogenetic studies in *Lilium callosum*. III. Preferential segregation of a supernumerary chromosome in E. M. Cs., Proc. Japan. Acad., 33: 553—558, 1957.
- [57] KIKUDOME G. Y., Studies on the phenomenon of preferential segregation in maize, Genetics, 44: 815—831, 1959.
- [58] KISHIKAWA H., Effect of the small iso B and deficient B chromosomes on the pairing of standard B-chromosomes in rye, Cytologia, 42: 315—322, 1977.
- [59] KWIATKOWSKA M., Zmiany struktury jądra a jego aktywność replikacyjna i transkrypcyjna w przebiegu cyklu komórkowego, Postępy Biol. Kom., 9: 199—234, 1982.
- [60] LEMEUNIER F., DUTRILLAUX B., ASHBURNER M., Relationships within the *Melanogaster* subgroup species of the genus *Drosophila* (*Sophophora*). III. The mitotic chromosomes and quinacrine fluorescent patterns of the polytene chromosomes, Chromosoma (Berl.), 69, 349—361, 1978.
- [61] LIMA-DE-FARIA A., The relation between chromomers, replications, operons, transcription units, genes, viruses and palindromes, Hereditas, 81: 249—284, 1975.
- [62] LOIDL J., C-band proximity of chiasmata and absence of terminalisation in *Allium flavum* (*Liliaceae*), Chromosoma (Berl.), 73: 45—51, 1979.
- [63] LONGLEY A. E., Chromosomes of maize from North American Indians, J. Agr. Res., 56: 177—195, 1938.
- [64] LONGLEY A. E., Abnormal segregation during megasporogenesis in maize, Genetics, 30: 100—113, 1945.
- [65] LUBS H. A., RUDDLE F. H., Chromosome polymorphism in American Negro and White populations, Nature, 223: 134—135, 1971.
- [66] MARKERT C. L., URSPRUNG H., Genetyka rozwoju, PWN, Warszawa 1974.
- [67] MARKS G. E., Giemsa banding of meiotic chromosomes in *Anemone blanda*, Chromosoma (Berl.), 49: 113—119, 1974.
- [68] MARKS G. E., Variation of Giemsa banding patterns in the chromosomes of *Anemone blanda* L., Chromosomes Today, 5: 179, 1976.
- [69] MAYR E., Populacje, gatunki i ewolucja. Wiedza Powszechna, Warszawa 1974.
- [70] MIKLOS G. L. G., NANKIVELL R. N., Telomeric satellite DNA functions in regulating recombination, Chromosoma (Berl.), 56: 143—167, 1976.
- [71] MOCHIZUKI A., Further studies on the effect of accessory chromosomes on chromosome pairing, Japan. J. Genet., 39: 356, 1964.
- [72] MORGAN G. T., Absence of chiasmata from the heteromorphic region of chromosome I during spermatogenesis in *Triturus cristatus carnifex*, Chromosoma (Berl.), 66: 269—280, 1978.
- [73] MOUTSCHEN J., Fine structure of chromosomes as revealed by fluorescence analysis, Prog. Biophys. Molec. Biol., 30: 1—28, 1975.
- [74] MÜNTZING A., Different chromosome numbers in root tips and pollen mother cells in a sexual strain of *Poa alpina*, Hereditas, 32: 127—129, 1946.

- [75] MÜNTZING A., Cyto-genetics of accessory chromosomes (B-chromosomes), *Caryologia*, Suppl. to Vol. 6: 282—301, 1954.
- [76] MÜNTZING A., Accessory chromosomes, *Bull. Bot. Soc. Bengal*, 20: 1—15, 1966.
- [77] MÜNTZING A., LIMA-DE-FARIA A., Pachytene analysis of standard fragments and large iso-fragments in rye, *Hereditas*, 35: 253—268, 1949.
- [78] MÜNTZING A., LIMA-DE-FARIA A., Pachytene analysis of a deficient accessory chromosome in rye, *Hereditas*, 38: 1—19, 1952.
- [79] NAGL W., Mitotic cycle time in perennial and annual plants with various amounts of DNA and heterochromatin, *Developmental Biology*, 39: 342—346, 1974.
- [80] NAGL W., Role of heterochromatin in the control of cell cycle duration, *Nature*, 249: 53, 1974.
- [81] NAGL W., Nuclear organization, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 27: 39—69, 1976.
- [82] NAGL W., *Zellkern und Zellzyklen*, Stuttgart: Ulmer, 1976.
- [83] NAGL W., The evolution of chromosomal DNA redundancy: ontogenetic lateral, versus phylogenetic tandem changes, *Nucleus*, 20: 10—27, 1977.
- [84] NAGL W., Condensed interphase chromatin in plant and animal cell nuclei: fundamental differences, *Pl. Syst. Evol. Suppl.*, 2: 247—260, 1979.
- [85] NAGL W., Search for the molecular basis of diversification in phylogenesis and ontogenesis, *Pl. Syst. Evol.*, 2: 3—25, 1979.
- [86] NAGL W., Differential DNA replication in plants: critical review, *Z. Pflanzenphysiol.*, 95: 283—314, 1979.
- [87] NAGL W., Nuclear ultrastructure: condensed chromatin in plants is species-specific (karyotypical), but not tissue-specific (functional), *Protoplasma*, 100: 53—71, 1979.
- [88] NAGL W., Condensed chromatin: species-specificity, tissue-specificity, and cell cycle-specificity, as monitored by scanning cytometry, [w] *Cell Growth*, red. C. Nicollini, Plenum Press, 1982, 171—218.
- [89] NAGL W., Cell growth and nuclear DNA increase by endoreduplication and differential replication, [w] *Cell Growth*, red. C. Nicollini, Plenum Press, 1982, 619—651.
- [90] NAGL W., Evolution: theoretical and physical considerations, *Biol. Zbl.*, w druku.
- [91] NAGL W., EHRENDORFER F., DNA content, heterochromatin, mitotic index and growth in perennial and annual *Anthemideae* (*Asteraceae*), *Pl. Syst. Evol.*, 123: 35—54, 1974.
- [92] NAGL W., PESCHKE C., van GYSEGHEM R., Heterochromatin underreplication in *Tropaeolum* embryogenesis, *Naturwiss.*, 63: 198, 1976.
- [93] NAGL W., JEANJOUR M., KLING H., KÜHNER S., MICHELIS I., MÜLLER T., STEIN B., Genome and chromatin organization in higher plants, *Biol. Zbl.*, w druku.
- [94] NATARAJAN A. T., AHNSTRÖM G., Heterochromatin and chromosome aberrations, *Chromosoma (Berl.)*, 28: 48, 1969.
- [95] OLSZEWSKA M., red. *Metody badania chromosomów*, PWRiL, Warszawa 1981.
- [96] OLSZEWSKA M., Heterochromatyna w genomie roślin, *Postępy Biol. Kom.* 9: 243—258, 1982.
- [97] OLIVER J. L., POSSE F., MARTINEZ-ZAPATER J. M., ENRIQUEZ A. M.,

- RUIZ-REJON M., B-chromosomes and E-1 isozyme activity in mosaic bulbs of *Scilla autumnalis* (Liliaceae), *Chromosoma* (Berl.), **85**: 399—403, 1982.
- [98] ÖSTERGREN G., FRÖST S., Elimination of accessory chromosomes from the roots in *Haplopappus gracilis*, *Hereditas*, **48**: 363—366, 1962.
- [99] PARDUE M. L., GALL J. G., Chromosomal localization of mouse satellite DNA, *Science*, **168**: 1356—1358, 1970.
- [100] PIJNACKER L. P., FERWERDA M. A., Normal and BrdC-substituted chromosomes during spermatogenesis with an endomeiotic chromosome reduplication in *Carausius morosus* Br., *Chromosoma* (Berl.), **85**: 67—82, 1982.
- [101] PILCH J., Rye chromosome constitution and the amount of telomeric heterochromatin of the widely and narrowly adapted CIMMYT hexaploid triticales, *Z. Pflanzenzüchtg.*, **87**: 58—68, 1981.
- [102] RUIZ-REJON M., POSSE F., OLIVER J. L., The B-chromosome system of *Scilla autumnalis* (Liliaceae): effects at the isozyme level, *Chromosoma* (Berl.), **79**: 341—348, 1980.
- [103] RHOADES M. M., Preferential segregation in maize, *Genetics*, **27**: 395—407, 1942.
- [104] RHOADES M. M., Preferential segregation in maize, [w] *Heterosis*, red. J. W. Gowen, Iowa State College Press, Ames 1952, 66—80.
- [105] RHOADES M. M., DEMPSEY E., The effect of abnormal chromosome 10 on preferential segregation and crossing over in maize, *Genetics*, **53**: 989—1020, 1966.
- [106] ROWLAND R. E., Distribution of repetitive DNA sequences in *Vicia faba* chromosomes, *Exp. Cell. Res.*, **126**: 444—448, 1980.
- [107] ROWLAND R. E., Chromosome banding and heterochromatin in *Vicia faba*, *Theor. Appl. Genet.*, **60**: 275—280, 1981.
- [108] RUTISHAUSER A., Genetics of fragment chromosomes in *Trillium grandiflorum*, *Heredity*, **10**: 195—204, 1956.
- [109] SCHWEIZER D., Differential staining of plant chromosomes with Giemsa, *Chromosoma* (Berl.), **40**: 307—320, 1973.
- [110] SCHWEIZER D., NAGL W., Heterochromatin diversity in *Cymbidium*, and its relationship to differential DNA replication, *Exp. Cell Res.*, **98**: 411—423, 1976.
- [111] SCHWEIZER D., EHRENDORFER F., Giemsa banded karyotypes, systematics, and evolution in *Anacyclus* (Asteraceae-Anthemideae), *Pl. Syst. Evol.*, **126**: 107—148, 1976.
- [112] SCHWEIZER D., AMBROS P., ANDRLE M., Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, Distamycin A, *Exp. Cell Res.*, **111**: 327—332, 1978.
- [113] SNOPE A. J., Meiotic behaviour in autotetraploid maize with abnormal chromosome 10, *J. Hered.*, **58**: 173—177, 1967.
- [114] STRAUSS B. S., Nuclear DNA, [w] *The Cell Nucleus*, III, red. H. Busch, Academic Press, 1974, 3—33.
- [115] SUMNER A. T., The nature and mechanisms of chromosome banding, *Cancer Gen. Cytogen.*, **6**: 59—87, 1982.
- [116] SZABUNIEWICZ B., LIMON J., Pokrewieństwo kariotypów wyższych hominoidów, *Pos. Hig. Med. Dośw.*, **33**: 453—464, 1979.
- [117] SZARSKI H., Ewolucja rozmiarów komórek kręgowców, *Postępy Biol. Kom.*, **8**: 343—366, 1981.
- [118] TAKEHISA S., Heterochromatic segments in *Vicia* revealed by treatment with HCl-acetic-acid, *Nature*, **217**: 567—568, 1968.

- [119] TURAŁA-SZYBOWSKA K., Endopoliploidalność i jej znaczenie w różnicowaniu, *Wiad. Bot.*, **23**: 205—213, 1979.
- [120] VERMA R. S., DOSIK H., Human chromosomal heteromorphism: nature and clinical significance, *Int. Rev. Cytol.*, **62**: 361—381, 1980.
- [121] VERMA R. S., BRAT S. V., DOSIK H., A rapid method for identification of constitutive heterochromatin of secondary constriction regions of human chromosomes 1, 9, and 16, *J. Hered.*, **73**: 74—76, 1982.
- [122] VOSA C. G., BARLOW P. W., Meiosis and B chromosomes in *Listera ovata* (*Orchidaceae*), *Caryologia*, **25**: 1—8, 1972.
- [123] WEBB G. C., NEUHAUS P., Chromosome organization in the Australian plague locust. 2. Banding variants of the B-chromosome, *Chromosoma* (Berl.), **70**: 205—238, 1979.
- [124] YAMASAKI N., Differentielle Färbung der somatischen Metaphasechromosomen von *Cypridium debile*, *Chromosoma* (Berl.), **7**: 620—626, 1956.

Otrzymano: 2 maja 1983.

Przyjęto: 6 czerwca 1983.

Adres autora: 31—044 Kraków, ul. Grodzka 52.

STRUKTURALNO-FUNKCJONALNE WŁAŚCIWOŚCI HISTONÓW RDZENIA NUKLEOSOMU

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF NUCLEOSOME CORE HISTONES

Anna LIPIŃSKA

Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Biofizyki
Uniwersytet Łódzki, Łódź

Streszczenie. W artykule dokonano syntetycznego przeglądu danych dotyczących sekwencji aminokwasowych histonów rdzenia nukleosomu. Przedstawiono wyniki badań struktury histonów rdzenia nukleosomu za pomocą trawienia chromatyny trypsyną oraz analizy immunochemicznej determinant antygenowych na powierzchni chromatynowych podjednostek. Omówiono rolę fragmentów N-końcowych histonów rdzenia nukleosomu w strukturze chromatyny.

Summary. In this article the data concerning amino acid sequence of nucleosome core histones have been reviewed. The results of studies on the structure of the nucleosome core histones obtaining by trypsin digestion of chromatin as well as immunochemical analysis of ontigenic determinants on the surface of chromatin particles have been presented. The role of N-terminal fragments of nucleosome core histones in the chromatin structure has been also discussed.

WYKAZ JEDNO- I TRÓJLITEROWYCH SYMBOLI AMINOKWASÓW

- A — alanina — Ala
- B — Asx (Asp lub Asn)
- C — cysteina — Cys
- D — kwas asparaginowy — Asp
- E — kwas glutaminowy — Glu
- F — fenyloalanina — Phe
- G — glicyna — Gly
- H — histydyna — His
- I — izoleucyna — Ile
- K — lizyna — Lys
- L — leucyna — Leu
- M — metionina — Met
- N — asparagina — Asn
- P — prolina — Pro

Q — glutamina — Gln
R — arginina — Arg
S — seryna — Ser
T — treonina — Thr
V — walina — Val
W — tryptofan — Trp
X — aminokwas nie ustalony
Y — tyrozyna — Tyr
Z — Glx (Glu lub Gln)

WSTĘP

W ciągu ostatnich lat otrzymano szereg dowodów przemawiających za słusnością nukleosomowego modelu struktury chromatyny [25, 31, 33, 36, 37, 45, 47]. Obecność powtarzających się podjednostek w strukturze chromatyny wyższych i niższych eukariontów sugeruje, że ten sposób organizacji DNA pojawił się bardzo wcześnie w procesie ewolucji [48]. Mimo uniwersalności podjednostkowej struktury chromatyny stwierdzono pewne różnice w nukleosomach wyższych i niższych eukariontów. Długość odcinka DNA w nukleosomie wyższych eukariontów liczy 190—240 par nukleotydów [14], podczas gdy w niższych eukariontach może być ona znacznie mniejsza, np. u *Aspergillus*: 154 par nukleotydów [39, 42, 45]. Ogólnie przyjęto, że centralnym strukturalnym elementem nukleosomu zarówno wyższych, jak i niższych eukariontów jest cząstka rdzeniowa składająca się z dwóch cząsteczek każdego z czterech histonów: H3, H4, H2B i H2A, wokół których owinięte jest około 146 par nukleotydów DNA [38]. Konieczność precyzyjnego dopasowania struktury trzeciorzędowej cząsteczek histonów, umożliwiającego tworzenie zwartego kompleksu, jest prawdopodobnie przyczyną małej zmienności ewolucyjnej histonów cząstki rdzeniowej [26].

SEKWENCJE AMINOKWASOWE HISTONÓW RDZENIA NUKLEOSOMU

Badania sekwencji aminokwasowej histonów argininowych (H4, i H3) pochodzących z różnych źródeł dokumentują niezwykle niską zmienność ewolucyjną tych białek.

Porównanie struktury pierwszorzędowej histonu H4 szkarłupni [53, 66] z histonem H4 grasicy cielęcia [16] i identycznymi histonami innych ssaków [29, 49] wykazało, że różni się on jedynie jednym aminokwasem (zamiast treoniny w pozycji 73 zawiera cysteinę) (ryc. 1). Histon H4 kiełków grochu różni się w sekwencji aminokwasowej od histonu ssaków w dwóch pozycjach [17]. Obie mutacje punktowe są wysoce konserwatywne: walina → izoleucyna (w pozycji 60.) oraz lizyna → arginina

W przeciwieństwie do histonów H4 i H3, histony H2B i H2A charakteryzują się większą zmiennością ewolucyjną.

Z przeprowadzonych badań porównawczych sekwencji aminokwasów w histonach H2B, uporządkowanych w taki sposób, aby uzyskać największą homologię z histonem H2B grasicy cielęcia [30], wynika bardzo duża zmienność zarówno wielkości, jak i sekwencji aminokwasowej ich N-końcowych fragmentów [23, 32, 43, 54, 55, 57—61]. Większość delecji, insercji, a także punktowych podstawień obserwuje się w tym regionie cząsteczki histonu H2B (ryc. 3). N-końcowy odcinek łańcucha polipeptydowego histonu H2B₍₁₎ [54] spermy jeżowca morskiego *Parechinus angulosus* zawiera dodatkowe aminokwasy, które są ułożone w formie czterokrotnie powtarzającego się pentapeptydu. Trzy z tych powtórzeń mają sekwencję Pro-Thr-Lys-Arg-Ser, natomiast czwarte uległo mutacji do Pro-Ser-Gln-Lys-Ser. Po powtarzającym się pentapeptydzie występuje region bogaty w glicynę i lizynę, który jest uporządkowany jako powtarzająca się jednostka trójpeptydowa Lys-Gly-Gly. Histon H2B₍₂₎ [55] w N-końcowym regionie zawiera powtarzający się pentapeptyd mający dwie reszty aminokwasów zasadowych, jedną prolinę i dwa aminokwasy łamiące α -helisę. Skład aminokwasowy tego obszaru jest stosunkowo stały. W odcinku N-końcowym histonów H2B cielęcia [30], pstrąga [32], *Drosophila melanogaster* [23], mięczaka [59], zarodka jeżowca [58] występuje 26—32% wszystkich aminokwasów zasadowych, podczas gdy w histonach spermy jeżowca morskiego [54, 55] — 38—41%. Między regionem N-końcowym histonów H2B a C-końcowym rozciąga się wysoce zasadowy obszar ośmiu aminokwasów, z których większość stanowi arginina lub lizyna (u jeżowca głównie arginina). C-końcowy fragment tego białka składa się głównie z aminokwasów hydrofobowych i jest dobrze zachowany w procesie ewolucji. Różnice w C-końcowym odcinku różnych histonów H2B są związane z konserwatywnymi mutacjami punktowymi. Ewolucyjna stałość regionu C-końcowego sugeruje, że obszar ten jest wciągnięty w ważne wewnątrzcząsteczkowe interakcje stabilizujące strukturę nukleosomu. Oddziaływania histon — histon są zatem cechą bardziej konserwatywną niż interakcja regionu N-końcowego z DNA.

Cechą charakterystyczną pierwszorzędowej struktury histonów H2A [4, 34, 50, 51, 56, 64, 67] jest nagromadzenie reszt aminokwasów zasadowych w N- i C-końcowym regionie cząsteczki oraz obecność dwóch hydrofobowych regionów od pozycji 41. do pozycji 70. i od pozycji 94. do pozycji 117. (ryc. 4). Strukturalna różnorodność histonów H2A jest ograniczona do regionu N-końcowego (1—18) i C-końcowego (118—125). Centralny obszar cząsteczki (od 18. do 118. aminokwasu) jest konserwatywny ewolucyjnie. Punktowe mutacje nie zmieniają konformacji białka

HISTON H2B

		1	5	Ac	10	15	20	25																	
1/	Grasica cielęcia	NH - P	E	P	A	K	S	A	P	A	P	K													
2/	Erytrocyt ptaka /G.domesticus/	NH - P	E	P	A	K	S	A	P	A	P	K													
3/	Gr. jądrowe pstręga /S.trutta/	NH - P	E	P	A	K	S	A	P			K													
4/	Gonady mięczaka /P.granatina/	NH -		P	P	K	V	S	S	K	G	A	K												
5/	Muszka owocowa /D.melanogaster/	NH -		P	P	K	T	S	G	K	A	A	K												
6/	Sperma jeżowca morskiego /P.angulosus/(1)	NH - P	S	Q	K	S	P	T	K	R	S	P	T	K	R	S	P	Q	K	G	G				
7/	Sperma jeżowca morskiego /P.angulosus/(2)	NH - P		R	S	P	A	K	T	S	P	R	K	G	S	P	R	K	G	S	P	S	K	K	A
8/	Zarodek jeżowca morskiego /S.purpuratus/	NH -		A	P		T	A	Q	V	A	K													
9/	Sperma rozgwiezdy /M.glacialis/	NH -		P	P	K	S	G	K	G	Q	K													
10/	Orzęsek /T.pyriformis/	NH -	A	P	K	K	A	P	A	A	A	E	K												
11/	Drożdże /S.cerevisiae/	NH -	S	A	K	A	E	K	K	P	A	S	K	A	P										

		Ac	Ac	Ac																																						
	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75																																
1/		K	G	S	K	K	A	V	T	K	A	Q	K	K	D	G	K	K	R	K	R	S	R	K	E	S	Y	S	V	Y	V	Y	K	V	L	K	Q					
2/		K	G	S	K	K	A	V	T	K	T	Q	K	K	G	D	K	K	R	K	K	S	R	K	E	S	Y	S	I	Y	V	Y	K	V	L	K	Q					
3/		K	G	S	K	K	A	V	T	K	T	A	G	K	G	G	K	K	R	K	R	S	R	K	E	S	Y	A	I	Y	V	Y	K	V	L	K	Q					
4/		K	A	G	K	A	K	A	A	R	S	G	D	K	K	R	K	R	R	R	K	E	S	Y	S	I	Y	I	Y	K	V	L	K	Q								
5/		K	A	G	K	A	Q	K	N	I	T	K	T	D	K	K	K	R	R	R	K	E	S	Y	A	I	Y	I	Y	K	V	L	K	Q								
6/	K	G	G	K	G	A	K	R	G	G	K	A	G	K	R	R	R	R	G	V	Q	V	K	R	R	R	R	R	R	E	S	Y	G	I	Y	I	Y	K	V	L	K	Q
7/	S	P	K	R	G	Q	K	G	A	K	R	A	G	K	G	R	R	R	R	V	V	K	R	R	R	R	R	R	R	E	S	Y	G	I	Y	I	Y	K	V	L	K	Q
8/		K	G	S	K	K	A	V	K	G	T	K	T	A	X	G	G	K	R	N	R	K	R	K	E	S	Y	G	I	Y	I	Y	K	V	L	K	Q					
9/		K	A	G	K	A	K	G	A	P	R	S	D	K	K	R	R	R	K	R	K	E	S	Y	G	I	Y	I	Y	K	V	M	K	Q								
10/		K	V	K	K	A	P	T	T	E	K	K	N	K	K	K	R	S	E	T	F	A	I	Y	I	F	K	V	L	K	Q											
11/		A	E	K	K	P	A	A	K	T	S	T	S	T	D	G	K	K	R	S	K	A	R	K	E	T	Y	S	S	Y	I	Y	K	V	L	K	Q					

		80	85	90	95	100	105	110	115																																			
1/	V	H	P	D	T	G	I	S	S	K	A	M	G	I	M	N	S	F	V	N	D	I	F	E	R	I	A	G	E	A	S	R	L	A	H	Y	N	K	R	S	T	I	T	S
2/	V	H	P	D	T	G	I	S	S	K	A	M	G	S	M	N	S	F	V	N	D	I	F	E	R	I	A	G	E	A	S	R	L	A	H	Y	N	K	R	S	T	I	T	S
3/	V	H	P	D	T	G	I	S	S	K	A	M	G	I	M	N	S	F	V	N	D	I	F	E	R	I	A	G	E	S	S	R	L	A	H	Y	N	K	R	S	T	I	T	S
4/	V	H	P	D	T	G	V	S	S	K	A	M	S	I	M	N	S	F	V	N	D	I	F	E	R	I	A	A	E	A	S	R	L	A	H	Y	N	K	R	S	T	I	T	S
5/	V	H	P	D	T	G	I	S	S	K	A	M	S	I	M	N	S	F	V	N	D	I	F	E	R	I	A	A	E	A	S	R	L	A	H	Y	N	K	R	S	T	I	T	S
6/	V	H	P	D	T	G	I	S	S	R	A	M	S	V	M	N	S	F	V	N	D	V	F	E	R	I	A	A	E	A	G	R	L	T	T	Y	N	R	R	S	T	V	S	
7/	V	H	P	D	T	G	I	S	S	R	A	M	S	V	M	N	S	F	V	N	D	V	F	E	R	I	A	G	E	A	S	R	L	T	S	A	N	R	R	S	T	V	S	
8/	V	H	P	D	T	G	I	S	S	R	A	M	V	I	M	N	S	F	V	N	D	I	F	E	R	I	A	G	E	S	S	R	L	A	Q	Y	N	K	K	S	T	I	S	
9/	V	H	P	D	T	G	I	S	S	R	A	M	S	I	M	N	S	F	V	N	D	I	F	E	R	I	A	A	E	A	S	R	L	A	H	Y	N	K	K	S	T	I	T	S
10/	V	H	P	D	V	G	I	S	K	K	A	M	N	I	M	N	S	F	I	N	D	S	F	E	R	I	A	L	E	S	S	K	L	V	R	F	N	K	R	R	T	L	S	
11/	T	H	P	D	T	G	I	S	Q	K	S	M	S	I	L	N	S	F	V	N	D	I	F	E	R	I	A	T	E	A	S	K	L	A	A	Y	N	K	K	S	T	I	S	

	120	125	130	135	140	145	150	155	
1/	R E I Q T A V R L L L P G E L A K H A V S E G T K A V T K Y T S S K								- COOH /125/
2/	R E I Q T A V R L L L P G E L A K H A V S E G T K A V T K Y T S S K								- COOH /125/
3/	R E I Q T A V R L L L P G E L A K H A V S E G T K A V T K Y T S S K								- COOH /123/
4/	R E I Q T A V R L L L P G E L A K H A V S E G T K A V T K Y T S S K								- COOH /121/
5/	R E I Q T A V R L L L P G E L A K H A V S E G T K A V T K Y T S S K								- COOH /122/
6/	R E (V) Q T A V R L L L P G E L A K H A V S E G T K A V T K Y T (T) S (R)								- COOH /144/
7/	R E I Q T A V R L L L P G E L A K H A V S E G T K A V T K Y T (T) S (R)								- COOH /143/
8/	R E I Q T A V R L (I) L P G E L A K H A V S E G T K A V T K Y T (T) S K								- COOH /123/
9/	R E (V) Q T A V R L L L P G E L A K H A V S E G T K A V T K Y T (T) S K								- COOH /120/
10/	R E (V) Q T A V (K) L L L P G E L A (R) H A (I) S E G T K A V T K (F) S S (T) N								- COOH /120/
11/	R E I Q T A V R L (I) L P G E L A K H A V S E G T (R) A V T K Y (S) S S (T) Q A								- COOH /130/

Ryc. 3. Porównanie sekwencji aminokwasowych histonów H2B. Poszczególne sekwencje uporządkowano w taki sposób, aby uzyskać największą homologię z histonem H2B grasicy cielęcia. Podano sekwencje aminokwasowe histonów: grasicy cielęcia [30], erytrocytów ptaka *Gallus domesticus* [60], gruczołów jądrowych pstrąga *Salmo trutta* [32], gonad mięczaka *Patella granatina* [59], muszki owocowej *Drosophila melanogaster* [23], spermy jeżowca morskiego *Parechinus angulosus*₍₁₎ [54] ₍₂₎ [55], zarodka jeżowca morskiego *Strongylocentrotus purpuratus* [58], spermy rozgwiazdy *Marthasterias glacialis* [57], orzęska *Tetrahymena pyriformis* [43] oraz drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [61]. Kółkami oznakowano mutacje punktowe. W nawiasach podano długość łańcucha polipeptydowego poszczególnych histonów H2B

w tym obszarze, który zawiera głównie strukturę α i β . Sekwencja reszt 21—29 histonu H2A jest wysoce konserwatywna i wchodzi w interakcję z sekwencją 63—70 histonu H2B (ryc. 3) [19]. W histonach H2A gromad bardziej filogenetycznie oddalonych od ssaków niż ptaki obserwuje się delecje dwóch sąsiadujących reszt histydy w C-końcowym regionie tych histonów.

Na podstawie wyników badania sekwencji aminokwasowych histonów powstała koncepcja domenowej struktury tych białek. Sugerowano, że odmienność struktury poszczególnych fragmentów, tj. domen cząstek histonów musi mieć wpływ na ich odmienną funkcję w strukturze chromatyny.

STRUKTURALNE DOMENY HISTONÓW RDZENIA NUKLEOSOMU

Analiza dostępności sekwencji aminokwasowych histonów w chromatynie dla trypsyny przemawia na korzyść koncepcji ich domenowej struktury. Stwierdzono, że trawienie chromatyny erytrocytów kurczęcia trypsyną daje powtarzalny zestaw trypsynoopornych fragmentów łańcuchów polipeptydowych pochodzących z czterech histonów rdzeniowych [5—7]. Wykazano, że zarówno w histonie H3, jak i H4 regionem dostęp-

HISTON H2A		Ac				
	1	5	10	15	20	
1/ Grasicca cielęcica	Ac - S	G	R	G	K	Q G G K A R A K A K T R S S R A G
2/ Erytrocyt kurczęcia	Ac - S	G	R	G	K	Q G G K A R A K A K (S) R S S R A G
3/ Gruczoły jądrowe pstrąga	Ac - S	G	R	G	K	(T) G G K A R A K A K T R S S R A G
4/ Gonady jeżowca morskiego /P.miliaris/	Ac - S	G	R	G	K	G (A) K (G) K A K A K (S) R S S R A G
5/ Zarodek jeżowca morskiego /P.miliaris/		S	G	R	G	K (S) G K A R (T) K A K (S) R S S R A G
6/ Sperma jeżowca morskiego /P.angulosus/	Ac - S	G	R	G	K	G (A) K A (K) (G) K A K (S) R S S R A G
7/ Gonady mątwy /S.officinalis/	Ac - S	G	R	G	K	G G K (V) (K) (G) K (S) K T R S S R A G

	25	30	35	40	45	50	55	60	65
1/	L Q F P V G R V H R L L R K G N Y A E R V G A G A P V Y L A A V L E Y L T A E I L E L A G N A								
2/	L Q F P V G R V H R L L R K G N Y A E R V G A G A P V Y L A A V L E Y L T A E I L E L A G N A								
3/	L Q F P V G R V H R L L R K G N Y A E R V G A G A P V Y L A A V L E L T A E I L E L A G N A								
4/	L Q F P V G R V H R (F) L R K G N Y A (N) R V G A G A P V Y L A A V L E Y L (A) A E I L E L A G N A								
5/	L Q F P V G R V H R (F) L R K G N Y A (K) R V G (G) G A P V Y (M) A A V L E Y L T A E I L E L A G N A								
6/	L Q F P V G R V H R (F) L R K G N Y A (N) R V G A G A P V Y L A A V L E Y L (A) A E I L E L A G N A								
7/	L Q F P V G R (I) H R L L R K G N Y A (Q) R V G A G A P V Y L A A V (M) E Y L (A) A E (V) L E L A G N A								

	70	75	80	85	90	95	100	105	110
1/	A R D N K K T R I I P R H L Q L A I R N D E E L N K L L G K V T I A Q G G V L P N I Q A								
2/	A R D N K K T R I I P R H L Q L A I R N D E E L N K L L G K V T I A Q G G V L P N I Q A								
3/	A R D N K K T R I I P R H L Q L A (V) R N D E E L N K L L G (G) V T I A Q G G V L P N I Q A								
4/	A R D N K K T R I I P R H L Q L A I R N D E E L N K L L G (G) V T I A Q G G V L P N I Q A								
5/	A R D N K K (S) R I I P R H L Q L A (V) R N D E E L N K L L G (G) V T I A Q G G V L P N I Q A								
6/	A R D N K K T R I I P R H L Q L A I R N D E E L N K L L G (G) V T I A Q G G V L P N I Q A								
7/	A R D N K K (S) R I I P R H L Q L A I R N D E E L N K L L (S) (G) V T I A Q G G V L P N I Q A								

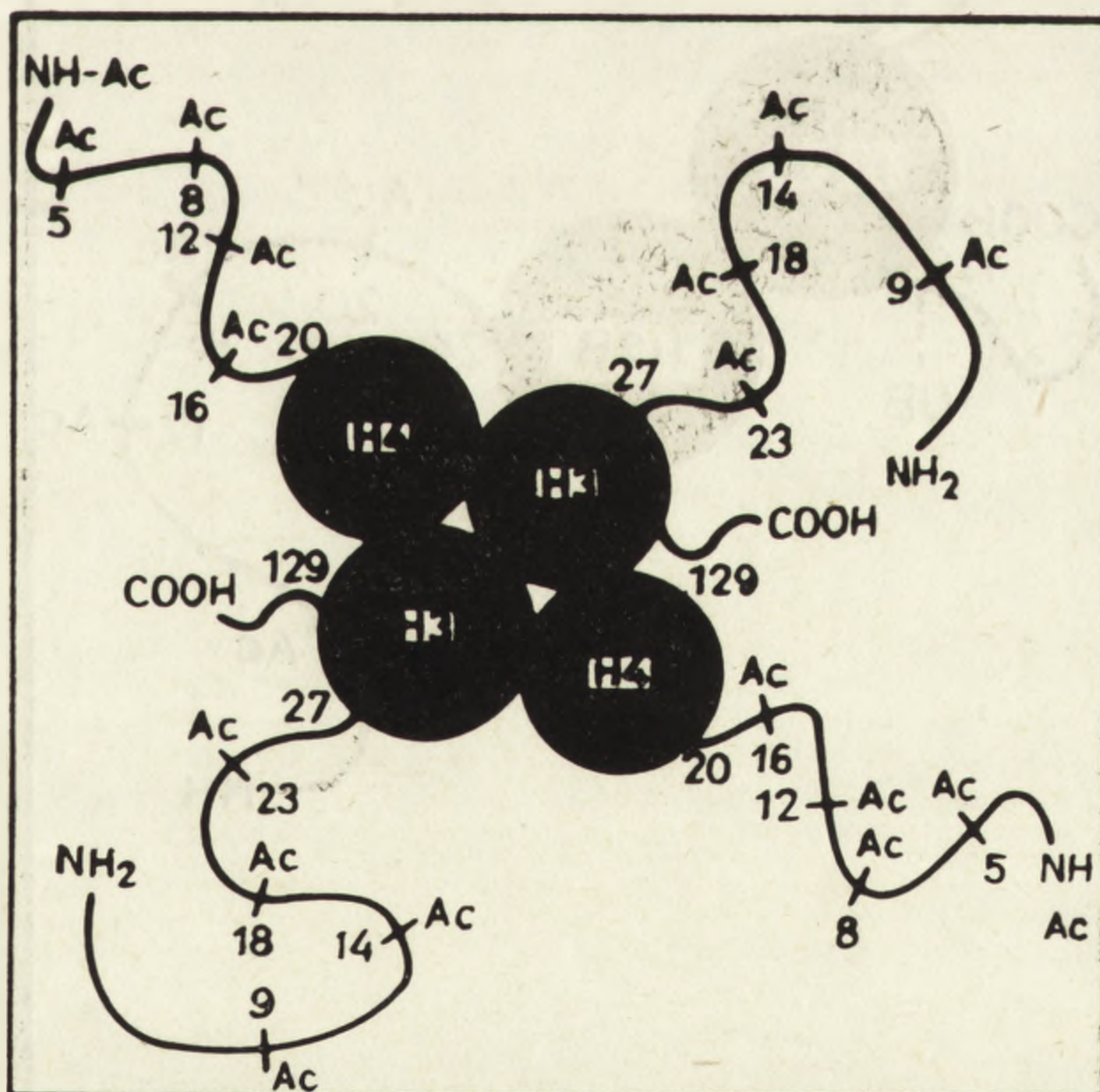
	115	120	125	130
1/	V L L P K K T E S H H K A K	G K - COOH /129/		
2/	V L L P K K T (D) S H	K A K (A) K - COOH /128/		
3/	V L L P K K T E	K A K V (A) K - COOH /125/		
4/	V L L P K K T (G) S	K (S) (S) K - COOH /125/		
5/	V L L P K K T (G)	K (S) (S) - COOH /123/		
6/	V L L P K K T (G) S	K (S) (S) K - COOH /125/		
7/	V L L P K K T (Q)	K A (A) K - COOH /124/		

ubikwityna

Ryc. 4. Porównanie sekwencji aminokwasowych histonów H2A. Poszczególne sekwencje uporządkowano w taki sposób, aby uzyskać największą homologię z histonem H2A grasicy cielęcica. Podano sekwencje aminokwasowe histonów: grasicy cielęcica [50], erytrocytów kurczęcia [34], gruczołów jądrowych pstrąga [4], gonad [67] i zarodka [51] jeżowca morskiego *Psammechinus miliaris*, spermy jeżowca morskiego *Parechinus angulosus* [56] oraz gonad mątwy *Sepia officinalis* [64]. Kółkami oznakowano mutacje punktowe. W nawiasach podano długość łańcucha polipeptydowego poszczególnych histonów H2A.

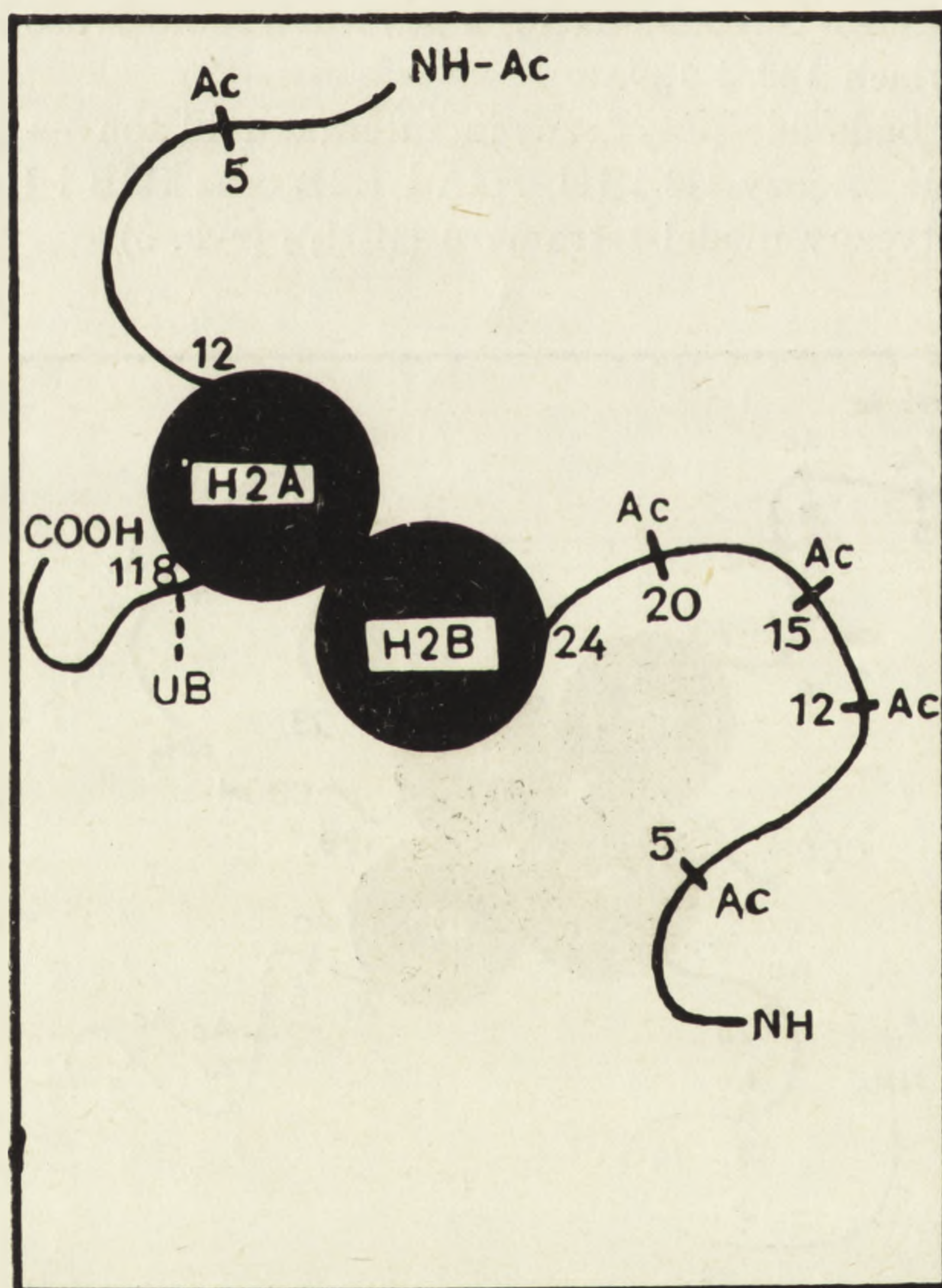
nym dla trypsyny jest odcinek N-końcowy, a w histonie H3 również sześć reszt aminokwasowych odcinka C-końcowego [5]. Peptydem granicznym histonu H4 chronionym przed działaniem trypsyny jest fragment od 18. lub 20. aminokwasu do 102., natomiast w histonie H3 — fragment od 27. do 129. aminokwasu. Porównując te dane z zestawem sekwencji aminokwasowych histonów H4 i H3 (ryc. 1 i 2) okazuje się, że regiony wrażliwe na działanie trypsyny stanowią granicę między bardzo zasadowymi N-końcowymi domenami, które zawierają wszystkie potranslacyjne miejsca acetylacji, a bardziej hydrofobowymi sekwencjami, które rozciągają się przez pozostałą część cząsteczek. Analiza sekwencji histonu H3 nie daje żadnego argumentu tłumaczącego, dlaczego trypsyna trawi fragment C-końcowego regionu histonu H3, skoro region ten jest podobnie konserwatywny jak pozostała C-końcowa domena. Jednym z możliwych wyjaśnień tego zjawiska jest to, że mimo zwinienia tej części łańcucha polipeptydowego jest on bardzo wyeksponowany i możliwe jest szybkie odcięcie sześciu aminokwasów przy parze arginin w pozycjach 128. i 129.

W wyniku badania specyficznych interakcji histon — histon, które zachodzą głównie między H3 i H4, H2A i H2B oraz H2B i H4 [15] przedstawiono hipotetyczny model tetrameru $(H_3H_4)_2$ (ryc. 5).



Ryc. 5. Tetramer histonów argininowych $(H_3 - H_4)_2$ z uwidocznionymi trypsynodostępnymi domenami [5], Ac — miejsca acetylacji

Analiza peptydu histonu H2B uzyskanego po trawieniu chromatyny trypsyną wykazała, że trypsyna trawi odcinek N-końcowy tego histonu tylko do granicy między konserwatywnymi i niekonserwatywnymi domenami [6]. Ośmioaminokwasowy zasadowy region w pozycjach 55—62 nie jest cięty przez trypsynę mimo jego wysokiej zasadowości, co pozostaje w zgodzie z sugestią, że chronionym regionem histonu H2B jest raczej ten, który ma konserwatywną sekwencję niż ten, który ma mniejszą zasadowość. Można przypuszczać, że osiem zasadowych reszt histonu H2B przyłącza się ściśle do nukleosomowego DNA i jest to jeden z głównych bloków histonu H2B przyłączających się do DNA. Testowanie dostępności aminokwasów histonu H2A w jądrach erytrocytów kurczęcia za pomocą trypsyny wykazało, że głównym peptydem opornym na działanie tego enzymu jest peptyd od 12. do 118. aminokwasu [7]. W badaniach sekwencji histonu H2A udokumentowano, że zawiera on trzynaś-



Ryc. 6. Dimer histonów umiarkowanie lizynowych H2A - H2B z uwidocznionymi trypsynodostępnymi domenami [6], Ac — miejsca acetytacji, UB — miejsca przyłączenia ubikwityny w białku A24

cie reszt aminokwasów zasadowych (Arg i Lys) w regionie od 1. do 42. aminokwasu (30%). Żadnego zasadowego aminokwasu nie ma między 43. i 70. resztą. Następnie między 71. a 99. resztą obserwuje się drugie zagęszczenie aminokwasów zasadowych (28%), za którym rozciąga się obszar 18-aminokwasowy pozbawiony aminokwasów zasadowych. C-końcowy 11-aminokwasowy odcinek zawiera pięć zasadowych aminokwasów. Działanie trypsyny na histon H2A nie jest zatem skorelowane z liczbą reszt zasadowych, ponieważ region między 71. a 99. aminokwasem pozostaje nienaruszony, a N-końcowa sekwencja od 1. do 42. aminokwasu jest cięta przez enzym do pewnego dobrze określonego punktu, tj. tylko do 1/4 długości tego odcinka. Trawienie dziesięciu C-końcowych reszt koreluje z nagromadzeniem w tym regionie aminokwasów zasadowych. Uderzający jest fakt, że eksponowane wiązanie między lizynami w pozycjach 118. i 119. jest usytuowane w precyzyjnym punkcie przyłączenia ubikwityny do histonu H2A przy lizynie 119. Trypsynodostępne domeny histonowego dimeru H2A—H2B prezentuje diagram (ryc. 6). Böhm i wsp. [5—7] sugerują, że trypsynodostępne domeny histonów H4, H3, H2B i H2A są ułożone zewnętrznie w stosunku do rdzenia nukleosomu i mają najprawdopodobniej odmienną konformację w porównaniu z oporną i wysoce konserwatywną domeną zlokalizowaną wewnątrz zwojów DNA cząstki rdzeniowej. Uwagę zwraca fakt, że granice trawienia N-końcowych domen histonów H4 i H3 są prawdopodobnie wyznaczone przez miejsca silnej metylacji (reszta 20. w H4 i 27. w H3). Można zatem sądzić, że wzrost zasadowości lizyny pomaga w zakotwiczeniu łańcucha histonowego wychodzącego na zewnątrz zwojów DNA. Ponadto wymagana prawdopodobnie dostępność pełnej sekwencji N-końcowych regionów dla acetylotransferaz sugeruje również, że obszary te muszą być wyeksponowane, o odmiennej konformacji i lokalizacji w stosunku do pozostałych części cząsteczek [5].

Zasadniczym pytaniem wpływającym z przedstawionych badań jest czy N-terminalne domeny odgrywają rolę na poziomie rdzenia nukleosomu, czy na poziomie solenoidu. Różnice w długości i sekwencji N-terminalnych domen H2B sugerują, że mogą one brać udział w kontroli struktury solenoidu, a także być wciągnięte w określenie długości łącznikowego DNA. Wydłużony N-końcowy region histonu H2B spermy jeźowca jest prawdopodobnie skorelowany ze zwiększeniem długości łącznikowego DNA w tej tkance [68]. Trawienie chromatyny i rdzeni nukleosomów trypsyną przeprowadzone przy wysokich stężeniach soli, przy których białko oddysocjowuje od DNA, dawało takie same produkty trawienia jak w przypadku trawienia kompleksu, co sugeruje, że niedostępność C-końcowego fragmentu jest głównie spowodowana konformacją histonów, a nie połączeniem z DNA.

Badania immunochemiczne stanowią najbardziej specyficzny sposób określania dostępności histonów na powierzchni chromatyny. Może być ona ujawniona za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko determinantom antygenowym (epitopom) cząsteczek histonów. Badania, w których chromatyna była użyta jako immunoabsorbent wykazały, że większość miejsc antygenowych, tych które są rozpoznawane w wydzielonych histonach rdzenia nukleosomu, jest zamaskowana w chromatynie. Szczególnie dotyczy to determinant histonów H2A, i H4, podczas gdy determinanty histonu H1 i H2B są względnie dostępne [24, 28]. Dostępność pewnych miejsc antygenowych histonów H2B w nukleosomach — w roztworach o niskiej sile jonowej — zademonstrowano przez pomiar specyficznego wzrostu szybkości sedymentacji nukleosomów po ich inkubacji z oczyszczonymi przeciwciałami anti-H2B [1]. Wartość eksperymentów immunologicznych podniesiono przez użycie przeciwciał skierowanych przeciwko N-terminalnemu (1—58) i C-terminalnemu (63—125) fragmentowi histonu H2B do pomiaru dostępności tych dwóch odcinków cząsteczki H2B w natywnej chromatynie [20, 21].

Analiza immunoabsorpcji wykazała znaczne różnice w absorpcji przeciwciał skierowanych przeciwko dwóm połówkom histonu H2B. Przeciwciała przeciwko N-końcowemu fragmentowi (1—58) były łatwo absorbowane przez chromatynę przy niskiej sile jonowej (1 mM Tris-HCl). W 0,14 M roztworze NaCl determinanty N-końcowego regionu histonu H2B były również dostępne, jakkolwiek więcej chromatyny było potrzeba do prawie całkowitej absorpcji przeciwciał. Wskazuje to na fakt, że pewien fragment determinant odcinka (1—58) histonu H2B jest w tych warunkach zamaskowany. W przeciwieństwie do powyższych wyników nie obserwowano żadnej absorpcji przeciwciał anti-(63—125) przez chromatynę w 0,14 M roztworze NaCl i bardzo niską absorpcję w niskiej sile jonowej (1 mM Tris-HCl). Przeprowadzone badania immunofluorescencji wykazały, że immunofluorescencję dawały jedynie przeciwciała anti-(1—58). Ten sam wynik obserwowano na poziomie ultrastruktury w badaniach immunoelektronowej mikroskopii. Uzyskane rezultaty sugerują, że N-końcowa część histonu H2B jest dostępna w chromatynie w serologicznie reaktywnej konformacji podobnej do tej w wyizolowanym histonie H2B. C-końcowa część tego białka jest zamaskowana przez interakcje histon — histon. Stwierdzono również [21], że reakcja z surowicą anti-(1—58) odzwierciedla zmiany ewolucyjne zachodzące w regionie 1—34 histonu H2B, co nasuwa przypuszczenie, że przynajmniej pewne z determinant antygenowych znajdują się w tym regionie lub są od niego zależne.

Ostatnio Muller i wsp. [41] wykazali, że C-końcowy sześćiopeptyd histonu H3 erytrocytów kury (reszty 130—135) IRGERA (Ile-Arg-Gly-

Glu-Arg-Ala), mający tę samą aktywność antygenową co 15-aminokwasowy C-terminalny fragment, jest zlokalizowany na powierzchni podjednostki chromatyny. Stwierdzenie, że C-końcowa część histonu H3 znajduje się w powierzchniowej warstwie rdzenia nukleosomu sugeruje, że ten 6-aminokwasowy odcinek stanowi wolny fragment nie wciągnięty w tworzenie kompleksu z histonami. Sugestia ta pozostaje w zgodzie z wynikami badań jądrowego rezonansu magnetycznego kompleksów histonowych, które wykazały, że piętnaście reszt aminokwasowych C-końcowego fragmentu histonu H3 nie jest zaangażowanych w tworzenie kompleksu H3-H4 [8], a także badaniami dostępności sześciu C-końcowych aminokwasów histonu H3 dla trypsyny [5]. Z uwagi na stabilność ewolucyjną histonu H3 i spełnianie centralnej roli tetrameru $(H_3H_4)_2$ w opakowaniu DNA w nukleosomopodobnej strukturze, antygenowa determinanta IRGERA może być uważana za jedną z najbardziej uniwersalnych.

Pomimo ograniczonej ilości informacji dotyczących molekularnej struktury determinant antygenowych znalezionych na powierzchni podjednostki chromatyny można sądzić, że przeciwciała przeciwko histonom są czułym narzędziem do analizy jej powierzchni, a także wykrywania konformacyjnych zmian, które mogą być rezultatem zmian w interakcjach histon — histon oraz DNA — histon. Porównując natywne, reasocjowane i rekonstruowane cząstki rdzeniowe erytrocytów kury nie stwierdzono żadnych różnic między tymi trzema typami cząstek rdzeniowych ani za pomocą mikroskopii elektronowej, diachroizmu kołowego, ani immunologicznej analizy przeciwciał przeciwko histonom: H2B, H2A i H3 [40]. Natomiast rezultaty badań rekonstruowanych cząstek rdzeniowych zawierających nieacetylowane histony H3, H2A, H2B oraz mono-, di- lub triacetylowane histony H4 izolowane z gruczołów jądrowych mątki sugerowały, że obecność acetylowanego histonu H4 w obrębie cząstki rdzeniowej prowadzi do konformacyjnych zmian powodujących zmianę dostępności epitopów szeregu histonów obecnych na powierzchni podjednostki chromatyny. Użycie do rekonstrukcji di- i triacetylowanego histonu H4 jest przyczyną znacznego progresywnego zmniejszenia się przyłączania do cząstki rdzeniowej przeciwciał swoistych dla histonu H3 i peptydu IRGERA. Triacetylowany histon H4 gruczołów jądrowych mątki, użyty do rekonstrukcji, zawiera w pozycjach 5., 12. i 16. zmodyfikowane reszty lizyny [65] powodujące lokalne obniżenie dodatniego ładunku, co prawdopodobnie indukuje w cząstce rdzeniowej zmiany konformacyjne, które sterycznie uniemożliwiają przyłączenie przeciwciał przeciwko IRGERA. Konformacyjne zmiany wywołane obecnością acetylowanego histonu H4 w cząstce rdzeniowej powodują również obniżenie przyłączania przeciwciał anty-H2A, ale mają mniejszy wpływ na przyłączanie przeciwciał anty-H2B. Najmniejszy efekt

acetylacji histonu H4 na przyłączenie przeciwciał anty-H2B może odzwierciedlać fakt, że histon H2B jest najbardziej dostępnym i immunoreaktywnym histonem w rdzeniu nukleosomu.

Przedstawione linie dowodowe potwierdzają słuszność koncepcji, że histony są białkami mającymi więcej niż jedną strukturalną domenę.

UDZIAŁ FRAGMENTÓW N-KOŃCOWYCH HISTONÓW RDZENIA NUKLEOSOMU W STRUKTURZE CHROMATYNY

Odrębność N-końcowych regionów histonów rdzenia nukleosomu jako oddzielnych domen jest potwierdzona przez fakt, że odgrywają one tylko niewielką rolę w tworzeniu rdzenia nukleosomu [35, 62, 63].

W końcu lat siedemdziesiątych postawiono hipotezę udziału N-końcowych regionów histonów rdzeniowych w stabilizacji i modulacji wyższego rzędu struktury chromatyny [38, 63]. Jest to hipoteza bardzo atrakcyjna, bowiem acetylacja tych histonów *in vivo* mogłaby modyfikować superstrukturę chromatyny tak, aby czynić ją aktywną i zdolną do transkrypcji. W eksperymentalnym testowaniu tej hipotezy Allan i wsp. [2] użyli polinukleosomów pozbawionych histonu H1, które ponownie łączono z histonem H1 po ich trawieniu trypsyną (usunięcie N-końcowych fragmentów histonów rdzeniowych). Analizy za pomocą współczynnika sedymentacji, dichroizmu kołowego i mikroskopii elektronowej wykazały, że łańcuch polinukleosomalny pozbawiony terminalnych odcinków histonów rdzenia pozostaje niezwinęty nawet w obecności histonu H1, odgrywającego najważniejszą rolę w utrzymaniu struktury solenoidu. Stąd można wnioskować, że końcowe domeny histonów są rzeczywiście niezbędne do tworzenia solenoidu. Możliwość zastąpienia końcowych fragmentów histonów rdzeniowych w tworzeniu solenoidu przez obce zasadowe peptydy świadczy o niespecyficznym mechanizmie stabilizacji solenoidu. Kilka obcych peptydów mogłoby spełniać funkcję dwunastu fragmentów: ośmiu pochodzących z odcinków N-końcowych i czterech — z odcinków C-końcowych histonów rdzeniowych [5—7]. Sugeruje się, że rozciągnięte odcinki N-terminalne histonów cząstki rdzeniowej mogłyby łączyć ze sobą sąsiednie zwoje solenoidu. Przy obecnym stanie wiedzy nie ma żadnego dowodu świadczącego o proteolizie fragmentów końcowych histonów *in vivo*, chociaż identyfikowano proteazy związane z chromatyną, specyficzne dla poszczególnych histonów [9, 22]. Gdyby utrata struktury wyższego rzędu mogła być związana tylko z jednym histonem, enzymy te pełniłyby ważną rolę w strukturze chromatyny. Obecnie uważa się, że acetylacja może odgrywać ważną rolę w odwracalnej kondensacji chromatyny. Jest dobrze udokumentowana korelacja między acetylacją a aktywnością transkrypcyjną chromatyny

[3, 52]. W histonach H3, H4 i H2B w N-końcowym trypsynolabilnym odcinku zlokalizowane są cztery miejsca acetylacji, natomiast w H2A — jedno. Potencjalna możliwość zmiany ładunku przez acetylację dwudziestu sześciu reszt lizyn z ogólnej liczby czterdziestu dwu występujących w N-końcowych odcinkach histonów każdego rdzenia nukleosomu mogłaby prowadzić do zmian w strukturze chromatyny i czynić ją dostępną dla polimerazy RNA. Usuwanie odcinków N-końcowych histonów przez proteolizę za pomocą trypsyny *in vitro* mogłoby być analogiczne do tego wewnątrzkomórkowego zjawiska. Praca Cary'ego i wsp. [13] nad przyłączeniem peptydów z N-końcowej domeny histonu H4 do DNA i wpływem chemicznej acetylacji lizyn na to przyłączenie należy do pionierskich w tym zagadnieniu. Interakcję DNA z trzema peptydami histonu H4 o wzrastającej długości: reszty 4 — 17; 1 — 23; 1 — 37 badano w szerokim zakresie siły jonowej metodą wysoce rozdzielczej spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego. Wykazano, że seria N-końcowych peptydów histonu H4 (4 — 17); (4 — 23); (1 — 37) przyłącza się do DNA ze wzrastającą siłą. Ze zmian widm można stwierdzić, że resztami najbardziej zaangażowanymi w interakcję peptydów z DNA są: glicyna, arginina i w mniejszym stopniu lizyna. Reszty glicyny warunkują fakt, że w interakcji z DNA bierze udział szkielet peptydowy (za pomocą wiązania wodorowego). Obecność ośmiu reszt glicyny — aminokwasu destabilizującego strukturę II-rzędową — w obrębie szesnastu reszt badanych peptydów sugeruje, że region histonu H4 wchodzi w interakcję z DNA w formie rozciągniętego łańcucha. Reszty glicyny mogłyby być ułożone w następujący sposób: glicyna 2., 4., 6. i 14. po jednej stronie rozciągniętego łańcucha i wtedy glicyna 7., 9., 11. i 13. po drugiej stronie. Acetylacja czterech reszt lizyny w pozycji 5., 8., 12. i 16. powoduje całkowitą utratę przyłączenia peptydów do DNA, co podtrzymuje dawne sugestie, że jest to rzeczywista funkcja postsyntetycznych modyfikacji *in vivo*.

W świetle przedstawionych badań konieczne jest unowocześnienie oryginalnego modelu cząstki rdzeniowej zaproponowanego przez Kornberga [33]. Zakładał on, że rdzeń białkowy jest całkowicie zbity, na jego powierzchni leży większość lizyn i arginin, potencjalnych miejsc połączeń z DNA. Obecnie uważa się, że dwanaście fragmentów oktameru histonowego szczególnie dostępnych w chromatynie nie związa się w formę ścisłego rdzenia, lecz jest ułożonych na zewnątrz kompleksu.

Składam najserdeczniejsze podziękowania prof. dr hab. L. Kłyszejko-Stefanowicz za cenne uwagi w czasie opracowywania tego artykułu.

LITERATURA

- [1] ABSOLOM D., Van REGENMORTEL M. H. V., Nucleosome structure studied with purified antibodies to histones H2B, H3 and H4, *FEBS Letters*, **85**: 61—64, 1978.
- [2] ALLAN J., HARBORNE N., RAU D. C., GOULD H., Participation of core histone „tails” in the stabilization of the chromatin solenoid, *J. Cell. Biol.*, **93**: 285—297, 1982.
- [3] ALLFREY V. G., Post-synthetic modifications of histone structure: a mechanism for the control of chromosome structure by the modulation of histone-DNA interactions, [w:] *Chromatin and chromosome structure*, red. LI H. J., Eckardt R. A., Academic Press, New York 1977, 167—191.
- [4] BAILEY G. S., DIXON G. H., Histone II b₁ from rainbow trout. Comparison amino acid sequence with calf thymus II b₁, *J. Biol. Chem.*, **248**: 5463—5472, 1973.
- [5] BÖHM L., BRIAND G., SAUTIÈRE P., CRANE-ROBINSON C., Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of the limit peptides of histones H3 and H4, *Eur. J. Biochem.*, **119**: 67—74, 1981.
- [6] BÖHM L., BRIAND G., SAUTIÈRE P., CRANE-ROBINSON C., Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of limit peptides from histone H2B, *Eur. J. Biochem.*, **123**: 299—303, 1982.
- [7] BÖHM L., CRANE-ROBINSON C., SAUTIÈRE P., Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of a limit peptides of histone H2A, *Eur. J. Biochem.*, **106**: 525—530, 1980.
- [8] BÖHM L., HAYASHI H., CARY P. D., MOSS T., CRANE-ROBINSON C., BRADBURY E. M., Sites of histone/histone interaction in the H3-H4 complex, *Eur. J. Biochem.*, **77**: 487—493, 1977.
- [9] BRANDT W. F., BÖHM L., Von HOLT C., Proteolytic degradation of histones and site of cleavage in histone F2a1 and F3, *FEBS Letters*, **51**: 88—93, 1975.
- [10] BRANDT W. F., PATTERSON K., Von HOLT C., The histones of yeast, The isolation and partial structure of the core histones, *Eur. J. Biochem.*, **110**: 67—76, 1980.
- [11] BRANDT W. F., Von HOLT C., The determination of the primary structure of histone F3 from chicken erythrocytes by automatic Edman degradation, *Eur. J. Biochem.*, **46**: 407—417, 419—429, 1974.
- [12] BRANDT W. F., Von HOLT C., The primary structure of yeast histone H3, *Eur. J. Biochem.*, **121**: 501—510, 1982.
- [13] CARY P. D., CRANE-ROBINSON C., BRADBURY E. M., DIXON G. H., Effect of acetylation on the binding of N-terminal peptides of histone H4 to DNA, *Eur. J. Biochem.*, **127**: 137—143, 1982.
- [14] COMPTON J. L., BELLARD M., CHAMBON P., Biochemical evidence of variability in the DNA repeat length in the chromatin of higher eukaryotes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 4383—4386, 1976.
- [15] D'ANNA J. A. Jr., ISENBERG I., A histone cross-complexing pattern, *Biochemistry*, **13**: 4992—4997, 1974.
- [16] De LANGE R. J., FAMBROUGH D. M., SMITH E. L., BONNER J., Calf and pea histone IV. II. The complete amino acid sequence of calf thymus histone IV; presence of ϵ -N-acetyllysine, *J. Biol. Chem.*, **244**: 319—334, 1969.

- [17] De LANGE R. J., FAMBROUGH D. M., SMITH E. L., BONNER J., Calf and pea histone IV. III. Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV. Comparison with the homologous calf thymus histone, *J. Biol. Chem.*, **244**: 5669—5679, 1969.
- [18] De LANGE R. J., HOOPER J. A., SMITH E. L., Complete amino-acid sequence of calf thymus histone III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 882—884, 1972.
- [19] De LANGE R. J., WILLIAMS L. C., MARTINSON H. G., Identification of interacting amino acids at the histone 2A - 2B binding site, *Biochemistry*, **18**: 1942—1946, 1979.
- [20] Di PADUA MATHIEU D., MURA C. V., FRADO L. L. Y., WOODCOCK Ch. L. F., STOLLAR B. D., Differing accessibility in chromatin of the antigenic sites of regions 1—58 and 63—125 of histone H2B, *J. Cell. Biol.*, **91**: 135—141, 1981.
- [21] Di PADUA MATHIEU D., STOLLAR B. D., Antibodies specific for histone H2B fragments 1—58 and 63—125 in antisera to H2B and to the fragments: Probes for histone evolution, *Biochemistry*, **19**: 2246—2252, 1980.
- [22] EICKBUSH T. H., WATSON D. K., MOUDRIANAKIS E. N., A chromatin-bound proteolytic activity with unique specificity for histone H2A, *Cell*, **9**: 785—792, 1976.
- [23] ELBIN S. C. R., SCHILLING J., HOOD L. E., Sequence of histone 2B of *Drosophila melanogaster*, *Biochemistry*, **18**: 5679—5685, 1979.
- [24] FELDMAN L., STOLLAR B. D., Serological analysis of the H3 - H4 histone complex, *Biochemistry*, **16**: 2767—2771, 1977.
- [25] FELSENFELD G., Chromatin, *Nature*, **271**: 115—122, 1978.
- [26] FRONK J., Struktura nukleosomu, *Post. Biochem.*, **26**: 77—103, 1980.
- [27] GLOVER C. V. C., GOROVSKY M. A., Amino-acid sequence of *Tetrahymena* histone H4 differs from that of higher eukaryotes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 585—589, 1979.
- [28] GOLDBLATT D., BUSTIN M., Exposure of histone antigenic determinants in chromatin, *Biochemistry*, **14**: 1689—1695, 1975.
- [29] HAYASHI T., OHE Y., HAYASHI H., IWAI K., Human spleen histone H4. Isolation and amino acid sequence, *J. Biochem.*, **92**: 1995—2000, 1982.
- [30] HNILICA L. S., KAPPLER H. A., JORDAN J. J., Assymetry in the distribution of basic amino acid residues in the moderately lysine-rich histone F2b from calf thymus, *Experientia*, **26**: 353—35, 1970.
- [31] JERZMANOWSKI A., STAROŃ K., TYNIEC B., BERNHARDT-ŚMIGIELSKA J., TOCZKO K., Subunit structure of *Physarum polycephalum* chromatin, *FEBS Letters*, **62**: 251—254, 1976.
- [32] KOOTSTRA A., BAILEY G. S., Primary structure of histone H2B from trout (*Salmo trutta*) testes, *Biochemistry*, **17**: 2504—2510, 1978.
- [33] KORNBERG R. D., Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA, *Science*, **184**: 868—871, 1974.
- [34] LAINE B., KMIECIK D., SAUTIERE P., BISERTE G., Primary structure of chicken erythrocyte histone H2A, *Biochimie (Paris)*, **60**: 147—150, 1978.
- [35] LILLEY D. M. J., TATCHELL K., Chromatin core particle unfolding induced by tryptic cleavage of histones, *Nucleic Acids Res.*, **4**: 2039—2055, 1977.
- [36] LIPPS H. J., MORRIS N. R., Chromatin structure in the nuclei of the ciliate *Stylonychia mytilus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**: 230—234, 1977.
- [37] MAGNAVAL R., VALENCIA R., PAOLETTI J., Subunit organization of *Euglena* chromatin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**: 1415—1421, 1980.

- [38] MCGHEE J. D., FELSENFELD G., Nucleosome structure, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**: 1115—1156, 1980.
- [39] MORRIS N. R., Nucleosome structure in *Aspergillus nidulans*, *Cell*, **8**: 357—363, 1976.
- [40] MULLER S., ERARD M., BURGGRAF E., COUPPEZ M., SAUTIERE P., CHAMPAGNE M., Van REGENMORTELM. H. V., Immunochemical detection of changes in chromatin subunits induced by histone H4 acetylation, *EMBO J.*, **1**: 939—944, 1982.
- [41] MULLER S., HIMMELSPACH K., Van REGENMORTELM. H. V., Immunochemical localization of the C-terminal hexapeptide of histone H3 at the surface of chromatin subunits, *EMBO J.*, **1**: 421—425, 1982.
- [42] NOLL M., Differences and similarities in chromatin structure of *Neurospora crassa* and higher eukaryotes, *Cell*, **8**: 349—355, 1976.
- [43] NOMOTO M., HAYASHI H., IWAI K., *Tetrahymena* histone H2B. Complete amino acid sequence, *J. Biochem.*, **91**: 897—904, 1982.
- [44] OHE Y., IWAI K., Human spleen histone H3. Isolation and amino acid sequence, *J. Biochem.*, **90**: 1205—1211, 1981.
- [45] PARISH R. W., STALDER J., SCHMIDLIN S., Biochemical evidence for a DNA repeat length in the chromatin of *Dictyostelium discoideum*, *FEBS Letters*, **84**: 63—66, 1977.
- [46] PATTHY L., SMITH E. L., JOHNSON J., Histone III. V. The amino acid sequence of pea embryo histone III, *J. Biol. Chem.*, **248**: 6834—6840, 1973.
- [47] PRINCE D. J., CUMMINGS D. J., SEALE R. L., Analysis of chromatin repeat units in logarithmically and stationary growing cells of *Paramecium aurelia* and *Tetrahymena pyriformis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**: 190—197, 1977.
- [48] RIZZO P. J., Basic chromosomal proteins in lower eukaryotes: relevance to the evolution and function of histones, *J. Molec. Evolut.*, **8**: 79—94, 1976.
- [49] SAUTIERE P., LAMBELIN-BREYNAERT M. D., MOSCHETTO Y., BISERTE G., Histone riche en glycine et en arginine du thymus de Porc: étude des peptides tryptiques et séquence complète, *Biochimie (Paris)*, **53**: 711—715, 1971.
- [50] SALTIERE P., TYROU D., LAINE B., MIZON J., RUFFIN P., BISERTE G., Covalent structure of calf thymus ALK-histone, *Eur. J. Biochem.*, **41**: 563—576, 1974.
- [51] SCHAFFNER W., KUNZ G., DAETWYLER H., TELFORD J., SMITH H., O., BIRNSTIEL M. L., Genes and spacers of cloned sea urchin histone DNA analyzed by sequencing, *Cell*, **14**: 655—671, 1978.
- [52] SPERLING R., WACHTEL E. J., The histones, [w:] *Advances in Protein Chemistry*, Vol 34, red. Anfinsen C. B., Edsall J. T., Richards F. M., Academic Press Inc., 1981, 1—60.
- [53] STRICKLAND M., STRICKLAND W. N., BRANDT W. F., Von HOLT C., Sequence of the cysteine containing portion of histone F2a1 from the sea urchin *Parachinus angulosus*, *FEBS Letters*, **40**: 346—348, 1974.
- [54] STRICKLAND M., STRICKLAND W. N., BRANDT W. F., Von HOLT C., The complete amino-acid sequence of histone H2B₍₁₎ from sperm of the sea urchin *Parachinus angulosus*, *Eur. J. Biochem.*, **77**: 263—275, 1977.
- [55] STRICKLAND W. N., STRICKLAND M., BRANDT W. F., Von HOLT C., The complete amino-acid sequence of histone H2B₍₂₎ from sperm of the sea urchin *Parachinus angulosus*, *Eur. J. Biochem.*, **77**: 277—286, 1977.

- [56] STRICKLAND W. N., STRICKLAND M. S., De GROOT P. C., Von HOLT C., The primary structure of histone H2A from the sperm cell of the sea urchin *Parechinus angulosus*, Eur. J. Biochem., **109**: 151—158, 1980.
- [57] STRICKLAND M. S., STRICKLAND W. N., Von HOLT C., The histone H2B from the sperm cell of the starfish *Marthasterias glacialis*, Eur. J. Biochem., **106**: 541—548, 1980.
- [58] SURES I., LOWRY J., KEDES L. H., The DNA sequence of sea urchin (*S. purpuratus*) H2A, H2B and H3 histone coding and spacer regions, Cell, **15**: 1033—1044, 1978.
- [59] Van HELDEN P. D., STRICKLAND W. N., BRANDT W. F., Von HOLT C., The complete amino-acid sequence of histone H2B from the mollusc *Patella granatina*, Eur. J. Biochem., **93**: 71—78, 1979.
- [60] Van HELDEN P. D., STRICKLAND W. N., STRICKLAND M., Von HOLT C., The complete amino-acid sequence of histone H2B from erythrocytes of the adult domestic fowl *Gallus domesticus*, Biochim. Biophys. Acta, **703**: 17—20, 1982.
- [61] WALLIS J. W., HEREFORD L., GRUNSTEIN M., Histone H2B genes of yeast encode two different proteins, Cell, **22**: 799—805, 1980.
- [62] WHITLOCK J. P., Jr. SIMPSON R. T., Localization of the sites along nucleosome DNA which interact with NH₂-terminal histone regions, J. Biol. Chem., **252**: 6516—6520, 1977.
- [63] WHITLOCK J. P., Jr. STEIN A., Folding of DNA by histones which lack their NH₂-terminal regions, J. Biol. Chem., **253**: 3857—3861, 1978.
- [64] WOUTERS-TYROU D., MARTIN-PONTHIEU A., BRIAND G., SAUTIÈRE P., BISERTE G., The amino-acid sequence of histone H2A from cuttlefish *Sepia officinalis*, Eur. J. Biochem., **124**: 489—498, 1982.
- [65] WOUTERS-TYROU D., MARTIN-PONTHIEU A., SAUTIÈRE P., BISERTE G., Acetylation of histone H4 in chicken erythrocyte and cuttle-fish testis testis chromatin, FEBS Letters, **128**: 195—200, 1981.
- [66] WOUTERS-TYROU D., SAUTIÈRE P., BISERTE G., Covalent structure of the sea urchin histone H4, FEBS Letters, **65**: 225—228, 1976.
- [67] WOUTERS D., SAUTIÈRE P., BISERTE G., Primary structure of histone H2A from gonad of the sea urchin *Psammechinus miliaris*, Eur. J. Biochem., **90**: 231—239, 1978.
- [68] ZALENSKAYA I. A., POSPELOV V. A., ZALENSKY A. O., VOROB'EV V. I., Nucleosomal structure of sea urchin and starfish sperm chromatin. Histone H2B is possibly involved in determining the length of linker DNA, Nucleic Acids Res., **9**: 473—489, 1981.

Otrzymano: 30 maja 1983.

Przyjęto: 13 czerwca 1983.

Adres autorki: Banacha 12/16, 90—237 Łódź.

BADANIE UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO
ZWIERZĄT I CZŁOWIEKA
NA PODSTAWIE HODOWLI W KOMORACH DYFUZYJNYCH *

STUDIES OF HUMAN AND ANIMAL HEMOPOIETIC SYSTEM USING
A DIFFUSION CHAMBER CULTURE

Zygmunt POJDA i Wiesław Wiktor JĘDRZEJCZAK

Zakład Immunologii Radiacyjnej, Wojskowy Instytut Higieny
i Epidemiologii, Warszawa
Kliniczny Oddział Izotopowy, Centrum Kształcenia Podyplomowego
Wojskowej Akademii Medycznej, Warszawa

Streszczenie. Praca zawiera przegląd stosowanych metod hodowli komórek układu krwiotwórczego w komorach dyfuzyjnych wszczepianych dootrzewnowo zwierzętom. Autorzy omówili możliwości i ograniczenia wynikające ze stosowania wymienionych metod. Przedstawiono najważniejsze wyniki badania układu krwiotwórczego, uzyskane przy użyciu komór dyfuzyjnych.

Summary. Methods of culture of hemopoietic cells in diffusion chambers implanted intraperitoneally into laboratory animals have been reviewed. The authors discussed potentialities and limitations of presently utilized methods. The most important data obtained during studies of hemopoietic system with diffusion chambers were summarized.

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW STOSOWANYCH W TEKŚCIE

- BFU-d-e — komórki tworzące duże kolonie (do 10^6 komórek) erytroblastyczne po 7—10 dniach hodowli szpiku myszy w komorach dyfuzyjnych ze skrzepem włóknikowym
- BFU-e — komórki tworzące kolonie erytroblastyczne po 8 dniach hodowli szpiku myszy in vitro. Termin używany zamiennie z BFU-d-e
- CFU-c — komórki tworzące kolonie granulocytarne (ponad 50 komórek) w hodowli in vitro
- CFU-d-e — komórki tworzące małe (kilkadziesiąt komórek) kolonie erytroblastyczne po 2-3 dniach hodowli szpiku myszy w komorach dyfuzyjnych ze skrzepem włóknikowym

* Praca finansowana z Programu Rządowego PR-6, temat 21.16.

- CFU-e — komórki tworzące kolonie erytroblastyczne po 2 dniach hodowli szpiku myszy *in vitro*. Termin używany zamiennie z CFU-d-e w odniesieniu do kolonii hodowanych w komorach dyfuzyjnych
- CFU-d-g — komórki tworzące kolonie granulocytarne w komorach dyfuzyjnych ze skrzepem lub agarem
- CFU-D4, — komórki tworzące kolonie granulocytarne w komorach ze skrzepem
CFU-D7 odpowiednio po 4 i 7 dniach hodowli,
- CFU-S — komórka tworząca zewnątrzpochodne, mielopoetyczne kolonie w śledzionach letalnie napromienionych myszy
- CSF — czynnik stymulujący granulopoezę w hodowli komórek szpiku *in vitro*
- DCPC — komórki tworzące kolonie w komorach dyfuzyjnych, oceniane metodą hodowli w komorach ze skrzepem lub stosowania metody granicznych rozcieńczeń hodowanych komórek.

Próby wykorzystania organizmu zwierzęcego jako środowiska umożliwiającego wzrost i namnażanie badanych komórek bądź tkanek podejmowane były stosunkowo dawno. Już w roku 1932 Rezzesi [92] opisał metodę hodowli tkanek w kolodionowych torebkach implantowanych do otrzewnej zwierząt. Metoda ta znalazła zastosowanie do badania wzrostu nowotworów [20]. Osiągnięciem natury metodycznej było użycie do konstrukcji komór dyfuzyjnych filtrów produkcji Millipore [2, 3, 17, 18], przyklejanych z dwóch stron pierścienia wykonanego z pleksiglasu. Wprowadzone następnie rozmaite modyfikacje konstrukcji komór dyfuzyjnych oraz metod preparacji ich zawartości nie zmieniły ogólnej koncepcji ich stosowania, przyczyniając się jednak w dużej mierze do zwiększenia możliwych sposobów ich wykorzystania do różnorodnych celów.

Najczęściej badanymi przy użyciu tej metody problemami są różne aspekty krwiotworzenia. Oprócz problematyki hematologicznej komory dyfuzyjne stanowią model doświadczalny w tak różnorodnych dziedzinach, jak: cytogenetyka i mutageneza [33—35], transplantologia [108] czy radiobiologia [28]. Szeroko stosowane są one w badaniach komórek nowotworowych [46, 58, 61, 75, 83]. Wiele wykonywanych prac dotyczy tematyki z pogranicza hematologii i immunologii [7, 77, 88, 109, 110, 120].

Hodowla komórek w komorach dyfuzyjnych implantowanych do otrzewnowo, podskórnio lub do jamy szpikowej zwierząt, stanowi grupę metod pośrednich między badaniem wzrostu komórek *in situ* a badaniem „*in vitro*”. Z tego wynikają zarówno zalety, jak i wady tego modelu. Do zalet zaliczyć należy możliwość badania wybranych komórek w środowisku pod wieloma względami zbliżonym do naturalnego. Jest to szczególnie ważne przy badaniu czynników wymagających do pełnej ekspresji warunków „*in vitro*”, np. przy ocenie działania toksycznego

bądź mutagennego związków chemicznych ulegających aktywacji w wątrobie [39, 98]. Istniejące modele aktywacji tych związków poza organizmem zwierzęcia [4, 81] wydają się mniej uniwersalne. W przypadku badania wpływu czynników szkodliwych na komórki ludzkie [53, 55] komory dyfuzyjne zastępują częściowo układ doświadczalny *in vivo*, niemożliwy do przyjęcia z uwagi na dobro badanego. Pozwalają one na pilotowe badanie skuteczności leków, możliwych do zastosowania u pacjenta, na izolowane komórki, w stosunku do których lek ma być skuteczny. Innym celem stosowania komór dyfuzyjnych może być badanie wpływu wydzielanych przez inkubowane w nich komórki czynników na organizm biorcy [48, 96].

Pewną zaletą metod opartych na stosowaniu komór dyfuzyjnych jest ich stosunkowo duża uniwersalność wynikająca z możliwości hodowli komórek, których wymagania odnośnie do środowiska życia nie są znane. Jest to jednocześnie jedno z największych ograniczeń, gdyż liczba i rodzaj czynników regulacyjnych działających w komorach dyfuzyjnych wszczepionych zwierzęciu nie dadzą się do końca określić, nigdy również nie będą ściśle powtarzalne. Względną wadą jest również stosunkowo wysoki koszt, na który składa się zarówno wartość samych komór dyfuzyjnych, jak i zwierząt używanych jako biorców komór. Cena i łatwość uzyskania hodowli zwierząt rzutuje również na dobór ich gatunków. Najczęściej używane są myszy i szczury, chociaż doświadczenia wykonywane przy użyciu królików [123, 125], psów [80] lub kóz [21] sugerują możliwość uzyskania lepszych, przynajmniej w niektórych aspektach, wyników w przypadku stosowania innych gatunków zwierząt.

KONSTRUKCJA KOMÓR DYFUZYJNYCH

Najczęściej używane komory dyfuzyjne skonstruowane są z pierścienia wykonanego z pleksiglasu, o średnicy 10—13 mm i grubości około 2 mm, do którego z obu stron przyklejone są krążki filtrów Millipore o średnicy porów 0,22 μm . Pojemność takiej komory waha się od 0,1 ml do 0,15 ml. Filtry są przytwierdzane do pierścienia klejem lub, co daje lepsze wyniki, zgrzewane termicznie [10]. Stosowane są modyfikacje, polegające na zwiększeniu pojemności komór [44, 49, 62, 63], użyciu innych typów filtrów Millipore (o innych średnicach porów — od 0,1 do 0,45 μm) lub zastąpieniu ich filtrami firmy Nucleopore [13, 38]. Te ostatnie różnią się od filtrów Millipore strukturą i grubością, umożliwiając lepszą dyfuzję do wnętrza komór. Ciekawą modyfikacją, umożliwiającą bezpośrednią obserwację kolonii rosnących na podłożu agarowym, jest skonstruowana przez Gordona komora [51], w której

jedną ścianę stanowi filtr, drugą zaś przyklejone do pierścienia plastikowego szkiełko nakrywkowe. Inną odmianą konstrukcyjną, której celem jest umożliwienie ograniczonych kontaktów pomiędzy komórkami inkubowanymi w komorze i komórkami jamy otrzewnej, jest komora trójwarstwowa, której ściany tworzą filtry o średnicy porów $3\ \mu\text{m}$, pokryte cienkimi warstwami gęstego agaru, pośrodku zaś zawarta jest warstwa komórek zawieszonych w półpłynnym agarze [45].

Do doświadczeń, których celem jest badanie wzajemnego oddziaływania różnych populacji komórkowych na siebie, stosowane są komory wielokrotne, konstruowane przez sklejenie ze sobą typowych pojedynczych pierścieni tak, aby ich zawartości oddzielone były pojedynczym filtrem [78]. Modyfikacją, mającą zapobiegać przyleganiu do siebie komórek inkubowanych w jamie otrzewnej, jest metoda sklejanie ich ze sobą „bok do boku” [112].

PRZYGOTOWANIE KOMÓR DYFUZYJNYCH I SPORZĄDZANIE PREPARATÓW Z KOMÓREK

1. WYJAŁOWIENIE KOMÓR DYFUZYJNYCH

Najczęściej stosowaną metodą jest sucha sterylizacja komórek w temperaturze $70\text{--}80^\circ\text{C}$ przez okres 24 godz. [5]. Metoda ta ma tę dodatkową zaletę, że w przypadku stosowania komórek klejonych umożliwia lepsze odparowanie rozpuszczalnika kleju, mogącego wywierać toksyczne działanie na hodowane komórki [10]. Stosowano również sterylizację promieniami UV [100] lub gazem [121].

2. PRZYGOTOWANIE ZAWARTOŚCI KOMÓR

Zawartość komory dyfuzyjnej stanowią badane komórki bądź tkanki, zawieszane w podłożu hodowlanym. W przypadkach badania układu krwiotwórczego stosuje się najczęściej jedno z typowych podłoży, np. Hanksa [64], Parkera 199 [25], Mc Coy'a [53] lub Fischera [10], wzbogacone dodatkami w rodzaju surowicy końskiej [53], ludzkiej [66] lub mysiej [98]. Często stosowany jest dodatek 10% cielej surowicy płodowej. Agar [52], osocze bydlęce [100], ludzkie [127], ekstrakt płodu bydlęcego [103] lub fibrynogen z trombiną [66] dodawane są wtedy, kiedy prowadzona jest hodowla komórek w podłożu półstałym, celem szybkiego unieruchomienia ich w wytworzonym sztucznie skrzepie włóknikowym lub żelu agarowym.

3. NAPEŁNIANIE KOMÓR I ICH WSZCZEPIANIE ZWIERZĘTOM

Komory napełniane są strzykawką przez otwór przewiercony w pierścieniu pleksiglasowym. Jest on następnie zaklejany na gorą-

co korkiem plastikowym [100] albo zalewany roztopioną mieszaniną wosków („cement Kerniga”) bądź parafiną [121]. Napełnione komory przechowywane są do czasu ich wszczepienia w temperaturze zbliżonej do 0°C [57] lub w temperaturze pokojowej. Technika wykonywania zabiegu wszczepienia komór zależy od ich planowanej lokalizacji w organizmie zwierzęcia i oczywiście od gatunku zwierzęcia. Najczęściej stosowana metoda implantacji dootrzewnowej myszom lub szczurom polega na wykonaniu w znieczuleniu ogólnym rozcięcia skóry, mięśni brzucha i otrzewnej ściennej w linii pośrodkowej ciała, umieszczeniu komory lub komór w jamie otrzewnej i zamknięciu przeciętych powłok klamerkami chirurgicznymi [10] bądź klejem chirurgicznym [71]. Inne metody, np. umieszczanie komór w jamie szpikowej kości udowej królika [44], wymagają często bardziej skomplikowanych technicznie zabiegów.

4. PREPARACJA I OCENA ZAWARTOŚCI KOMÓR DYFUZYJNYCH

Ocena zawartości komór napełnianych podłożem płynnym polega na analizie liczby i morfologii komórek i innych cech, np. obecności antygenów powierzchniowych czy też stopnia wbudowania znaczników izotopowych do komórek hodowanych w komorze dyfuzyjnej. W tym celu należy najpierw rozpuścić skrzep włóknikowy, powstały w komorze w trakcie hodowli, a utworzony ze składników infiltrujących z jamy otrzewnej zwierzęcia. Najlepsze wyniki uzyskiwane są przy zastosowaniu 0,5% pronazy [84] rozpuszczonej w izotonicznym dla komórek płynie, ewentualnie pronazy z dodatkiem 5% Ficollu [10]. Wydobyte z jamy otrzewnej komory dyfuzyjne są wytrząsane w roztworze pronazy w temperaturze pokojowej przez 50—90 min, następnie ich zawartość jest pobierana strzykawką lub pipetą. Z uzyskanych komórek można następnie sporządzać rozmazy [5], preparaty chromosomowe [33—35, 62], opisano też modyfikację polegającą na automatyzacji analizy z wykorzystaniem cytofluorometru [12]. W przypadku badania antygenów powierzchniowych konieczne jest dokładne wypłukanie pronazy z pożywki, w której zawieszono komórki oraz 2-3-godzinna inkubacja komórek w temp. 4°C. Taka procedura wynika z tego, że pronaza usuwa antygeny z powierzchni komórek i trzeba kilku godzin na ich ponowne ujawnienie [121].

Odmienna metoda preparacji stosowana jest w przypadku komór napełnianych podłożem półstałym. Dla umożliwienia analizy liczby i morfologii kolonii komórkowych konieczne jest zachowanie na preparacie takiej konfiguracji komórek, jaką mają one wewnątrz komory dyfuzyjnej. Jedną z metod spełniających to założenie jest technika wirowania komór w specjalnym urządzeniu, w którym skrzep jest rozpusz-

czany roztworem pronazy, a komórki osiadają na szkiełku mikroskopowym w układzie stanowiącym niejako „rzut pionowy” zawartości skrzepu [66, 67, 127]. W efekcie końcowym uzyskuje się szkiełko mikroskopowe z osadzonymi na nim grupami komórek, które według wszelkiego prawdopodobieństwa tworzyły kolonie wewnątrz komory dyfuzyjnej. Metoda druga polega na sporządzaniu preparatu z całego skrzepu, wydobyciu z komory dyfuzyjnej [100, 103]. W tym celu filtry odcina się w miejscu sklejenia z pierścieniem komory, jeden z filtrów odpreparowuje się od skrzepu, a skrzep z pozostałym filtrem stanowi właściwy preparat. Obecność filtru, stanowiącego niejako tło preparatu, ma tę zaletę, że pozwala zachować prawidłową konfigurację skrzepu. Oprócz wymienionych metod stosowane są też inne, umożliwiające osiągnięcie jednostkowych celów, jak np. poznanie ultrastruktury kolonii erytroidalnych [14].

Oryginalną metodą oceny liczby komórek prekursorowych, tworzących kolonie w komorach dyfuzyjnych, jest metoda „granicznych rozcieńczeń” [23, 25, 98]. Polega ona na założeniu, że przy takim doborze liczby komórek implantowanych do komór, aby tylko w niektórych komorach powstały kolonie, odsetek „pustych” komór odpowiada (zgodnie z rozkładem Poissona) odsetkowi takich populacji komórek, które nie zawierają prekursorów krwiotworzenia. Praktyczne obliczenie częstości komórek prekursorowych w komorze dyfuzyjnej polega na obliczeniu prawdopodobieństwa nieobecności takich komórek, oznaczonej jako $P(0)$,

$$P(0) = \frac{\text{liczba pustych komór}}{\text{całkowita liczba komór}}$$

i podstawienia otrzymanej wartości do wzoru o postaci

$$\lambda = -\ln P(0),$$

gdzie λ oznacza poszukiwaną częstość komórek.

5. PRZYGOTOWANIE ZWIERZĄT — BIORCÓW KOMÓR DYFUZYJNYCH

W zależności od rodzaju i pochodzenia komórek, hodowanych w komorach dyfuzyjnych, jak również zależnie od celu doświadczenia, zwierzęta planowane jako biorcy komór muszą być odpowiednio przygotowane. Przede wszystkim w przypadkach, kiedy można podejrzewać interakcje natury immunologicznej pomiędzy układem odpornościowym zwierzęcia a hodowanymi komórkami, odporność ta musi być zniesiona. Najprościej efekt ten uzyskać można napromieniając zwierzę [13, 24, 25] lub podając mu cyklofosfamid [85]. Dodatkowym efektem jest stymulacja komórek krwiotwórczych przez wytworzoną neutropenię [111].

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA RODZAJ UZYSKIWANYCH WYNIKÓW
I ICH ROZRZUT

Można wyróżnić dwie grupy czynników mających wpływ na wyniki: takie, których efekt działania jest w poszczególnych powtórzeniach doświadczenia jednakowy, i takie, które zwiększają rozrzut wyników pozornie jednakowych eksperymentów. Do grupy pierwszej zaliczyć można konstrukcję komory dyfuzyjnej. Lepsze efekty daje stosowanie filtrów firmy Nucleopore niż Millipore [13]; w przypadku filtrów Millipore ich rodzaj o średnicy porów 0,22 μm daje wyniki lepsze niż stosowanie filtrów o średnicach porów 0,1 i 0,45 μm [10]. Bardziej intensywny wzrost komórek obserwowano w komorach zgrzewanych niż w klejonych, korzystniejszy skutek dawało zwilżanie komór płynem hodowlanym przed ich napełnieniem [10]. Bez znaczenia była natomiast grubość komory. W preparatach histologicznych, wykonywanych z komór, nie stwierdzono różnic pomiędzy warunkami wzrostu komórek przy ścianach komory dyfuzyjnej i w jej centrum [5]. Nie miały też wpływu na wyniki takie czynniki jak płeć i szczep myszy — biorców oraz wszczepianie im jednej lub większej liczby komór [10, 122].

Do grupy czynników odpowiedzialnych za rozrzut wyników zaliczyć należy lokalizację komory w jamie otrzewnej [115]. Stwierdzono, że w komorach leżących w jamie otrzewnej królika bez kontaktu z siecią rosły głównie makrofagi, podczas gdy komory stykające się z nią zawierały również pozostałe komórki układu krwiotwórczego [125]. W ścisłym związku z wymienionym pozostaje inny czynnik, jakim jest stopień dyfuzji danego związku przez ściany komory. Po kilku godzinach od umieszczenia komory dyfuzyjnej w jamie otrzewnej, pokrywa się ona warstwą makrofagów, po kilku zaś dniach jest ona otorbiona stosunkowo grubą torebką łącznotkankową. Wyjątkiem jest sytuacja, kiedy zwierzę — biorca komory zostało uprzednio letalnie napromienione. W tym przypadku torebka ta jest nieobecna [13]. Wspomniana torebka była powszechnie uważana za podstawową przeszkodę utrudniającą dyfuzję przez ściany komory. Dane prowadzące do przeciwnych wniosków podali Benestad i Toogood [13]. Stwierdzili oni obecność w torebce drobnych naczyń krwionośnych i sugerowali, że to mikrokrążenie może ułatwić szybszą penetrację do wnętrza komory preparatów podanych dożylnie niż dootrzewnowo.

Niejednoznaczny jest pogląd na zależność proliferacji komórek wewnątrz komory dyfuzyjnej od stopnia dyfuzji przez jej ściany. Niektórzy autorzy negują istnienie takiej zależności [13, 82], inni podkreślają jej znaczenie [5, 10, 75]. Jednym z dowodów na brak wpływu stopnia dyfuzji na wzrost komórek ma być brak związku pomiędzy tempem ich

proliferaacji wewnątrz komory i intensywnością dowozu tlenu (hiperoksja lub policytemia u biorców komór) [13]. Dowód ten nie uwzględnia jednak dyfuzji do komory substancji odżywczych i regulatorów wzrostu komórek ani usuwania z komory metabolitów komórkowych. Spadek tempa dyfuzji uwidoczono przez porównania transportu do komory dyfuzyjnej ^3H -tymidyny [5, 10] lub hydroksymocznika [75] we wczesnym i późnym etapie inkubacji komory. Dla przykładu: hydroksymocznik po 3 dniach przebywania komory w otrzewnej zwierzęcia osiągnął po 10 min od momentu podania stężenie jednakowe we krwi i w komorze, po 7 dniach w tym samym czasie jego stężenie w komorze wyniosło 20% stężenia we krwi [75]. Innym dowodem na rolę spadku dyfuzji może być fakt powtórnej proliferacji komórek po przeszczepieniu ich do nowych komór w sytuacji, w której nie namnażały się już w pierwotnych komorach [31].

WYNIKI BADANIA PRAWIDŁOWEGO UKŁADU KRWIOTWORZENIA ZWIERZĄT

1. KINETYKA WZROSTU KOMÓREK SZPIKU I KOMÓREK JĄDRZASTYCH KRWI OBWODOWEJ W KOMORACH DYFUZYJNYCH

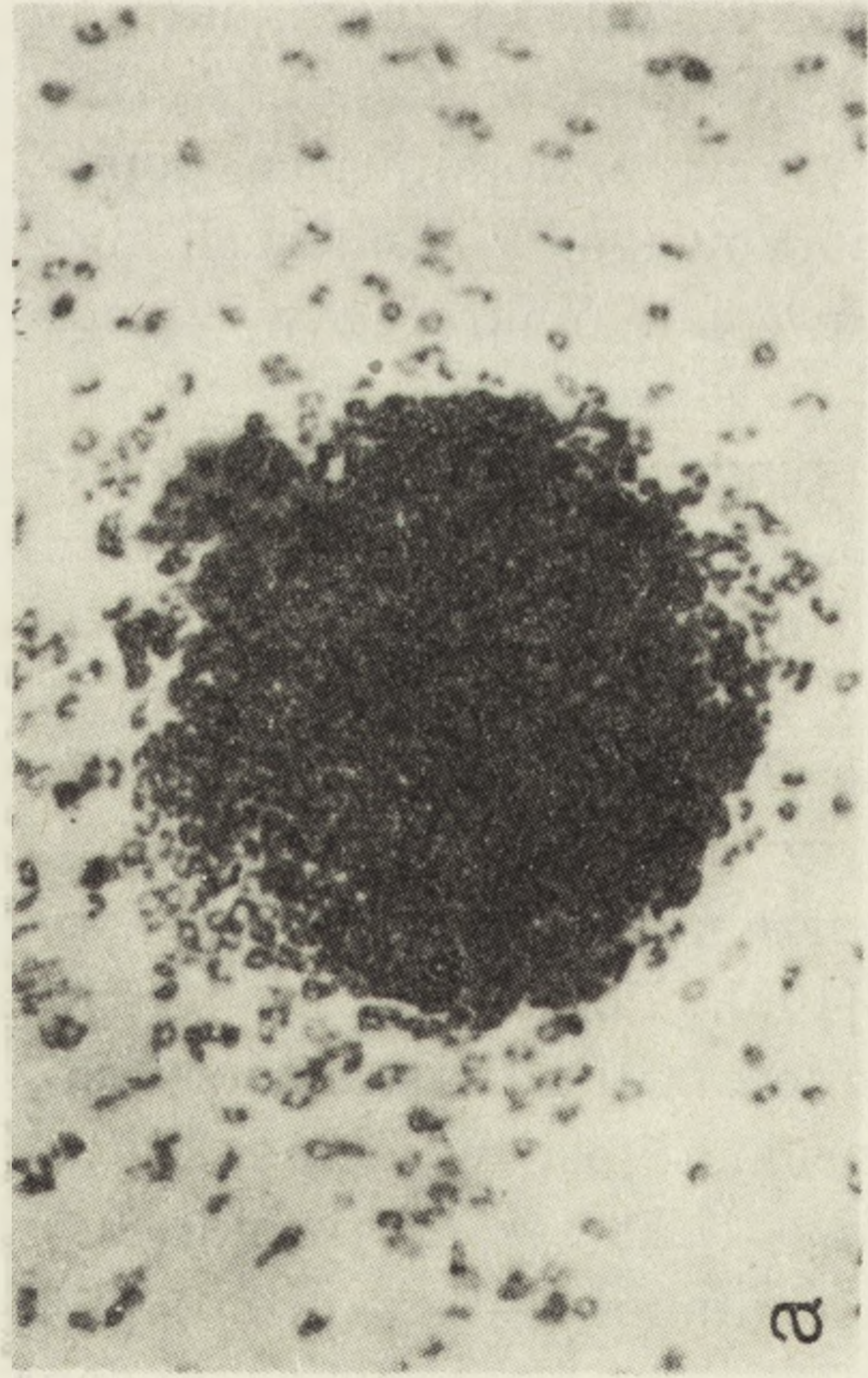
Prawie wszystkie badania wykonane były przy użyciu jako zwierząt doświadczalnych myszy, rzadziej szczurów. Rodzaj komórek proliferujących w komorach i tempo ich wzrostu różniły się w poszczególnych doświadczeniach, na co wpływały sposób przygotowania zarówno biorców komór, jak i implantowanych komórek, gęstość komórek w komorze, wreszcie konstrukcja samych komór dyfuzyjnych. Prawie nigdy nie obserwowano erytropoezy bez stymulacji biorców komór w tym kierunku. Uważa się, że nie sprzyjają jej warunki hodowli w komorach dyfuzyjnych [19]. Przeciwnie, intensywność granulopoezy porównywalna jest z obserwowaną w pobudzonym szpiku [8].

Zazwyczaj liczba komórek po 2—5 dniach od momentu implantacji komór była niższa od wartości początkowej 2—3 razy, w dalszym etapie hodowli przekraczała liczbę komórek implantowanych [5, 31, 82]. Spadek liczby komórek w pierwszych dniach hodowli jest cechą wspólną dla wszystkich linii komórkowych układu krwiotwórczego. Poszczególne rodzaje komórek różnią się natomiast charakterem proliferacji w przebiegu dalszej inkubacji w komorach dyfuzyjnych. Liczba dojrzałych granulocytów i ich prekursorów rośnie po pierwszych dniach, przekraczając wartości początkowe. Po około 7 dniach [5, 82] następuje jej ustalenie na stałym poziomie, nie przekraczającym 2×10^7 komórek w mililitrze. Po dalszym tygodniu następuje stopniowy spadek liczebności komórek. Stwierdzono [82], że zatrzymanie przyrostu liczby granulo-

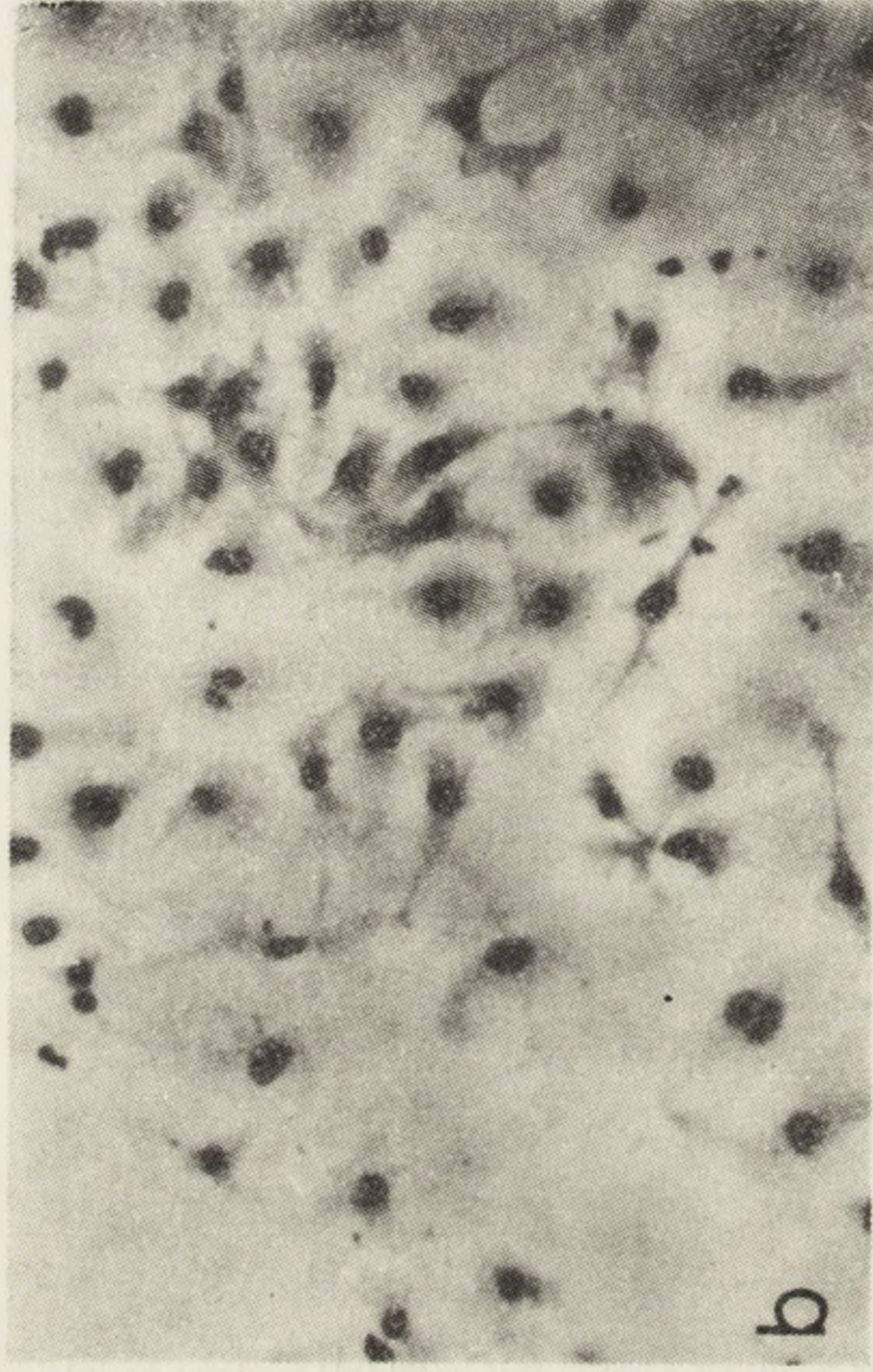
cytów spowodowane jest osiągnięciem takiej ich gęstości w komorze dyfuzyjnej, że dalsza ich proliferacja hamowana jest przez interakcje międzykomórkowe. Przemawia za tym utrzymywanie się tej samej liczby granulocytów w komorze w przypadku przeszczepienia całej jej zawartości do nowej komory dyfuzyjnej. Kiedy natomiast przeszczepiano zawartość 10-krotnie rozcieńczoną, następował wzrost liczby granulocytów. Za tego typu mechanizmem regulacyjnym przemawiają również obserwacje hamowania proliferacji granulocytów przez produkty przez nie wytwarzane (chalony) [11, 79]. Podobny wpływ na granulopoezę wywiera środowisko otrzewnej, w której po zabiegu implantacji powstaje odczyn zapalny [11]. Wyodrębniono 2 rodzaje kolonii granulocytarnych rosnących w komorach na podłożu ze skrzepem włóknikowym [103]. Kolonie pojawiające się czwartego dnia składały się z grupy kilkuset dojrzałych granulocytów. W odróżnieniu od nich drugi rodzaj kolonii, powstający siódmego dnia, tworzony był przez zgrupowanie komórek wokół kilku centrów. Kolonie te zawierały komórki we wcześniejszych stadiach dojrzewania, a liczba komórek w koloniach siedmiodniowych, na ogół większa niż w czterodniowych, była bardziej zmienna. Ryc. 1a przedstawia kolonię granulocytarną obserwowaną w 8 dniu. Powstawanie makrofagów w komorach dyfuzyjnych wydaje się nie podlegać prawidłom, regulującym wzrost granulocytów [5, 9, 26]. Liczba makrofagów wzrasta od drugiego tygodnia [5]. Potem kolonie makrofagalne „przerastają” całą zawartość komory, stając się wyraźnie dominującą populacją komórkową (ryc. 1b). Czas cyklu komórkowego w komorach dyfuzyjnych zarówno w przypadku granulocytów, jak makrofagów wynosi około 8 godz. [26].

Limfocyty nie proliferują w układzie syngenicznym w przypadku szpiku mysiego implantowanego w komorach dyfuzyjnych myszom. Opisywano szybkie zmniejszanie się liczby limfocytów w tym modelu doświadczalnym [5, 32, 36, 84] i ich praktyczną eliminację w ciągu kilku dni. Tak szybki rozpad limfocytów nie daje się wytłumaczyć ich naturalnym czasem przeżycia, a możliwe przyczyny tego nie są jasne [5].

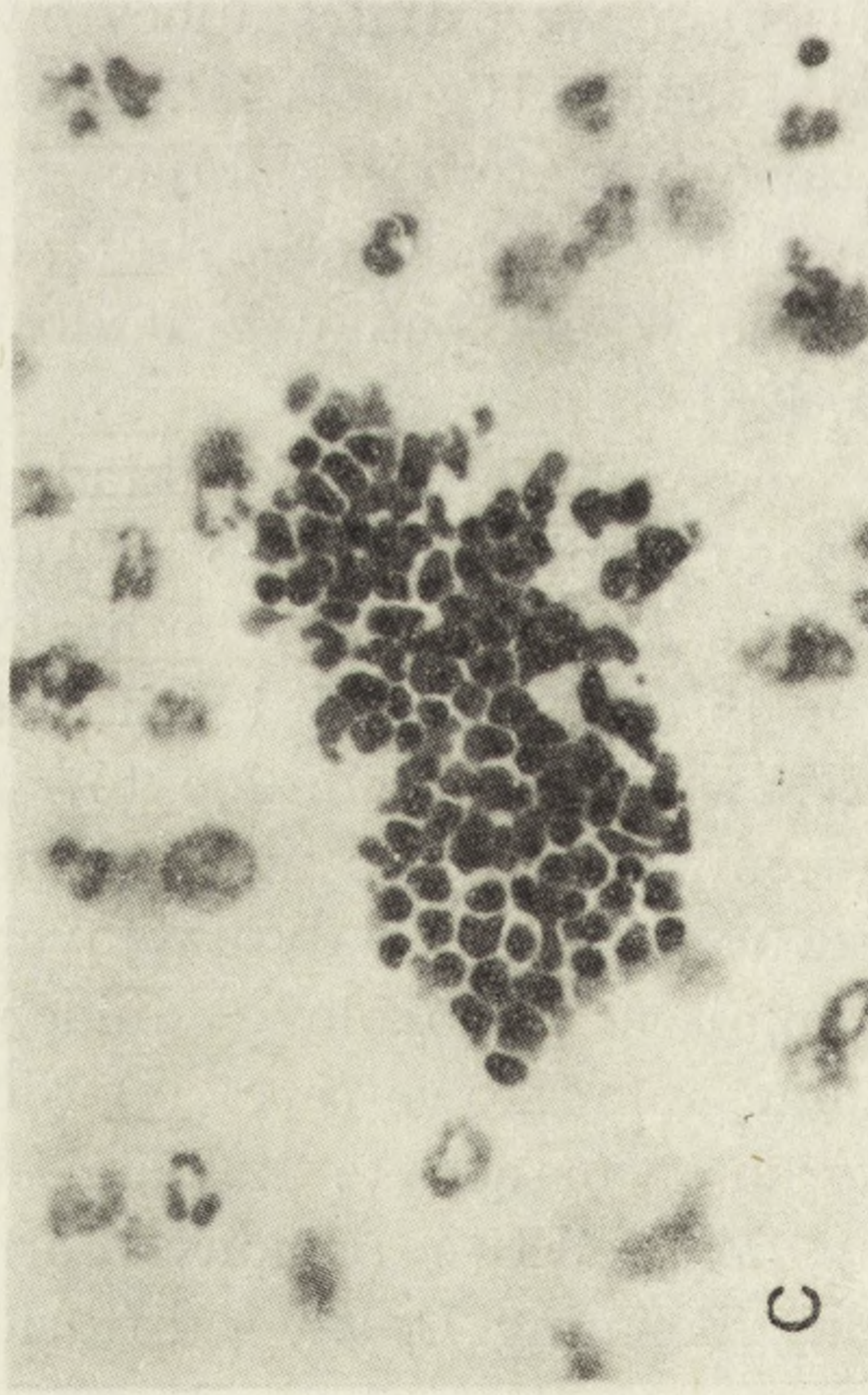
Erytropoeza w komórkach dyfuzyjnych przebiega w dwóch etapach. Pierwszy ma miejsce po około 2 dniach [100]. Pojawiają się wtedy niewielkie kolonie komórkowe (ryc. 1c), złożone z kilkudziesięciu erytroblastów. Komórka tworząca te kolonie określana jest w nomenklaturze angielskiej jako CFU-e (Colony Forming Unit — erythroid) lub CFU-d-e (Colony Forming Unit — diffusion chamber — erythroid) [43, 57, 73]. Drugi typ kolonii erytroidalnych pojawia się po około 7 dniach [100]. Są one o wiele liczniejsze, największe opisywane zawierały nie mniej niż 10^6 komórek [43]. Składają się z rozproszonych skupisk komórek (ryc. 1d) (stąd ich angielskie określenie burst — wybuch). Ko-



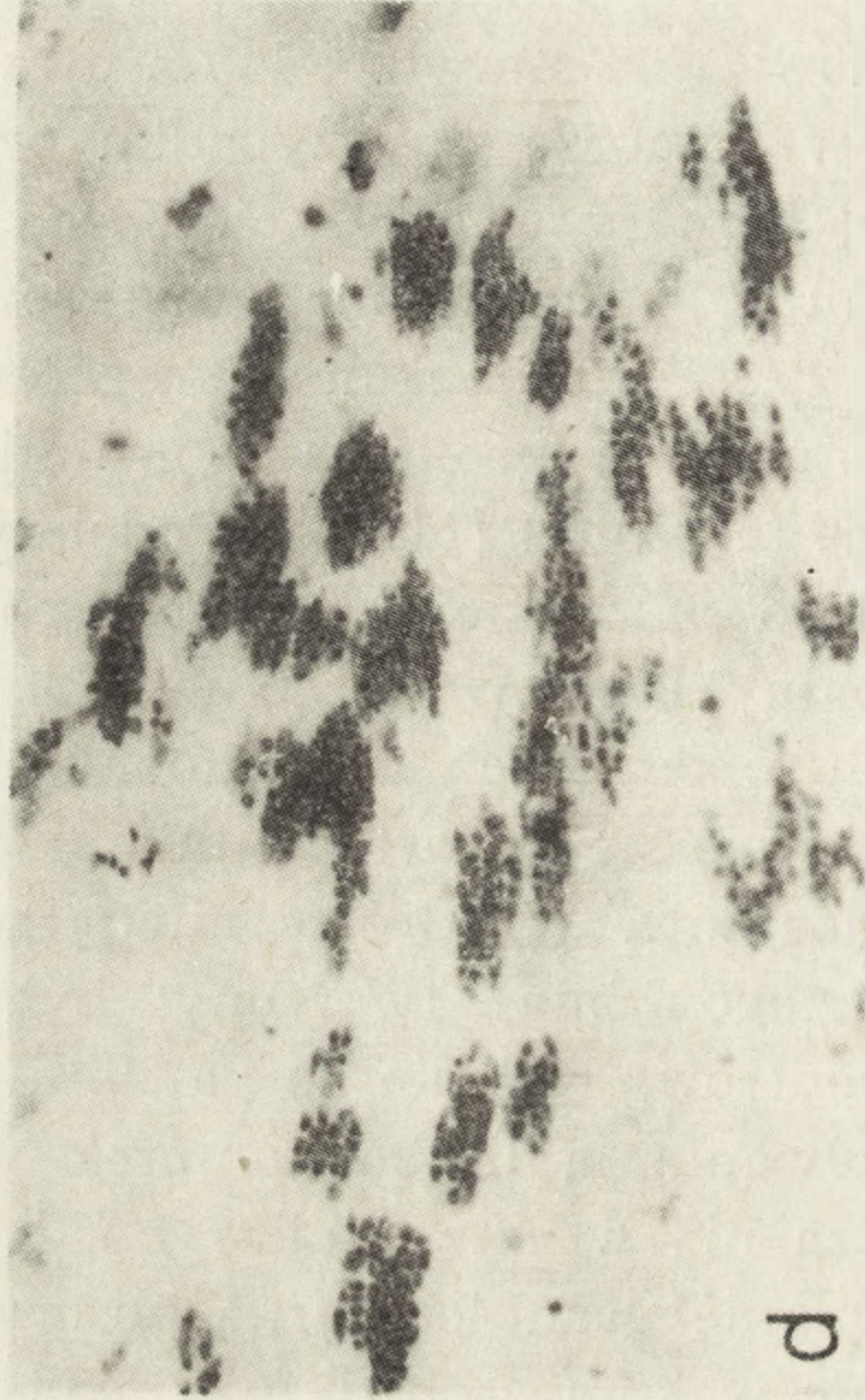
a



b



c



d

Ryc. 1. Przykłady typowych kolonii powstających z prekursorów krwiotworzenia szpiku mysiego w komorach dyfuzyjnych. Barwienie benzydynam + hematoksyliną. Zdjęcia autorów. (a) Kolonia granulocytarna (8 dzień); (b) fragment typowej kolonii makrofagalnej (8 dzień). Kolonie te, bez wyraźnego centrum, składają się z luźno leżących komórek; (c) kolonia utworzona przez CFU-d-e (3 dzień); (d) kolonia utworzona przez BFU-d-e (8 dzień)

mórka tworząca je określana jest odpowiednio jako BFU-e (Burst Forming Unit — erythroid) lub BFU-d-e [43, 57]. Oba rodzaje kolonii różniują się do stadium erytrocyta odpowiednio po kilku i kilkunastu dniach hodowli.

Megakariocyty pojawiają się w komorach dyfuzyjnych w bardzo niewielkiej liczbie [43] albo same, albo jako składowa kolonii mieszanych. Również bez wyraźnej prawidłowości czasowej występują komórki fibroblastoidalne. Ich pochodzenie nie jest jednoznacznie ustalone. Komórki o identycznej morfologii tworzą kolonie w komorach dyfuzyjnych, w których umieszczona jest regenerująca tkanka kostna [47].

2. BADANIE KOMÓREK MACIERZYSTYCH UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO

Komórki macierzyste i ukierunkowane układu krwiotwórczego, badane w komorach dyfuzyjnych, podzielić można na dwie zasadnicze grupy. Pierwszą stanowią komórki, których potomstwo pod postacią kolonii może być badane jedynie w innym niż komory dyfuzyjne układzie doświadczalnym. Jako przykłady wymienić można komórki macierzyste tworzące kolonie w śledzionach napromieniowanych myszy (CFU-S — Colony Forming Unit in Spleen), komórki ukierunkowane tworzące kolonie w hodowlach *in vitro* na podłożu agarowym (CFU-c — Colony Forming Unit in culture) i na podłożu ze skrzepem włóknikowym lub z metylocelulozą (BFU-e, CFU-e). Grupę drugą tworzą komórki, których potomstwo proliferuje w komorach dyfuzyjnych. Będą to wspomniane już komórki tworzące kolonie erytroidalne (BFU-d-e i CFU-d-e) oraz kolonie granulocytarne (CFU-d-g). W identyczny sposób tworzone jest nazewnictwo dla kolonii megakariocytarnych, makrofagalnych i mieszanych, jednak brak bliższych informacji na temat komórek, z których miałyby powstawać.

Badanie CFU-S i CFU-c w komorach dyfuzyjnych polega na poddawaniu zawartości komór określonym działaniom i jej przeszczepianiu napromienionym myszom w celu oceny liczby CFU-S lub na podłożu agarowe, gdy oceniana jest liczba CFU-c [25,27,31,112]. Badanie tą metodą liczby CFU-S w różnych dniach hodowli szpiku mysiego w komorach dyfuzyjnych wykazało, że są one zdolne do samopowielania (lub tworzenia z komórek młodszych rozwojowo) w tych warunkach. Okazało się mianowicie, że po początkowym spadku ich liczby do około 50% wartości początkowej w pierwszym dniu, przekracza ona o kilkanaście procent liczbę implantowanych CFU-S [31]. Maksimum to przypada na 4 dzień hodowli, następnie liczba CFU-S stopniowo spada, osiągając w 18 dniu zaledwie 1/200 wartości wyjściowej. Nie wyjaśnionym problemem jest związek pomiędzy CFU-S a komórkami tworzącymi kolonie granulocytarne w komorach dyfuzyjnych, określanymi jako

DCPC (Diffusion Chamber Progenitor Cell). Według niektórych autorów są to te same komórki [98], inni sugerują, że DCPC są komórkami młodszymi, przechodzącymi w trakcie różnicowania przez etap CFU-S [16, 74]. Stwierdzono zmniejszenie liczby CFU-S i DCPC w regenerującym szpiku [16, 25], co dowodzi ich aktywnego udziału w odnowie, prawdopodobnie przez intensyfikację procesu różnicowania kosztem samoodnawiania lub zachowania „stacjonarnej” puli tych komórek. Częstość DCPC i CFU-S w mysim szpiku, śledzionie i krwi różniła się dwukrotnie na korzyść DCPC, przy czym proporcje pomiędzy częstościami obu rodzajów komórek oznaczonymi dla poszczególnych narządów były zachowane [30]. Działając na myszy szpik surowicą królika, uczulonego przeciwko antygenowi mózgu mysiego (RAMBS — Rabbit Anti-Mouse Brain Serum) z dopełniaczem lub bez, stwierdzono, że po inkubacji w komorach dyfuzyjnych szpik, na który działało RAMBS z dopełniaczem, zawiera mniej CFU-S [1]. Badanie liczby CFU-S w szpiku nie inkubowanym w komorach dyfuzyjnych nie wykazało takich różnic. Prawdopodobnie więc inkubacja uniemożliwiła działanie granulocytów i/lub makrofagów, co dało nowy jakościowo wynik doświadczenia. W odróżnieniu od opisanego, w doświadczeniu polegającym na badaniu wpływu przeciwciał na szpik myszy szczepu W/W^v [120] wyniki *in vivo*, *in vitro* i w komorach dyfuzyjnych są identyczne. Inną metodą badano obecność antygeny Th-1.1 na komórkach macierzystych układu krwiotwórczego szczura. W tym doświadczeniu [110] implantowano komory dyfuzyjne, zawierające badany szpik, myszom immunizowanym przeciwko antygenowi Th-1.1. Brak proliferacji szpiku w komorach stanowił dowód na obecność antygeny na powierzchni komórek odpowiedzialnych za powstawanie kolonii.

Z dwóch typów komórek, tworzących kolonie erytroidalne w komorach dyfuzyjnych, BFU-d-e jest uważana za młodszą rozwojowo od CFU-d-e [100]. Podobną zależność stwierdzono pomiędzy komórkami tworzącymi kolonie granulocytarne czwartego (CFU-D4) i siódmego (CFU-D7) dnia hodowli [103]. Badanie szeregu parametrów sugeruje, że CFU-D7 są wcześniejszymi komórkami w granulopoezie niż CFU-D4, a także ich duże podobieństwo do komórek tworzących kolonie w innych układach doświadczalnych: CFU-D7 do CFU-S, a CFU-D4 do CFU-c [70].

3. BADANIE CZYNNIKÓW REGULUJĄCYCH KRWIOTWORZENIE

Komory dyfuzyjne nie są, z uwagi na niemożność dokładnego określenia wszystkich czynników mających wpływ na hodowane w nich komórki, wygodnym modelem doświadczalnym do badania określonych czynników regulujących proliferację układu krwiotwórczego. Dodatkową

trudnością jest różny stopień penetracji do wnętrza komory dyfuzyjnej poszczególnych związków chemicznych. Za przykład służyć może erytropoetyna. Stwierdzono doświadczalnie, że podczas gdy jej stężenie w surowicy hipoksemicznej myszy było nie niższe niż 160 mU/ml [57], wewnątrz komory dyfuzyjnej nie osiągało granicy czułości metody pomiaru — 50 mU/ml. Podobna sytuacja może ograniczać wartość badania metodą komór dyfuzyjnych w przypadku innych czynników, wpływających na proces krwiotworzenia.

Najwięcej wykonanych badań dotyczy stymulatorów i inhibitorów granulopoezy w komorach dyfuzyjnych. Opisywano stymulującą rolę takich czynników, jak napromienienie zwierząt [25, 93, 105], podawanie im cyklofosfamidu [111], endotoksyny bakteryjnej [80, 124, 126] lub produktów otrzymanych z leukocytów obecnych w wysięku otrzewnowym [124, 126]. Podobny efekt wywoływało częste przeszczepianie komór nowym biorcom [31] i wywoływanie u biorców odczynu zapalnego [104]. Sprzeczne doniesienia dotyczą wpływu czynnika stymulującego granulopoezę w hodowli *in vitro* (CSF — Colony Stimulating Factor) na granulopoezę w komórkach dyfuzyjnych. Po podaniu myszy surowicy anty-CSF następuje zahamowanie granulopoezy w komorze dyfuzyjnej, co można interpretować jako dodatni wpływ CSF na granulopoezę *in vivo* [95], inne jednak obserwacje temu zaprzeczają [87]. Przynajmniej niektóre z opisanych mechanizmów aktywacji granulopoezy różnią się prawdopodobnie od siebie [126]. Inhibitorami granulocytarnymi są przede wszystkim chalony wydzielane przez same granulocyty [9, 27, 79, 89, 122]. Nieproliferujące granulocyty oddziałują na komórki prekursorowe szeregu granulopoezy. Doświadczenie, polegające na synchronicznym indukowaniu interakcji pomiędzy granulocytami i komórkami prekursorowymi w szpiku i w komorach dyfuzyjnych tego samego zwierzęcia sugeruje, że oddziaływanie to ma charakter krótkotrwałych interakcji międzykomórkowych, a nie długotrwałego efektu natury humoralnej [29].

Nie określono jednoznacznie charakteru wszystkich czynników, mogących stymulować erytropoezę w komórkach dyfuzyjnych. Warunkami, aktywizującymi te czynniki są: hipobaria [50, 57], skrwawienie zwierzęcia [25] lub wywołanie hemolizy jego erytrocytów [100] albo związanie części hemoglobiny zwierzęcia z tlenkiem węgla (Kwiek S., niepublikowane). Kontrowersyjne wyniki uzyskano w badaniach dotyczących efektu działania podwyższonego poziomu erytropoetyny [6, 25, 57]. Powstawanie kolonii erytroidalnych zależy również od wstępnego przygotowania wszczepianych komórek. Łatwiej uzyskać dodatni wynik przy użyciu szpiku w fazie regeneracji [15] albo po fizycznym oddzieleniu niektórych frakcji komórek szpiku [43]. Zmniejszenie liczby kolonii po-

wstających z CFU-d-e uzyskać można przez przekrwienie biorców komór, jednak zabieg ten nie wpływa na liczbę kolonii powstałych z BFU-d-e [57].

Doniesienia dotyczące czynników regulujących proliferację makrofagów sugerują, że są one tożsame z czynnikami regulującymi proliferację granulocytów jedynie w części przypadków [25, 111, 124]. W pozostałych, np. wtedy, gdy w grę wchodzi chłony granulocytarne, nie działają one na makrofagi [9, 28]. Opisano również wybiórczą proliferację makrofagów pod wpływem czynnika produkowanego przez linię komórek L myszy [78].

Limfocyty stymulowane są przez antygeny obcogatunkowe, np. w modelu, w którym limfocyty szczura hodowano w komorach dyfuzyjnych wszczepianych myszom [7]. W takim układzie efektem stymulacji jest transformacja blastyczna. Można ją również wywołać inkubując komory dyfuzyjne przed wszczepieniem zwierzęciu w podłożu zawierającym mitogeny, np. fitohemaglutyninę [27].

4. BADANIE EMBRIOGENEZY UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO

Wykonanych zostało szereg badań, mających na celu zarówno określenie zachowania w komorach dyfuzyjnych komórek układu krwiotwórczego płodów, jak też porównanie ich z podobnymi czynnościowo komórkami pochodzącymi od osobników dorosłych. Jednoznacznie stwierdzono istnienie różnic pomiędzy komórkami macierzystymi krwiotworzenia u myszy w stadium płodu i osobnika dorosłego [106, 118]. Komórki pęcherzyka żółtkowego, hodowane w komórkach dyfuzyjnych, tworzyły makrofagi, komórki plazmatyczne, granulocyty i limfocyty [117, 119]. Komórki leżące po stronie trzewnej różnicowały się w kierunku makrofagów, z komórek leżących zewnętrznie tworzyły się komórki plazmocytopodobne. Nie stwierdzono natomiast obecności CFU-S [107]. Komórki pęcherzyka żółtkowego płodu są bardziej niż komórki szpiku osobników dorosłych wrażliwe na napromienienie, różnią się też czasem, przez jaki można je hodować w komorach dyfuzyjnych (ponad 98 dni) [119]. W odróżnieniu od komórek szpiku różnicują się one tak samo bez napromienienia, jak po napromienieniu [117]. Również komórki pochodzące z wątroby płodowej proliferowały w komórkach dyfuzyjnych odmiennie od komórek osobników dorosłych [106, 114].

Dla sprawdzenia teorii migracji komórek macierzystych układu krwiotwórczego płodu szczura, badano różnicowanie się komórek wątroby, szpiku i krwi obwodowej [56]. Stwierdzono, że źródłem komórek macierzystych zasiedlających kość i tworzących następnie szpik jest wątroba płodu.

WYNIKI BADANIA PRAWIDŁOWEGO UKŁADU
KRWIOTWORZENIA CZŁOWIEKA

Komórki układu krwiotwórczego człowieka hodowano najczęściej w komorach dyfuzyjnych wszczepianych letalnie napromienianym zwierzętom — najczęściej myszom lub szczurom. W jednym tylko przypadku jako biorcy podskórnie implantowanych komórek wykorzystani byli ludzcy ochotnicy, jednak wynik doświadczenia nie odbiegał od uzyskiwanych z wykorzystaniem zwierząt [90]. W większości przypadków zarówno hodowla szpiku, jak komórek jądrzastych krwi obwodowej nie pozwalały na uzyskanie w efekcie erytropoezy. Obserwowano kolonie granulocytarne [24, 42, 68], limfocyty [40, 42, 97], megakariocyty [40, 58, 66] i makrofagi [24, 58, 97]. Kinetyka wzrostu komórek była porównywalna z obserwowaną w przypadku komórek pochodzących od zwierząt [24, 40]. Obserwowany wzrost kolonii limfocytarnych tłumaczyć można obcogatunkowym biorcą komórek dyfuzyjnych [88].

Badanie komórek, tworzących kolonie granulocytarne oraz megakariocytarne, wykazało obecność na ich powierzchni antygenu Ia [74]. Pozostaje to w zgodzie z obserwacjami sugerującymi, że komórki tworzące kolonie granulocytarne w komorach dyfuzyjnych poprzedzają w rozwoju CFU-c [69, 72]. Liczba tych ostatnich zwiększała się po kilkunastu dniach hodowli w komorach dyfuzyjnych [54, 59]. Kolonie erytroidalne, trudniejsze do uzyskania, pojawiały się później niż w przypadku hodowli szpiku mysiego [116]. W odróżnieniu od szpiku ludzi dorosłych, hodowla wątroby płodu ludzkiego pozwala na obserwację erytropoezy w komorach dyfuzyjnych wszczepianych zwierzętom, które nie były uprzednio specjalnie przygotowywane [86].

Pomimo że badanie układu krwiotworzenia człowieka nie wnosi żadnych informacji, niemożliwych do uzyskania na modelu zwierzęcym, jest ono istotne z dwóch powodów. Po pierwsze, pozwala na ocenę podobieństwa mechanizmów krwiotworzenia człowieka i zwierząt, po drugie, umożliwia uzyskanie układu odniesienia dla badania metodą komórek dyfuzyjnych stanów patologii układu krwiotwórczego u ludzi.

BADANIE PATOLOGII UKŁADU
KRWIOTWÓRCZEGO CZŁOWIEKA

Najczęściej badanymi metodą komórek dyfuzyjnych chorobami układu krwiotwórczego są zespoły polegające na rozroście komórek typu nowotworowego (białaczki), w drugiej kolejności wymienić należy niedokrwistości, głównie typu aplazji. W pierwszej grupie badany jest problem różnicowania patologicznych komórek, w drugiej — problem bra-

ku bądź niedostatecznego wytwarzania prawidłowych elementów morfotycznych krwi.

Kinetyka wzrostu komórek białaczkowych nie przypomina obserwowanej w przypadku prawidłowego szpiku czy krwi [65, 75, 99]. Przeważnie przyrost ich liczby w pierwszych dniach jest znacznie większy w porównaniu z normą. Spowodowane to jest albo zjawiskiem szybkiego powielania komórek o jednakowym, przeważnie bardzo niskim stopniu różnicowania [75, 99], albo zapoczątkowaniem różnicowania w kierunku dojrzałych postaci [65]. W tym ostatnim przypadku po zakończeniu procesu różnicowania granulocytów komórki, pochodzące od chorego z ostrą białaczką nieлимfatyczną (ANLL), zaprzestały podziałów. Zjawisko wytwarzania inhibitorów komórkowych przez przynajmniej niektóre blasty białaczkowe [91, 113] nie wydaje się mieć wpływu na duży przyrost ich liczby. Problem „dojrzewania” komórek białaczkowych w warunkach hodowli w komorach dyfuzyjnych był szeroko badany, opisywano nabywanie przez blasty cech komórek dojrzałych wtedy, kiedy ani *in vivo*, ani *in vitro* zjawisko to nie występowało [60, 65, 101, 102]. Zjawisko różnicowania blastów w komorach dotyczyło jedynie części badanych przypadków [61], w niektórych doświadczeniach go nie obserwowano [99]. Dojrzewanie komórek oceniane było albo na podstawie kryterium morfologicznego [61, 65], albo metodą badania antygenów powierzchniowych komórek [76, 109]. Stwierdzono również wybiórczy typ różnicowania: w przypadku przewlekłej białaczki szpikowej, w którym w szpiku chorego stwierdzono dużą liczbę megakariocytów, w komorach dyfuzyjnych blasty różnicowały się wyłącznie w kierunku granulocytów [37]. Z kolei zdolność tworzenia megakariocytów wykazywała niezróżnicowana, z założenia megakarioblastyczna linia komórkowa, ale izolowana ze szpiku szczura, a nie człowieka [101]. Badanie różnicowania blastów białaczkowych w komorach dyfuzyjnych wymaga zawsze wyjaśnienia, czy obserwowane komórki dojrzałe nie pochodzą z „zanieczyszczenia” implantowanych komórek białaczkowych komórkami prawidłowymi. Problem ten rozstrzygnięty został w przypadku hodowli blastów ostrej białaczki szpikowej (AML) przez wykazanie w dojrzałych granulocytach (obserwowanych po 7 dniach inkubacji w komorach dyfuzyjnych) tzw. pałeczek Auera, będących znacznikami komórek białaczkowych AML [22].

Brak lub upośledzenie wytwarzania w szpiku chorego na niedokrwistość aplastyczną elementów morfotycznych krwi może być wynikiem albo defektu komórki macierzystej, albo jej mikrośrodowiska. W drugim przypadku może to być albo brak komórkowego czy wydzielniczego stymulatora krwiotworzenia, albo obecny komórkowy bądź wydzielniczy inhibitor. Różnicowanie tych przyczyn jest jednocześnie

istotnym zagadnieniem teoretycznym i może mieć znaczenie praktyczne dla decyzji o terapii chorego. Opisane zagadnienie może być rozstrzygnięte metodą hodowli szpiku chorego w komorach dyfuzyjnych. Teoretycznie brak rozstrzygnięcia problemu lub wynik sugerujący błędną interpretację mogą mieć miejsce w przypadku, gdy w grupie implantowanych do komory dyfuzyjnej komórek znalazłyby się takie, które jednocześnie wywierałyby hamujący wpływ na proliferację komórek macierzystych i byłyby zdolne do życia i namnażania się w środowisku komory dyfuzyjnej. Prawdopodobieństwo wystąpienia tego typu sytuacji jest jednak stosunkowo niewielkie.

Przekonywającym przykładem możliwości różnicowania niedokrwistości aplastycznych metodą hodowli szpiku chorego w komorach dyfuzyjnych jest przypadek równoległego badania dwóch chorych, z których u pierwszego stwierdzono brak wzrostu szpiku *in vitro* i lepszy od normy wzrost w komorach dyfuzyjnych, z kolei szpik drugiego nie dawał wzrostu ani w komorach, ani *in vitro* [71]. W innym przypadku, w którym szpik chorego na niedokrwistość aplastyczną proliferował prawidłowo w komorach dyfuzyjnych, wyleczenie uzyskano po zastosowaniu immunosupresji [94]. Byłby to więc dowód potwierdzonego rozpoznania hamującego hemopoezę wpływu mikrośrodowiska szpiku. Opisane przykłady przemawiają za przydatnością stosowania — w wybranych przypadkach — hodowli szpiku w komorach dyfuzyjnych jako dodatkowej próby prawidłowego rozpoznania patomechanizmu choroby.

LITERATURA

- [1] ADLER S. S., KUZNETSKY R. D., TROBAUGH F. E. Jr., Antiserum to mouse pluripotent hemopoietic stem cells (CFU-S): evidence for a role of complement in the inactivation of CFU-S in diffusion chambers, *Blut*, **39**: 61—65, 1979.
- [2] ALGIRE G. H., WEAVER J. H., PREHN R. T., Growth of cells *in vivo* in diffusion chambers. I. Survival of homografts in immunized mice, *J. Nat. Cancer Inst.*, **15**: 493—501, 1954.
- [3] ALGIRE G. H., BORDERS M. L., EVANS V. J., Studies of heterografts in diffusion chambers in mice, *J. Nat. Cancer Inst.*, **20**: 1187—1195, 1958.
- [4] AMES B. N., Mc CANN J., YAMASAKI E., Method for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian — microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **31**: 347—364, 1975.
- [5] BENESTAD H. B., Formation of granulocytes and macrophages in diffusion chamber cultures of mouse blood leucocytes, *Scand. J. Haemat.*, **7**: 279—288, 1970.
- [6] BENESTAD H. B., BREIVIK H., Properties of hemopoietic progenitor cells, *Acta Physiol. Scand.*, **83**: 389—398, 1971.
- [7] BENESTAD H. B., IVERSEN J. G., ROLSTAD B., Immunoblast formation

- by recirculating and nonrecirculating rat lymphocytes cultured in diffusion chambers, *Scand. J. Haemat.*, **8**: 32—43, 1971.
- [8] BENESTAD H. B., Cell kinetics in diffusion chambers: survival, resumption of proliferation, and maturation rate of murine haemopoietic cells, *Cell Tissue Kinet.*, 421—431, 1972.
- [9] BENESTAD H. B., RYTÖMAA T., KIVINIEMI K., The cell specific effect of the granulocyte chalone demonstrated with the diffusion chamber technique, *Cell Tissue Kinet.*, **6**: 147—154, 1973.
- [10] BENESTAD H. B., REIKVAM A., Diffusion chamber culturing of haemopoietic cells: methodological investigations and improvement of the technique, *Exp. Hematol.*, **3**: 249—260, 1975.
- [11] BENESTAD H. B., TOOGOOD E. O., Diffusion chamber assay of putative regulators of granulocyte and macrophage formation: a new approach, [w] *Experimental Hematology Today 1980*, red. S. J. Baum, G. D. Ledney, D. W. van Bekkum, S. Karger, Basel 1980, 271—277.
- [12] BENESTAD H. B., STRÖM-GUNDERSEN I., Flow cytometry of mouse bone marrow cells cultured in vivo or in vitro, *Exp. Hematol.*, **10**: 343—351, 1982.
- [13] BENESTAD H. B., TOOGOOD E. O., Diffusion chamber (DC) culturing of hemopoietic cells: a reliable assay system for regulators and proliferation, *Exp. Hematol.*, **10**: 161—171, 1982.
- [14] BEN-ISHAY Z., Ultrastructural analysis of erythroid colonies in diffusion chambers in irradiated rats. Effects of cytosine arabinoside administration of donor rats, *Scand. J. Haematol.*, **14**: 369—377, 1975.
- [15] BEN-ISHAY Z., REICHERT F., SHARON S., Erythroid „bursts” in semi-solid agar diffusion chambers: effect of cyclophosphamide administration to host and of hydroxyurea to donor animals, *Exp. Hematol.*, **6**: 631—636, 1978.
- [16] BEN-ISHAY Z., PRINDULL G., BEN-ISRAEL D., Effect of hydroxyurea on two different types of hematopoietic stem cells (CFU-S and DCPC) of newborn mice, *Blut*, **42**: 165—172, 1981.
- [17] BERMAN I., KAPLAN H. S., The cultivation of mouse bone marrow in vitro, *Blood*, **14**: 1040—1046, 1959.
- [18] BERMAN I., KAPLAN H. S., The functional capacity of mouse bone marrow cells growing in diffusion chambers, *Exp. Cell Res.*, **20**: 238—239, 1960.
- [19] BERMAN I., NEWBY E. J., Erythropoietic response of bone marrow cells cultivated in diffusion chambers, *Nature*, **213**: 300—301, 1967.
- [20] BISCEGLIE V., Über die antineoplastische Immunität. II. Mitteilung. Über die Wachstumshafigkeit der heterogenen Geschwulste in erwachsenen Tieren nach Einpflanzung in Kollodium-säckchen, *Z. Krebsforsch.*, **40**: 141, 1934.
- [21] BOECKER W., CARSTEN A. L., CHIKKAPPA G., CRONKITE E. P., JOEL D., LAISSUE J., ÖHL S., Laboratory techniques for diffusion chamber studies at Brookhaven National Laboratory, [w] *Second International Workshop “Hemopoiesis in Culture”*, red. W. A. Robinson, DHEW Publication No (NIH) 74—205, 1973, 446—450.
- [22] BOECKER W. R., ÖHL S., HOSSFELD D. K., SCHMIDT C. G., Differentiation of Auer-rod positive leukaemic cells in diffusion chamber culture, *Lancet*, **1**: 267—269, 1978.
- [23] BÖYUM A., BORGSTRÖM R., The concentration of granulocytic stem

- cells in mouse bone marrow, determined with diffusion chamber technique, *Scand. J. Haemat.*, **7**: 294—303, 1970.
- [24] BÖYUM A., BOECKER W., CARSTEN A. L., CRONKITE E., Proliferation of human bone marrow cells in diffusion chambers implanted into normal or irradiated mice, *Blood*, **40**: 163—173, 1972.
- [25] BÖYUM A., CARSTEN A. L., LAERUM O. D., CRONKITE E. P., Kinetics of murine bone marrow cells cultured in diffusion chambers: effect of hypoxia, bleeding, erythropoietin injections, polycythemia and irradiation of the host, *Blood*, **40**: 174—187, 1972.
- [26] BÖYUM A., BREIVIK H., Kinetics of murine haemopoietic cell proliferation in diffusion chambers, *Cell Tissue Kinet.*, **6**: 101—110, 1973.
- [27] BÖYUM A., LÖVHAUG D., BOECKER W. R., Regulation of bone marrow cell growth in diffusion chambers: the effect of adding normal and leukemic (CML) polymorphonuclear granulocytes, *Blood*, **48**: 373—383, 1976.
- [28] BÖYUM A., CARSTEN A. L., CHIKKAPPA G., COOK L., BULLIS J., HONIKEL L., CRONKITE E. P., The r.b.e. of different-energy neutrons as determined by human bone-marrow cell-culture techniques, *Int. J. Radiat. Biol.*, **34**: 201—213, 1978.
- [29] BREIVIK H. Response of multipotent (CFU) and granulocyte (diffusion chamber assay) progenitor cells and differentiating cells of murine haematopoietic tissues to a perturbation of the steady state, *Cell Physiol.*, **79**: 171—180, 1971.
- [30] BREJVIK H., Haematopoietic stem cell content of murine bone marrow, spleen and blood. Limiting dilution analysis of diffusion chamber cultures. *J. Cell Physiol.*, **78**: 73—78, 1971.
- [31] BREJVIK H., BENESTAD H. B., BOYUM A., Diffusion chamber and spleen colony assay of murine haematopoietic stem cells, *J. Cell Physiol.*, **78**: 65—72, 1971.
- [32] BREJVIK H., BENESTAD H. B., Regulation of granulocyte and macrophage formation in diffusion chamber cultures of mouse haemopoietic cells, *Exp. Cell Res.*, **70**: 340—348, 1972.
- [33] BREWEN J. G., NETTESHEIM P., JONES K. P., A host-mediated assay for cytogenetic mutagenesis: preliminary data on the effect of methyl methanesulphonate, *Mutat. Res.*, **10**: 645—649, 1970.
- [34] BREWEN J. G., PEARSON F. G., JONES K. P., LUIPPOID H. E., Cytogenetic effects of cyclohexamine and N-OH-cyclohexamine on human leukocytes and Chinese hamster bone marrow, *Nature New Biol.*, **230**: 15-16, 1971.
- [35] BUCKTON K. E., NETTESHEIM P., In vitro and in vivo culture of mouse peripheral blood for chromosome preparations, *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)*, **128**: 1106—1110, 1968.
- [36] CAPALBO E. E., MAKINODAN T., Doubling time of mouse spleen cells during the latent and log phases of primary antibody response, *J. Immunol.*, **92**: 235, 1964.
- [37] CARBONELL F., HOELZER D., THIEL E., BARTL R., Ph¹-positive CML associated with megakaryocytic hyperplasia and thrombocytopenia and an abnormality of chromosome No 3, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **6**: 153—161, 1982.
- [38] CARSTEN A. L., CHANANA A. D., CHIKKAPPA G., CRONKITE E. P., ÖHL S., An improved diffusion chamber (DC) for culture of hematopoietic cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **105**: 107—109, 1975.
- [39] CARSTEN A. L., BENZ R. D., Sensitivity of the diffusion chamber host.

- mediated clastogen assay system, *Exp. Hematol.*, **10**: Suppl. 11: 44, 1982.
- [40] CHIKKAPPA G., CARSTEN A. L., CHANANA A. D., CRONKITE E. P., Culture of normal human blood cells in diffusion chamber systems. I. Granulocyte survival and proliferation, *Exp. Hematol.*, **6**: 28—36, 1978.
- [41] CHIKKAPPA G., CARSTEN A. L., CRONKITE E. P., Kinetics of proliferation and differentiation of human hemopoietic cells in a diffusion chamber system, *Exp. Hematol.*, **8**: 533—541, 1980.
- [42] CRONKITE E. P., CARSTEN A. L., CHIKKAPPA G., LAISSUE J. A., ÖHL S., Culture of normal and leukemic cells in diffusion chambers, *Adv. Biosciences*, **14**: 273—286, 1974.
- [43] CRONKITE E. P., CARSTEN A. L., INOUE T., BULLIS J., Colossal granulocytic and erythropoietic colonies and bursts formed by culture of regenerating bone marrow in plasma clot diffusion chambers (PCDC), [w] *Experimental Hematology Today 1980*, red. S. J. Baum, G. D. Ledney, D. W. van Bekkum, S. Karger, Basel 1980, 255—264.
- [44] CZERSKI P., Cytological observations on lymphocytes grown in vitro and in vivo in diffusion chambers, [w] *The Lymphocyte in Immunology and Haemopoiesis*, wyd. J. M. Yoffey, Edw. Arnold Ltd., London 1967, 35—45.
- [45] DICKIE K. A., GERECKE D., A millipore chamber agar system for the growth of hemopoietic stem cells, [w] *Second International Workshop „Hemopoiesis in Culture”*, May 1973, wyd. W. A. Robinson, DHEW Publication No 74—205, 1973, 416—419.
- [46] EVGENJEVA T. P., Heterotransplantation of human cancers to animals by means of diffusion chambers, *Eur. J. Cancer*, **6**: 533—537, 1970.
- [47] FARADJI A., BERGERAT J. P., OBERLING F., Hemopoietic bone culture in diffusion chambers, *Biomedicine*, **33**: 75—77, 1980.
- [48] FRINDEL E., CROIZAT H., The relationship between CFU kinetics and the thymus, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **249**: 468—476, 1975.
- [49] FURUKAWA M., HUANG C. C., Sister chromatid exchanges induced by cyclophosphamide in V 79 cells cultured in diffusion chambers in mice, *Mutat. Res.*, **57**: 233—239, 1978.
- [50] GERARD E., CARSTEN A. L., CRONKITE E. P., The proliferative potential of plasma clot erythroid colony-forming cells in diffusion chambers, *Blood Cells*, **4**: 105—129, 1978.
- [51] GORDON M. Y., Quantification of haemopoietic cells from normal and leukaemic mice using an in vivo colony assay, *Brit. J. Cancer*, **30**: 421—428, 1974.
- [52] GORDON M. Y., BLACKETT N. M., DOUGLAS I. D. C., Colony formation by human haemopoietic precursor cells cultured in semi-solid agar in diffusion chambers, *Brit. J. Haematol.*, **31**: 103—110, 1975.
- [53] GORDON M. Y., BLACKETT N. M., The sensitivities of human and murine hemopoietic cells exposed to cytotoxic drugs in an in vivo culture system, *Cancer Res.*, **36**: 2822—2825, 1976.
- [54] GORDON M. Y., DOUGLAS I. D. C., CLINK H. M., PICKERING B. M. J., Distribution of granulopoietic activity in the human skeleton, studied by colony growth in agar diffusion chambers, *Brit. J. Haematol.*, **32**: 537—542, 1976.
- [55] GORDON M. Y., Changes in human bone marrow colony-forming cells following chemotherapy using an agar diffusion-chamber technique, [w] Ex-

- perimental Hematology Today, red. S. J. Baum, G. D. Ledney, Springer-Verlag, New York 1977, 233—236.
- [56] HAAS R. J., HOELZER D., KURRLE E., LANDENBERGER B., WINKLER U., Experimental analysis of developing hemopoiesis in fetal bone marrow, *Pediat. Res.*, **10**: 164—168, 1976.
- [57] HARIGAYA K., CRONKITE E. P., MILLER M. E. MOCCIA G., Further evidence of the in vivo role of erythropoietin or companion molecules induced by hypoxia on proliferation and continuing differentiation of BFU-e in PCDC, *Blood*, **57**: 298—304, 1981.
- [58] HOELZER D., KURRLE E., ERTL U., MILEWSKI A., Growth of human leukaemic peripheral blood cells in diffusion chambers, *Europ. J. Cancer*, **10**: 579—589, 1974.
- [59] HOELZER D., HARRISS E. B., SLADE M., KURRLE E., Growth of in vitro colony-forming cells from normal human peripheral blood leukocytes cultured in diffusion chambers, *J. Cell Physiol.*, **89**: 89—100, 1976.
- [60] HOELZER D., KURRLE E., SCHMÜCKER H., HARRISS E. B., Evidence for differentiation of human leukemic blood cells in diffusion chamber culture, *Blood*, **49**: 729—744, 1977.
- [61] HOELZER D., HARRISS E. B., BÜLTMANN B., HELLRIEGEL K.-P., Differentiation of human leukaemic blood cells in diffusion chamber culture, *Exp. Hematol.*, **7**: Suppl. 6: 107, 1979.
- [62] HUANG C. C., A modified host-mediated assay using cultured human lymphoid cells in diffusion chambers in mice and cytogenetic effect of cyclophosphamide, *Environ. Res.*, **13**: 267—277, 1977.
- [63] HUANG C. C., FURUKAWA M., Sister chromatid exchanges in human lymphoid cell lines cultured in diffusion chambers in mice. A host-mediated assay system for mutagenicity, *Exp. Cell Res.*, **111**: 458—461, 1978.
- [64] HUYBRECHTS M., SYMANN M., TROUET A., The diffusion chamber technique as an in vivo assay in mice for the effectiveness of antitumor agents, *Scand. J. Haematol.*, **23**: 223—226, 1979.
- [65] IZZI T., FONTEBUONI A., LUCARELLI G., Growth and differentiation patterns of human acute non lymphoid leukemia in diffusion chambers before and after treatment, *Blut*, **43**: 25—31, 1981.
- [66] JACOBSEN N., Chamber centrifugation: a harvesting technique for estimation of the growth of human haemopoietic cells in diffusion chambers, *Brit. J. Haematol.*, **29**: 171—177, 1975.
- [67] JACOBSEN N., FAUERHOLDT L., Human granulocytopoietic colonies in diffusion chambers in mice: growth of colonies and the effect of host irradiation, *Scand. J. Haematol.*, **16**: 101—111, 1976.
- [68] JACOBSEN N., FAUERHOLDT L., Quantitative aspects of an in vivo diffusion chamber assay for normal human hemopoietic colony forming units, *Exp. Hematol.*, **5**: 171—186, 1977.
- [69] JACOBSEN N., BROXMEYER H. E., MOORE M. A. S., Physical separation and kinetics of colony-forming cells in diffusion chambers in vivo (CFU-d) and colony-forming cells in agar in vitro (CFU-c), [w] *Experimental Hematology Today 1978*, red. S. J. Baum, G. D. Ledney, Springer-Verlag, New York 1978, 243—249.
- [70] JACOBSEN N., BROXMEYER H. E., GROSSBARD E., MOORE M. A. S., Colony-forming units in diffusion chambers (CFU-d) and colony-forming

- units in agar culture (CFU-c) obtained from normal human bone marrow: a possible parent — progeny relationship, *Cell Tissue Kinet.*, **12**: 213—226, 1979.
- [71] JĘDRZEJCZAK W. W., SIEKIERZYŃSKI M., SZCZYLIK C., GÓRNAŚ P., DRYJAŃSKI T., Aplastic anemia with marrow defective in formation of fibroblastoid cell colonies in vitro, *Scand. J. Haematol.*, **28**: 82—90, 1982.
- [72] KOEFFLER H. P., NISKANEN E., CLINE M., BILLING R., GOLDE D., Human myeloid precursors forming colonies in diffusion chambers expresses the Ia-like antigen, *Blood*, **54**: 1188—1199, 1979.
- [73] KRZYMOWSKI T., PRZAŁA T., Mechanizmy regulujące proliferację i różnicowanie komórek układu erytroblastycznego, [w] *Ultrastruktura i funkcja komórki 1982*, red. J. Kawiak, Z. Osuchowska, A. Przełęcka, t. 2, PWN, Warszawa 1982, 42—91.
- [74] KURRLE E., HOELZER D., HARRISS E. B., Growth and differentiation of rat bone marrow stem cells in diffusion chamber culture, *Exp. Hematol.*, **5**: 241—250, 1977.
- [75] LAERUM O. D., GRÜNEISEN A., RAJEWSKY M. F., Proliferative properties of malignant cell populations cultured in intraperitoneal diffusion chambers, *Eur. J. Cancer*, **9**: 533—541, 1973.
- [76] LAU B., JÄGER G., THIEL E., RODT H., HUHN D., PACHMANN K., NETZEL B., BÖNING L., THIERFELDER S., DÖRMER P., Growth of the Reh cell line in diffusion chambers. Evidence for differentiation along the T- and B-cell pathway, *Scand. J. Haematol.*, **23**: 285—292, 1979.
- [77] LAU B., JÄGER G., Development of common acute lymphoblastic leukemia antigen (cALLA) and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) during cultivation of normal mononuclear blood cells in diffusion chambers (DC), *Exp. Hematol.*, **9**: Suppl. 9: 13, 1981.
- [78] LÖVHAUG D., LINGAAS E., RUUD E., BÖYUM A., Effects of L-cell produced CSF on mouse bone marrow cells in double diffusion chambers, [w] *Experimental Hematology Today 1980*, red. S. J. Baum, G. D. Ledney, D. W. van Bekkum, S. Karger, Basel 1980, 237—243.
- [79] MacVITTIE T. J., McCARTHY K. F., Inhibition of granulopoiesis in diffusion chambers by a granulocyte chalone, *Exp. Hematol.*, **2**: 182—194, 1974.
- [80] MacVITTIE T. J., WALKER R. I., Endotoxin-induced alterations in canine granulopoiesis: colony-stimulating factor, colony-forming cells in culture, and growth of cells in diffusion chambers, *Exp. Hematol.*, **6**: 613—619, 1978.
- [81] MADLE S., OBE G., In vitro testing of an indirect mutagen (cyclophosphamide) with human leukocyte cultures. Activation by a non-enzymatic hydroxylation system (Udenfriend System), *Mutat. Res.*, **49**: 149—151, 1978.
- [82] MARMOR J. B., RUSSELL J. L., MILLER A. M., ROBINSON S. H., Modulation of murine granulocyte proliferation in diffusion chamber cultures, *Blood*, **46**: 39—49, 1975.
- [83] MECK R. A., CARSTEN A. L., KELSCH J. J., Growth of HeLa cells in diffusion chamber cultures in vivo, *Cancer Res.*, **36**: 2317—2320, 1976.
- [84] NETTESHEIM P., MAKINODAN T., CHADWICK C. J., Improved diffusion chamber cultures for cytokinetic analysis of antibody response, *Immunology*, **11**: 427—439, 1966.
- [85] NISKANEN E., CLINE M. J., Growth of mouse and human bone marrow in diffusion chambers in mice. Development of myeloid and erythroid colo-

- nies and proliferation of myeloid stem cells in cyclophosphamide- and erythropoietin-treated mice, *Cell Tissue Kinet.*, 12: 59-70, 1979.
- [86] NISKANEN E., GALE R. P., CHAMPLIN R., CLINE M., GOLDE D. W., Culture of myeloid and erythroid colonies from human fetal liver in vivo and in vitro, [w] *Experimental Hematology Today 1980*, red. S. J. Baum, G. D. Ledney, D. W. van Bekkum, S. Karger, Basel 1980, 265—270.
- [87] NISKANEN E., OKI A., CLINE M. J., GOLDE D. W., Human T-lymphocyte products stimulate human hemopoietic progenitor cell proliferation in diffusion chambers in vivo, *Blood*, 60: 368—372, 1982.
- [88] PACHMANN K., PENNING R., LAU B., RODT H., DORMER P., Characterization of normal human mononuclear blood cells during diffusion chamber (DC) culture with respect to proliferation and expression of T-cell antigen, *Scand. J. Haematol.*, 28: 197—204, 1982.
- [89] PAGE P. L., ROBINSON S. H., Differences in the regulation of murine granulocyte and macrophage growth in diffusion chamber cultures, *Exp. Hematol.*, 9: Suppl. 9: 159, 1981.
- [90] PETRAKIS N. L., DAVIS M., LUCIA S. P., The in vivo differentiation of human leukocytes into histiocytes, fibroblasts and fat cells in subcutaneous diffusion chambers, *Blood*, 17: 109—119, 1961.
- [91] QUESENBERRY P., RAPPEPORT J., FONTEBUONI A., SULLIVAN R., ZUCKERMAN K., RYAN M., Inhibition of murine hematopoiesis by leukemia cells, *N. Engl. J. Med.*, 299: 71—75, 1978.
- [92] REZZESI F. D., Eine Methode zur Züchtung der Gewebe in vivo, *Arch. Exp. Zellforsch.*, 13: 258, 1932.
- [93] ROTHSTEIN G., HUGL E. H., BISHOP C. R., ATHENS J. W., ASHENBRUCKER H. E., Stimulation of granulocytopoiesis by a diffusible factor in vivo, *J. Clin. Invest.*, 50: 2004-2007, 1971.
- [94] SENSENBRENNER L. L., STEELE A. A. SANTOS G. W., Recovery of hematologic competence without engraftment following attempted bone marrow transplantation for aplastic anemia: report of a case with diffusion chamber studies, *Exp. Hematol.*, 5: 51—59, 1977.
- [95] SHADDUCK R. K., CARSTEN A. L., CHIKKAPPA G., CRONKITE E. P., GERARD E., Inhibition of diffusion chamber (DC) granulopoiesis by anti-CSF serum, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 158: 542—550, 1978.
- [96] SHARKIS S. J., AHMED A., SENSENBRENNER L. L., JĘDRZEJCZAK W. W., GOLDSTEIN A. L., SELL K. W., The regulation of hemopoiesis: effect of thymosin or thymocytes in a diffusion chamber, [w] *Experimental Hematology Today 1978*, red. S. J. Baum, G. D. Ledney, Springer-Verlag, New York 1978, 17—22.
- [97] SQUIRES D. J. P., The growth of human bone marrow in diffusion chambers, *Brit. J. Haematol.*, 29: 89—97, 1975.
- [98] SQUIRES D. J. P., LAMERTON L. F., The effect of various cytotoxic agents on bone marrow progenitor cells as measured by diffusion chamber analysis, *Brit. J. Haematol.*, 29: 31—42, 1975.
- [99] STEELE A. A., SENSENBRENNER L. L., YOUNG M. G., Growth and differentiation of normal and leukemic human bone marrow cells cultured in diffusion chambers, *Exp. Hematol.*, 5: 199—211, 1977.
- [100] STEINBERG H. N., HANDLER E. S., HANDLER E. E., Assessment of

- erythrocytic and granulocytic colony formation in an in vivo plasma clot diffusion chamber culture system, *Blood*, **47**: 1041—1051, 1976.
- [101] STEINBERG H. N., TRACY M., MACIAG T., WEINSTEIN R., STEMERMAN M., ROBINSON S. H., Differentiation of a rat-derived promegakaryoblast-like cell line in in vivo cultures, *Exp. Hematol.*, **8**: Suppl. 7: 142, 1980.
- [102] STEINBERG H. N., NUNEZ M. T., ROBINSON S. H., Differentiation of leukemic cell lines HL-60 and K562 in diffusion chamber cultures, *Exp. Hematol.*, **10**: Suppl. 11: 86, 1982.
- [103] STEINBERG H. N., PAGE P. L., ROBINSON S. H., Two classes of murine granulocyte progenitor cells expressed in plasma clot diffusion chamber cultures, *Blood*, **59**: 838—843, 1982.
- [104] STOJANOVIĆ N., JOVČIĆ G., PETROVIĆ N., HAJDUKOVIĆ S., Experimental inflammation and granulopoiesis in rats in vivo and in bone marrow cultivated in diffusion chambers, [w] *Experimental Hematology Today 1980*, red. S. J. Baum, G. D. Ledney, D. W. van Bekkum, S. Karger, Basel 1980, 245—253.
- [105] SULLIVAN R., ZUCKERMAN K. S., QUESENBERRY P. J., The role of colony stimulating activity in modulating murine diffusion chamber granulopoiesis, *Brit. J. Haematol.*, **44**: 365—374, 1980.
- [106] SYMANN M., FONTEBUONI A., QUESENBERRY P., HOWARD D., STOHLMAN F. Jr., Fetal hemopoiesis in diffusion chamber cultures. I. The pattern of pluripotent cell growth, *Cell Tissue Kinet.*, **9**: 41—49, 1976.
- [107] SYMANN M., ANCKAERT M. A., CORDIER A., RODHAIN J., SOKAL G., Murine yolk sac hematopoiesis studied with the diffusion chamber technique, *Exp. Hematol.*, **6**: 749—760, 1978.
- [108] THEODORU N. A., HOWELL S. L., An assessment of diffusion chambers for use in pancreatic islet cell transplantation, *Transplantation*, **27**: 350—353, 1979.
- [109] THIEL E., LAU B., RODT H., JÄGER G., PACHMANN K., Appearance of B- or T-lymphocyte markers after diffusion chamber culture of acute lymphoblastic leukemia cells, *Blut*, **42**: 315—322, 1981.
- [110] THIERFELDER S., LAU B., HOFFMAN-FEZER G., THIEL E., RODT H., DÖRMER P., Effect of antibodies on cells cultured in diffusion chambers (DC), [w] *Experimental Hematology Today 1980*, red. S. J. Baum, G. D. Ledney, D. W. van Bekkum, S. Karger, Basel 1980, 279—282.
- [111] TYLER W. S., NISKANEN E., STOHLMAN F. Jr., KEANE J., HOWARD D., The effect of neutropenia on myeloid growth and the stem cell in an in vivo culture system, *Blood*, **40**: 634—645, 1972.
- [112] TYLER W. S., Diffusion chamber cultures of murine bone marrow, [w] *Second International Workshop "Hemopoiesis in Culture"*, red. W. A. Robinson, DHEW Publication No (NIH) 74—205, 1973, 455—458.
- [113] VILPO J. A., KIVINIEMI K., RYTOMAA T., Inhibition of granulopoiesis by endogenous granulocyte chalone studied with the diffusion chamber technique, *Eur. J. Cancer*, **9**: 515, 1973.
- [114] VILPO J. A., VILPO L., Growth of haematopoietic cells of mouse fetal liver in diffusion chambers, *Acta Haematol.*, **55**: 224—229, 1976.
- [115] WALKER R. I., HERION J. C., DALLDORF F. G., WILLEMZE R., PALMER J. G., Local effects on diffusion chamber hematopoiesis, *Blood*, Suppl. **154**: 163a, 1979.

- [116] WALTHER F., SCHOPOW K., Human erythropoiesis in diffusion chambers, *Scand. J. Haematol.*, **23**: 367—372, 1979.
- [117] WEINBERG S. R., STOHLMAN F. Jr., Growth of yolk sac cells cultured in vivo, *Brit. J. Haematol.*, **32**: 543—555, 1976.
- [118] WEINBERG S. R., STOHLMAN F. Jr., Radiosensitivity of hematopoietic stem cells in diffusion chamber cultures of the murine yolk sac and adult medullary tissue, *Radiation Res.*, **68**: 84—92, 1976.
- [119] WEINBERG S. R., STOHLMAN F. Jr., Factors regulating yolk sac hematopoiesis in diffusion chambers: various types of sera, cyclophosphamide, irradiation and long-term culture, *Exp. Hematol.*, **5**: 374—385, 1977.
- [120] WIKTOR-JĘDRZEJCZAK W., AHMED A., SHARKIS S. J., SELL K. W., SZCZYLIK C., Studies of antigenic characteristics of cells interacting on central levels of hemopoiesis, *Exp. Hematol.*, **8**: Suppl. 7: 62, 1980.
- [121] WIKTOR-JĘDRZEJCZAK W., SCHLAGEL C. J., AHMED A., LEACH W. M., WOODY J. N., Possible humoral mechanism of 2450 MHz microwave-induced increase in complement receptor positive cells, *Bioelectromagnetics*, **2**: 81—84, 1981.
- [122] WILLEMZE R., WALKER R. I., HERION J. C., PALMER J. G., Marrow culture in diffusion chambers in rabbits. I. Effect of mature granulocytes on cell production, *Blood*, **51**: 21—31, 1978.
- [123] WILLEMZE R., WALKER R. I., HERION J. C., PALMER J. G., Marrow culture in diffusion chambers in rabbits. II. Effect of competing demands for red cell and white cell production on cell growth, *Blood*, **51**: 1129—1135, 1978.
- [124] WILLEMZE R., WALKER R. I., HERION J. C., PALMER J. G., Marrow culture in diffusion chambers in rabbits. III. Effect of endotoxin and leukocyte products on cell production, *Am. J. Hematol.*, **7**: 33—45, 1979.
- [125] WILLEMZE R., WALKER R. I., HERION J. C., PALMER J. G., Normal marrow cell growth in diffusion chambers: importance of host microcirculation, *Exp. Hematol.*, **8**: Suppl. 7: 95, 1980.
- [126] WILLEMZE R., WALKER R. I., WAAYER J. L. M., HERION J. C., PALMER J. G., Effects of leukocyte products and endotoxin on granulopoiesis in diffusion chambers implanted in rabbits, [w] *Experimental Hematology Today 1980*, red. S. J. Baum, G. D. Ledney, D. W. van Bekkum, S. Karger, Basel 1980, 231—235.
- [127] WILLEMZE R., WAAYER J. L. M., de WEERT S., Improved harvesting method for the in vivo diffusion chamber colony assay using human bone marrow cells, *Exp. Hematol.*, **9**: Suppl. 9: 76, 1981.

Nadestano: 9 kwietnia 1983.

Przyjęto: 9 czerwca 1983.

Adres autorów: ul. Szaserów 128, 00—909 Warszawa.

ZNACZENIE POZNAWCZE I PRAKTYCZNE SYNCHRONIZACJI KOMÓREK W FAZACH CYKLU MITOTYCZNEGO

THEORETICAL AND PRACTICAL VALUE OF CELL SYNCHRONIZATION IN MITOTIC CYCLE PHASES

Jadwiga KOZIOROWSKA

Zakład Leków Witaminowych Instytutu Leków w Warszawie

Streszczenie. Szeregiem metod można uzyskać synchronizację komórek w poszczególnych fazach cyklu mitotycznego. Synchronizacja komórek ułatwia badania mechanizmu działania czynników egzogennych i badania dotyczące mechanizmów kontroli wzrostu. Aspekt praktyczny synchronizacji wiąże się z chemioterapią nowotworów.

Abstract. There are several methods allowing cell synchronization in different cell cycle phases. Cell synchronization facilitates studies on the mechanism of action of exogenous agents as well as studies on the mechanism of cell growth. The practical aspect of cell synchronization is tied up with cancer chemotherapy.

W cyklu mitotycznym komórek Eucariota wyróżnia się szereg następujących po sobie procesów biochemicznych [66]. Decydują one o możliwości realizacji poszczególnych funkcji. W zależności od rodzaju tych funkcji cykl mitotyczny podzielono na 4 fazy. Okres, który dzieli zakończenie procesu mitozy od inicjacji replikacji DNA, nazwano fazą G_1 , okres replikacji DNA — fazą S, okres między fazą S a profazą — fazą G_2 . Ostatnią fazą cyklu komórkowego jest mitoza. Populacje komórek hodowanych *in vitro* są w okresie rozplemu na ogół asynchroniczne, tzn. składają się z subpopulacji komórek w różnych fazach cyklu mitotycznego. Możliwość synchronizacji komórek w jednej z faz ułatwia wyznaczenie punktów w cyklu mitotycznym wrażliwych na działanie czynników egzogennych i również ułatwia próby wyjaśniania mechanizmów kontroli wzrostu. Efekty biologiczne indukowane przez związki fazowo zależne ulegają nasileniu, jeżeli populacje komórek są zsynchronizowane we wrażliwej na ich działanie fazie.

METODY

Z punktu widzenia fizjologii najbardziej zadowalające są metody synchronizacji komórek, które nie prowadzą do przerwania prawidłowego przebiegu cyklu mitotycznego ani do uszkodzenia makrocząsteczek. Metoda selektywnej synchronizacji komórek w fazie mitozy [64] znajduje zastosowanie wyłącznie w przypadku hodowli komórek na podłożu stałym. W tego rodzaju hodowlach komórki w fazie mitozy zaokrąglają się, tracą większość punktów przyczepu i odrywają się od powierzchni naczyń hodowlanych. Delikatnym wytrząsaniem hodowli można uzyskać populację, w której około 95% komórek znajduje się w fazie mitozy. Inny sposób synchronizacji selektywnej polega na oddzielaniu komórek w fazie G_1 przez wirowanie w gradiencie albuminy bydlęcej [55]. Metody służące do synchronizowania komórek przez związki chemiczne, które działając na procesy biochemiczne specyficzne dla danej fazy, powodują przerwanie normalnego cyklu życiowego. Może być ono jednoznaczne z zahamowaniem proliferacji, zaś w przypadku wystąpienia uszkodzeń makrocząsteczek zahamowanie proliferacji może być nieodwracalne.

Synchronizację komórek w metafazie można uzyskać dzięki traktowaniu rozmnażających się komórek kolchicyną, winblastyną lub innymi związkami antymitotycznymi. Po ich usunięciu uzyskuje się populacje komórek zsynchronizowanych i zdolnych do podziału, ale część komórek ginie w wyniku uszkodzeń.

Metodą najczęściej stosowaną w celu hamowania proliferacji w fazie S jest traktowanie komórek hydroksymocznikiem lub 5-fluoro-2'-dezoksyurydyną [5-FdUrd]. Po usunięciu tych związków komórki natychmiast wchodzi w fazę S, zachowując zdolność do jednego lub dwukrotnego podziału w ramach normalnego cyklu. Frakcja komórek nagromadzających się we wczesnej fazie S ulega zwiększeniu o ile stosuje się, na przykład, podwójną blokadę tymidyną i hydroksymocznikiem. Hydroksymocznik i 5-FdUrd pozostawiają ślady swego działania w komórce na skutek bezpośredniej interferencji z polimeryzacją łańcucha polidezoksyrybonukleotydowego. Działając pośrednio powodują zubożenie puli prekursorów trójfosforanów dezoksyrybonukleozydów, co prowadzi do akumulacji nowo utworzonego, jednopasmowego DNA o niskim ciężarze cząsteczkowym. Efektem ich działania mogą być ponadto zmiany w strukturze chromatyny [55]. Komórki zsynchronizowane w fazie S przez jeden czynnik blokujący na ogół nie przechodzą do następnej fazy cyklu mitotycznego jako hodowle synchroniczne. W wyniku stosowania podwójnej blokady można doprowadzić do synchronizacji komórek w następujących po sobie fazach, co umożliwia badanie procesów biochemicznych np. w fazie G_2 . Spostrzeżenie to jest cenne z uwagi na

fakt, że w przypadku stosowania związków chemicznych powodujących w sposób bezpośredni zahamowanie proliferacji komórek w fazie G_2 jest ono nieodwracalne [43].

Faza G_1 jest fazą o znaczeniu decydującym dla zachowania prawidłowej kontroli proliferacji i jednocześnie fazą najbardziej podatną zarówno na działanie blokujące znacznej liczby czynników egzogennych, jak i zmian w składzie otaczającego środowiska.

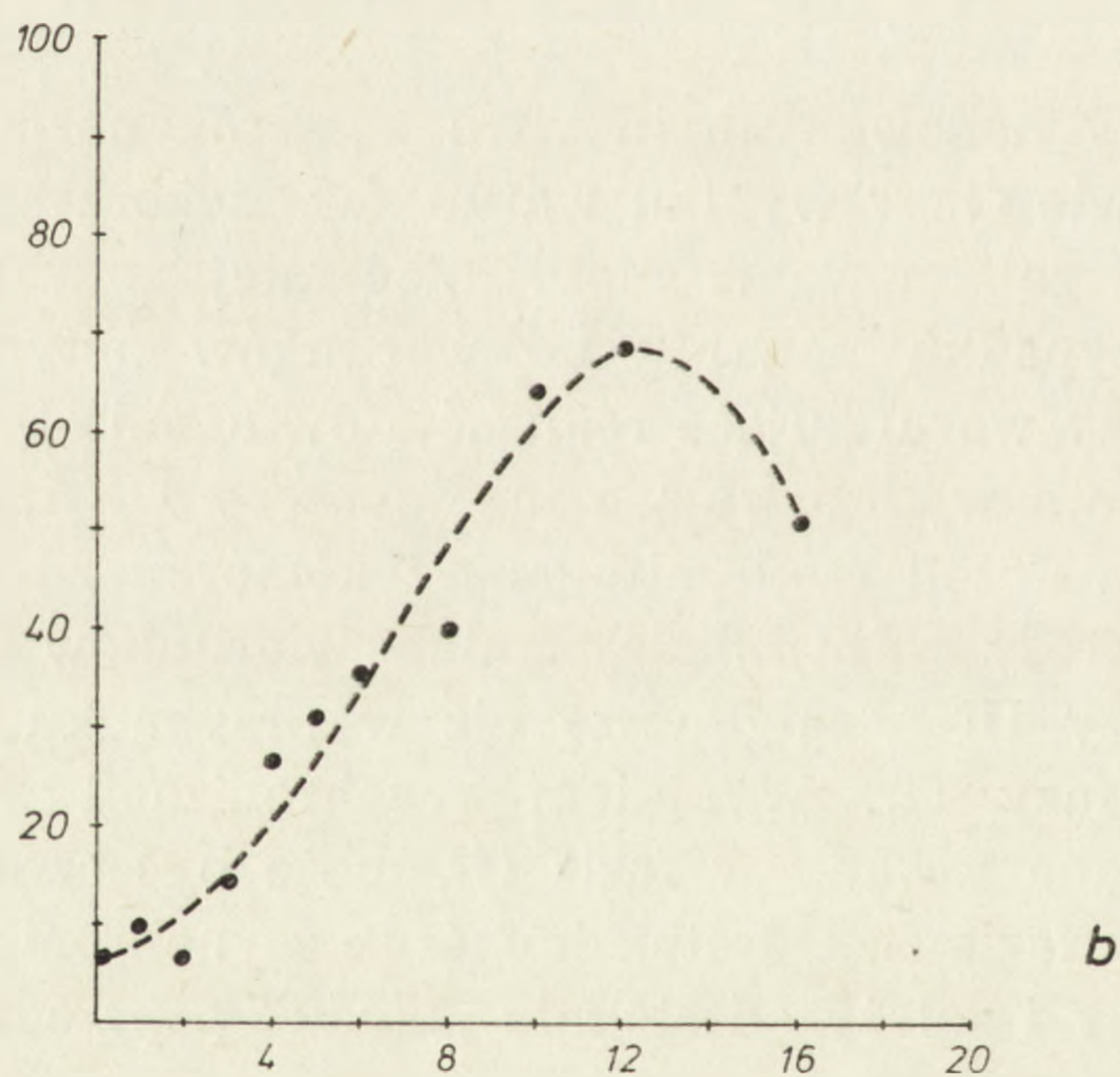
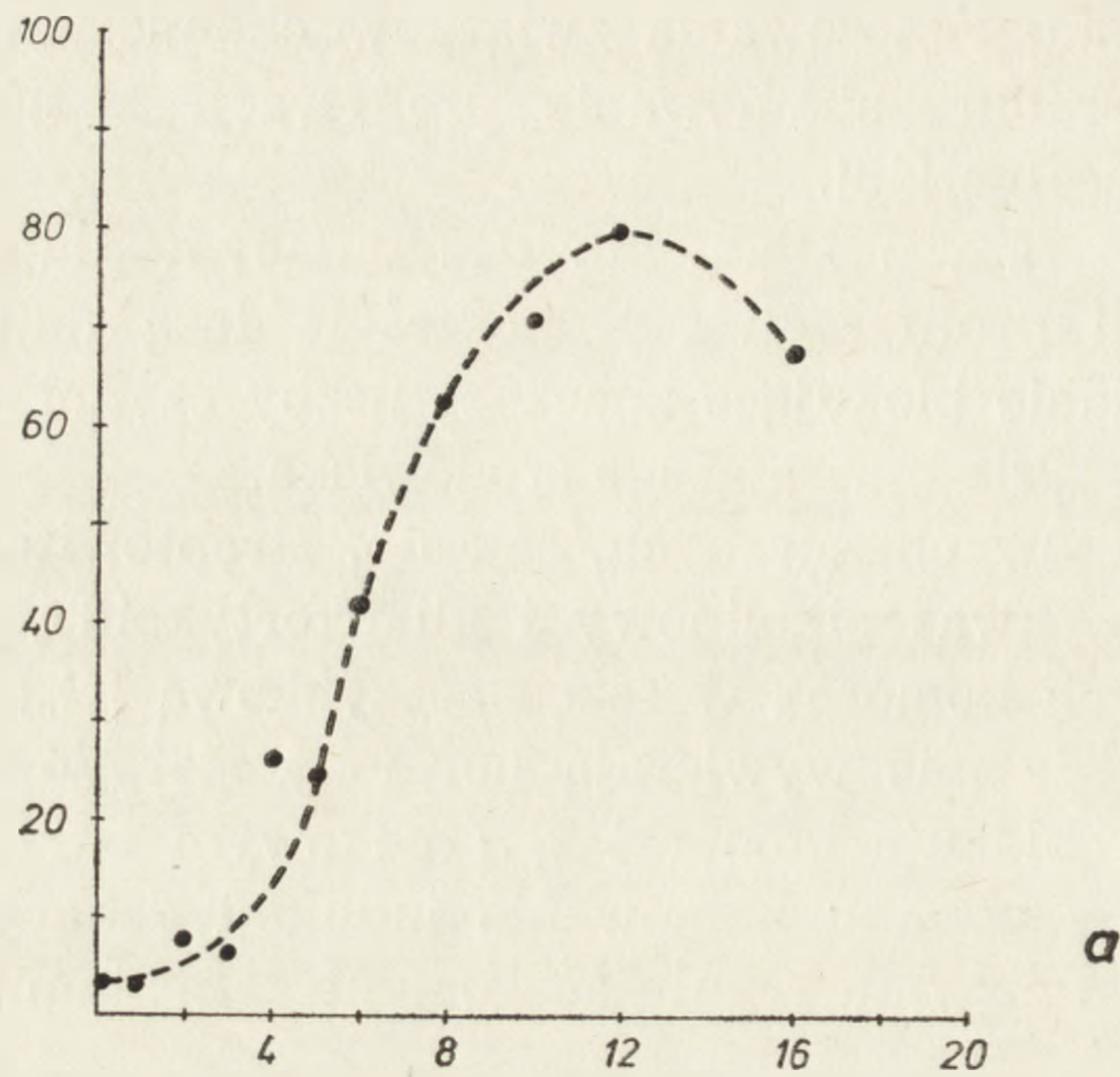
Szereg związków chemicznych, jak np. streptowitacyna A, kofeina, konkanawalina A, kwas pikolinowy i glikokortykoidy, powoduje przejście proliferujących komórek w fazę spoczynkową [G_0]. Jest interesujące, że podobne działanie wywierają hormony sterydowe [50] i interferon [60]. Retinol blokuje komórki w środkowym okresie fazy G_1 [17], prawdopodobnie w wyniku hamowania indukcji dekarboksylazy ornitynowej, kluczowego enzymu regulującego syntezę poliamin.

FAZA G_1 a REGULACJA KONTROLI WZROSTU

Cykl życiowy hodowanych *in vitro* komórek normalnych ulega zahamowaniu w fazie G_1 w wyniku warunków niekorzystnych dla proliferacji, przy czym zahamowanie może mieć miejsce w różnych okresach fazy G_1 . W przypadku powrotu do warunków optymalnych komórki wznawiają procesy warunkujące realizację cyklu mitotycznego. Najpierw wchodzi w stadium wyprzedzające fazę syntezy DNA, a następnie w fazę syntezy DNA. Jeżeli cykl mitotyczny komórek zostaje zahamowany w fazie G_0 , to okresy czasu między zmianą warunków odżywczych a rozpoczęciem syntezy DNA są dłuższe niż w przypadku ingerencji w innych okresach fazy G_1 . Wynikiem synchronizacji komórek, których rozplęm został zahamowany w fazie G_1 , może być częściowa synchronizacja komórek w fazie S. Odsetek komórek zsynchronizowanych w fazie S może być różny i zależy od stopnia „głodu” poprzedzającego odblokowanie (ryc. 1).

Do niekorzystnych lub suboptymalnych warunków powodujących zahamowanie cyklu komórek w fazie G_1 zaliczyć można znaczną gęstość populacji [10, 14, 31, 50], zmniejszenie zawartości surowicy w pożywce [3, 29, 30], brak pewnych aminokwasów [3, 6, 11, 12, 28, 37, 47, 48] lub innych składników pokarmowych, jak: fosforany, glukoza [14, 20] i lipoproteidy [27]. Hodowane *in vitro* komórki ulegają synchronizacji w fazie G_1 w obecności pewnych hormonów [1], a także przy zmianie warunków hodowli [41].

Posługując się komórkami 3T3 przeprowadzono badania dotyczące czynników zawartych w surowicy i niezbędnych do inicjacji syntezy DNA. Proliferacja komórek hodowanych w pożywce z surowicą dializowaną jest

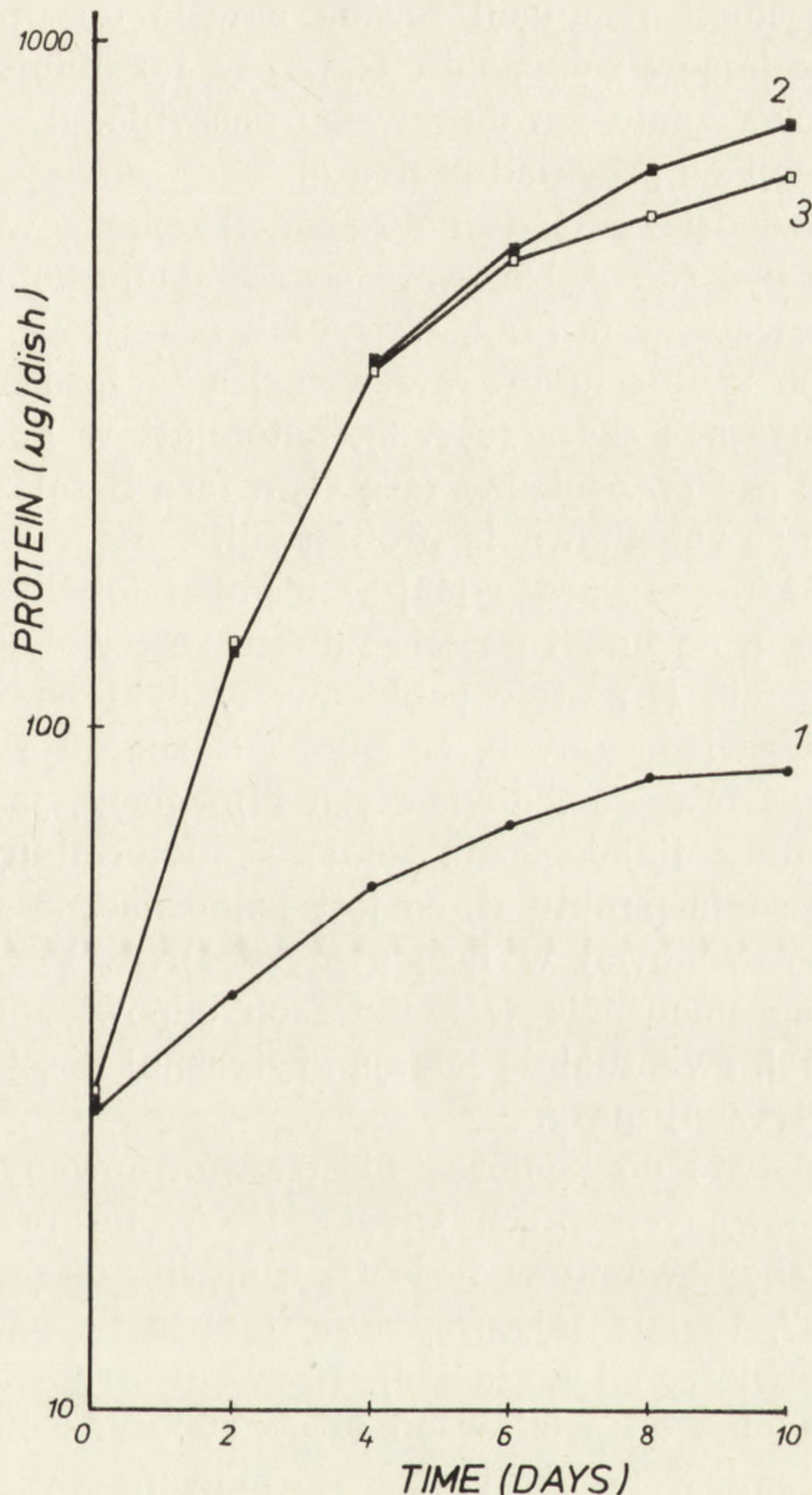


Ryc. 1. Zmiany w natężeniu syntezy DNA w komórkach hodowanych w pożywce (a) zawierającej 0.1% leucyny i (b) bez leucyny; według Everharta i Prescottta [1972]

upośledzona (ryc. 2). Efekt ten wiąże się z usunięciem przez dializę niewielkich ilości wolnych aminokwasów, przede wszystkim tryptofanu.

Możliwość inicjacji syntezy DNA zależy od obecności insuliny [22, 24], glikokortykoidów [13, 64] lub wzrostowego czynnika fibroblastycznego [FGF] [16].

Mechanizm hamowania proliferacji komórek, determinowany znacz-



Ryc. 2. Zahamowanie rozplemu komórek w pożywce z surowicą dializowaną. Mysie komórki LM hodowano w pożywkach zawierających 1—10% surowicy dializowanej, 2—10% surowicy niedializowanej przechowywanej w temp. 37°C, 3—10% surowicy niedializowanej przechowywanej w temp. 4°C; według Brunnera [1973]

ną gęstością populacji, nie jest dostatecznie jasny. Są opinie, że znaczną rolę może odgrywać, na przykład, zubożenie pożywki w składniki pokarmowe [10, 14, 18, 65] i ograniczenie powierzchni naczynia hodowlanego niezbędnej do rozplemu [10, 65], wzajemne oddziaływanie komórek [57], zmniejszenie możliwości dyfuzji czynników pokarmowych [15, 61] lub zmniejszenie powierzchni komórek omywanej przez pożywkę. Dla wielu rodzajów komórek przejście w fazę spoczynku zaczyna się stopniowo przed tym nim powierzchnia naczyń hodowlanych zostaje pokryta komórkami [57]. Komórki, które zostały zablokowane w fazie G_1 , w wy-

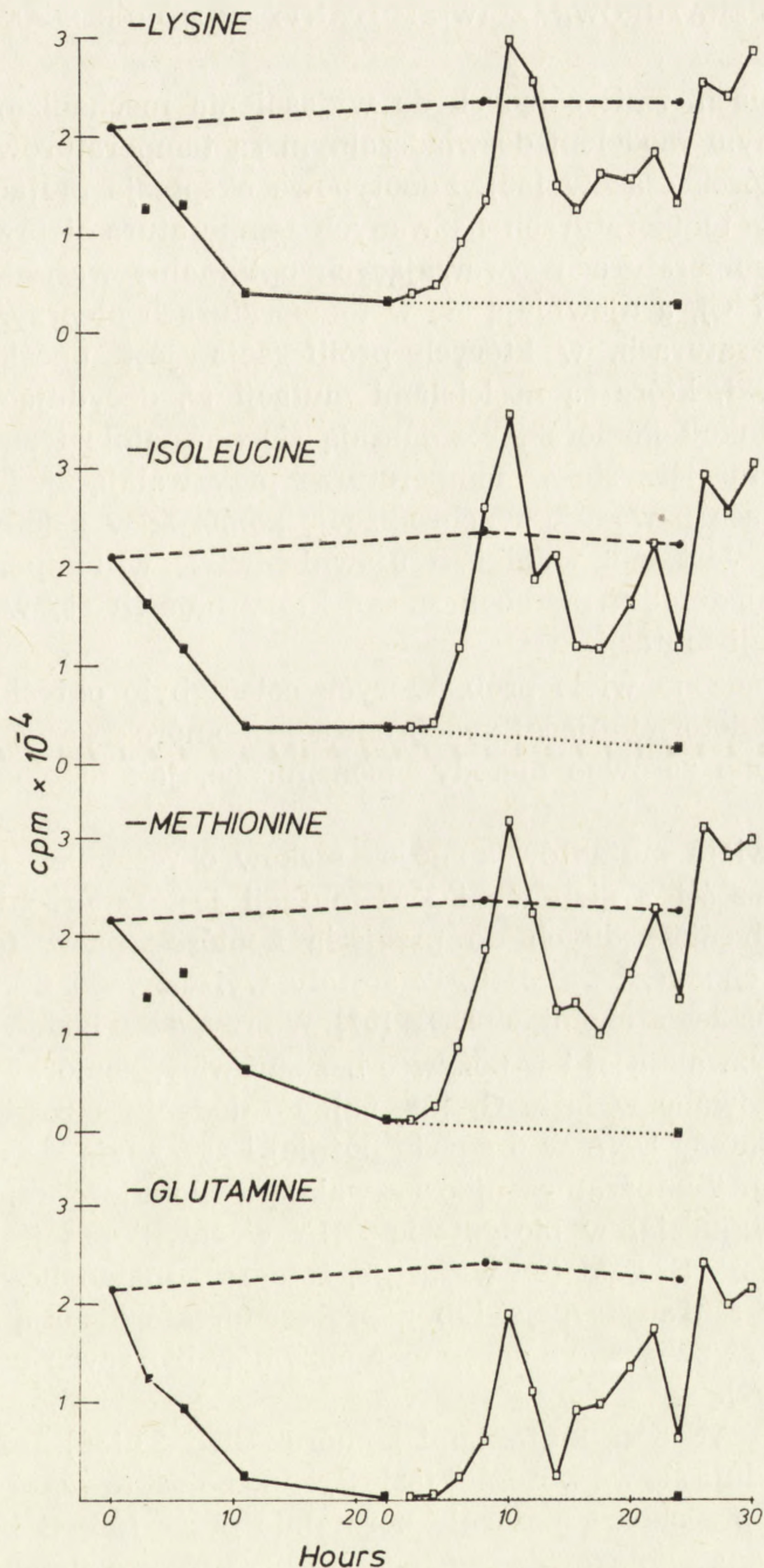
niku znacznej gęstości populacji można zmusić do progresji w cyklu mitotycznym, poddając je działaniu trypsyny i zmniejszając liczbę komórek przy wprowadzaniu ich do nowego naczynia. In situ można zmusić je do proliferacji na przykład proteazą.

Sposób odpowiedzi komórek na różne niedobory w otaczającym je środowisku może być różny. Na przykład populacje komórek BHK, które zostały zablokowane w fazie G_1 w wyniku braku surowicy, izoleucyny lub glutaminy, po usunięciu braków wchodzą w fazę syntezy DNA po takich samych okresach czasu (ryc. 3), natomiast w hodowlach z płuca chomika wielkość przerwy między fazą G_0 a fazą S zależy od warunków odpowiedzialnych za zahamowanie proliferacji.

Przedstawiona przez Pardee [42] w piśmiennictwie w 1974 r. hipoteza robocza wniosła do nauki pojęcie punktu restrykcyjnego R . Zgodnie z hipotezą w punkcie R zostaje zablokowany cykl podziałowy. Istnieje wiele dowodów doświadczalnych, że punkt R znajduje się w fazie G_1 .

Jak dotychczas brak jest dokładnych informacji, jakie procesy biochemiczne lub stany fizjologiczne komórek determinują prawdopodobieństwo przekroczenia punktu R , co jest jednoznaczne z przejściem komórek z fazy spoczynkowej w fazę syntezy DNA. Przypuszcza się, że niezbędne jest nagromadzenie w komórkach odpowiedniej ilości specyficznego białka [53], ewentualnie jakiejś krytycznej ilości RNA lub osiągnięcie jakiejś krytycznej masy.

W przeciwieństwie do komórek niestransformowanych rozplem komórek stransformowanych przez wirusy DNA, na przykład wirusem SV₄₀, nie ulega zahamowaniu w fazie G_1 z chwilą osiągnięcia dużej gęstości „wysycenia”, tzn. takiej, przy której duża liczba komórek przypada na 1 cm² powierzchni szkła [35]. Komórki stransformowane przez wirusy DNA są zdolne do proliferacji w pożywkach z małą zawartością surowicy [4], natomiast komórki stransformowane przez wirusy RNA i przez rakotwórcze związki chemiczne, hodowane w pożywce z niską zawartością surowicy, nabywają cechy komórek normalnych w tym sensie, że ulegają zablokowaniu w fazie G_0 lub G_1 , podobnie jak komórki normalne [21, 49]. W komórkach stransformowanych przez wirusy DNA produkt wirusowego genu A jest inicjatorem syntezy komórkowego DNA [9, 25, 34, 54]. Prawdopodobnie umożliwia on przejście komórek przez punkt restrykcyjny i nie dopuszcza do synchronizacji komórek w fazie G_1 [45]. Są opinie, że decydującą rolę odgrywają tu różnice w zależności od obecności czynników wzrostowych w środowisku komórek normalnych i komórek stransformowanych. Ogólnie biorąc możliwość przejścia komórek nowotworowych i komórek stransformowanych w fazę spoczynkową zależy zarówno od rodzaju komórek, jak i warunków środowiskowych [2, 19, 30].



Ryc. 3. Synteza DNA w różnych okresach czasu po usunięciu aminokwasów i ich dodaniu. Zmiany w inkorporacji tymidyny znakowanej trytem oceniano przez 24 godziny w przerwach dwugodzinnych w okresie głodzenia i przez 30 godzin po dodaniu pożywki; według Melvina i wsp. [1979]

TEMPERATUROWRAŻLIWE MUTANTY KOMÓREK SSAKÓW

W badaniach, zmierzających do wyjaśnienia mechanizmów kontroli wzrostu, cennym modelem doświadczalnym są temperaturowrażliwe mutanty *ts* komórek ssaków [55]. Fenotypowe ekspresje mutacji *ts* są zamaskowane w temperaturach nazwanych temperaturami przyzwalającymi, tzn. w temperaturach stwarzających optymalne warunki dla proliferacji (np. 37°C), a ujawniają się w temperaturach nieprzyzwalających, tzn. w temperaturach, w których proliferacja jest upośledzona (np. 40°C). Komórki, które są nosicielami mutacji *ts*, decydującej o jakiejś zmianie w funkcji komórek, rozmnażają się normalnie i zachowują się jak komórki macierzyste w temperaturze przyzwalającej. Temperatura nieprzyzwalająca powoduje synchronizację komórek w jednej z faz cyklu życiowego. Jest ona wynikiem ujawnienia się w temperaturze nieprzyzwalającej defektu metabolicznego, który pojawił się w komórkach w konsekwencji mutacji.

Przeprowadzono wiele prób, których celem było określenie zmiany metabolicznej determinującej synchronizację komórek w tej a nie innej fazie. Stosowano zarówno metody biochemiczne, jak fizjologiczne i wirusologiczne.

Spośród wielu mutantów komórek ssaków określonych jako mutanty *ts* w większości z nich wynikiem mutacji jest zaburzenie procesów metabolicznych niezbędnych do przejścia komórek przez fazę G_1 .

Komórki chomicze *ts* CH-K-12 zostały wyizolowane z klonu WgJA komórek chińskiego chomika DON [51]. W przypadku hodowania w temperaturze przyzwalającej i w pożywce bez surowicy, komórki *ts* CH-K-12 zostają zablokowane w fazie G_1 [33, 52]. Po dodaniu surowicy wchodzi one w fazę syntezy DNA w 6 godzin później i zaczynają się dzielić w 15 godzin później. Temperatura nieprzyzwalająca blokuje derepresję enzymów biorących udział w biosyntezie DNA w chwili przejścia komórek z fazy G_1 do fazy S. Fakt ten wskazuje, że defekt metaboliczny komórek jest związany z transkrypcją lub z procesami, które mają miejsce po transkrypcji i są związane z derepresją enzymów biorących udział w replikacji DNA [54].

Komórki *ts* AF 8 są mutantami komórek BHK-21 [36]. Jeżeli komórki *ts* AF 8 znajdują się we wczesnej fazie S, to po potraktowaniu ich hydroksymocznikiem przechodzą pozornie normalnie przez fazę S bez względu na to czy zostaną odblokowane w temperaturze przyzwalającej, czy nieprzyzwalającej. O ile te same komórki są hodowane w temperaturze nieprzyzwalającej i ulegają synchronizacji w fazie G_1 w wyniku usunięcia z pożywki surowicy, to po dodaniu surowicy nie wchodzi w fazę syntezy DNA. Jeżeli jednak zostaną zablokowane w fazie G_1 w konsekwen-

cji usunięcia z pożywki izoleucyny, wchodzą w fazę syntezy DNA. Obserwacje te sugerują, że punkt czasowy, w którym ulega zahamowaniu proliferacja mutantów *ts* AF 8 w temperaturze nieprzystawalającej, znajduje się w fazie G_1 pomiędzy punktami, w których ma miejsce zahamowanie proliferacji tych samych komórek w wyniku braku w pożywce surowicy lub braku leucyny.

Komórki *ts* AF 8 hodowane w temperaturze przystawalającej ulegają transformacji po zakażeniu wirusem polyoma. Komórki stransformowane *Py ts* AF 8 kontynuują syntezę DNA w temperaturze nieprzystawalającej i rozmnażają się przez okres o około 30 godzin dłuższy niż to ma miejsce z niestransformowanymi komórkami rodzicielskimi [7]. Obecność genomu wirusa polyoma niweluje zatem na pewien krótki czas defekt komórek *ts* AF 8. Do podobnych wniosków doprowadziły badania z dwoma innymi wirusami DNA, ludzkim adenowirusem [40] i wirusem herpes simplex [59].

Komórki chemiczne *ts* K/34C hodowane w temp. 40°C ulegają synchronizacji w fazie G_1 mniej więcej na 6 godzin przed przejściem z fazy G_1 do fazy S. Drugi punkt blokady ma miejsce w fazie G_2 . Specyficzność defektu komórek *ts* K/34C została ujawniona dzięki różnicom w sposobie replikacji różnych wirusów w komórkach hodowanych w temperaturze nieprzystawalającej. Mimo zastosowania tego rodzaju temperatury replikacja mengowirusa przebiegała normalnie, natomiast replikacja VSV i wirusa Sindbis ulegała całkowitemu zahamowaniu. Replikacja mengowirusa jest możliwa jedynie w warunkach nieupośledzonej syntezy RNA i białka, natomiast do replikacji wirusów VSV i Sindbis niezbędna jest prawidłowo przebiegająca synteza glikoprotein [5, 67]. Można zatem przypuszczać, że defekt mutantów jest związany z syntezą glikoprotein. Funkcja *ts* w komórkach *ts* K/34C została zidentyfikowana jako reakcja, w wyniku której kompleks oligosacharydowy jest przenoszony z przenośnika dolicholo-lipidowego na grupę aminową akceptora reszty asparaginianowej syntetyzowanych łańcuchów polipeptydowych, z których powstają glikoproteidy [44]. Wyniki dotychczasowych badań pozwalają sądzić, że punkt czasowy, w którym następuje zablokowanie komórek w fazie G_1 , znajduje się między punktem czasowym, w którym rozplem komórek ulega zahamowaniu w wyniku braku surowicy w pożywce i punktem, w którym ma miejsce indukcja dekarboksylazy ornitynowej, to znaczy w okresie między 10 a 2 godziną przed przejściem komórek z fazy G_1 do fazy S [26]. Wyprzedza on zatem główny proces fazy G_1 , tzn. derepresję aparatu replikacji chromatyny monitorowanej przez syntezę dekarboksylazy ornitynowej, kluczowego enzymu w biosyntezie poliamin [43]. Mutacja komórek *ts* K/34C budzi szczególne zainteresowanie, ponieważ dotyczy ona biogenezy i funkcji

błony. Zablokowanie komórek hodowanych w temperaturze nieprzyzwalającej w fazie G_1 lub fazie G_2 może być powodowane przez obarczone błędami procesy metaboliczne w błonie plazmatycznej. Wydaje się, że tego rodzaju błędami charakteryzuje się wiele mutantów typu fazy G_1 .

Niektóre temperaturowrażliwe mutanty ulegają synchronizacji w fazie mitozy [55]. Na przykład komórki chomicze *ts 655* zostają zablokowane w środkowym okresie profazy. Kondensacja chromatyny ma miejsce w ciągu 60—70 godzin, jednakże nie tworzą się chromosomy mitotyczne, zamiast tego chromatyna ulega postępującej kondensacji i tworzy duże nieregularne masy. Obserwacje te sugerują, że defekt chomiczych komórek *ts 655* odnosi się do układu mikrotubul, który wyznacza układ chromatyny w konfiguracji metafazalnej i następnie jej ruch wzdłuż włókien wrzeciona. Wydaje się, że w temperaturach nieprzyzwalających zahamowane zostaje wbudowywanie kwaśnych aminokwasów do białka.

Inne jeszcze temperaturowrażliwe mutanty komórek ssaków, hodowane *in vitro* w temperaturze nieprzyzwalającej, zostają zablokowane w fazie S. Dotychczasowe badania pozwoliły na identyfikację i izolację szeregu białek biorących udział w procesie biosyntezy DNA i scharakteryzowaniu szeregu specyficznych dla tego procesu reakcji, ale nie ma jeszcze pełnego obrazu dotyczącego przebiegu procesów w fazie S i ich interakcji z innymi procesami komórkowymi [68]. Badanie mutantów *ts* może być niezwykle pomocne w uzupełnieniu brakujących wiadomości. Do wykazania, że komórki zostają zablokowane w temperaturze nieprzyzwalającej w jakimś stanie w czasie fazy syntezy DNA stosuje się standardowe metody fizjologiczne i biochemiczne. Bliższe określenie defektu polega na udowodnieniu, że jakiś proces związany z replikacją DNA jest unieczynniany przez temperaturę lub na przykład na udowodnieniu, że jakiś specyficzny enzym biorący udział w replikacji DNA jest wrażliwy na temperaturę *in vivo* i *in vitro*.

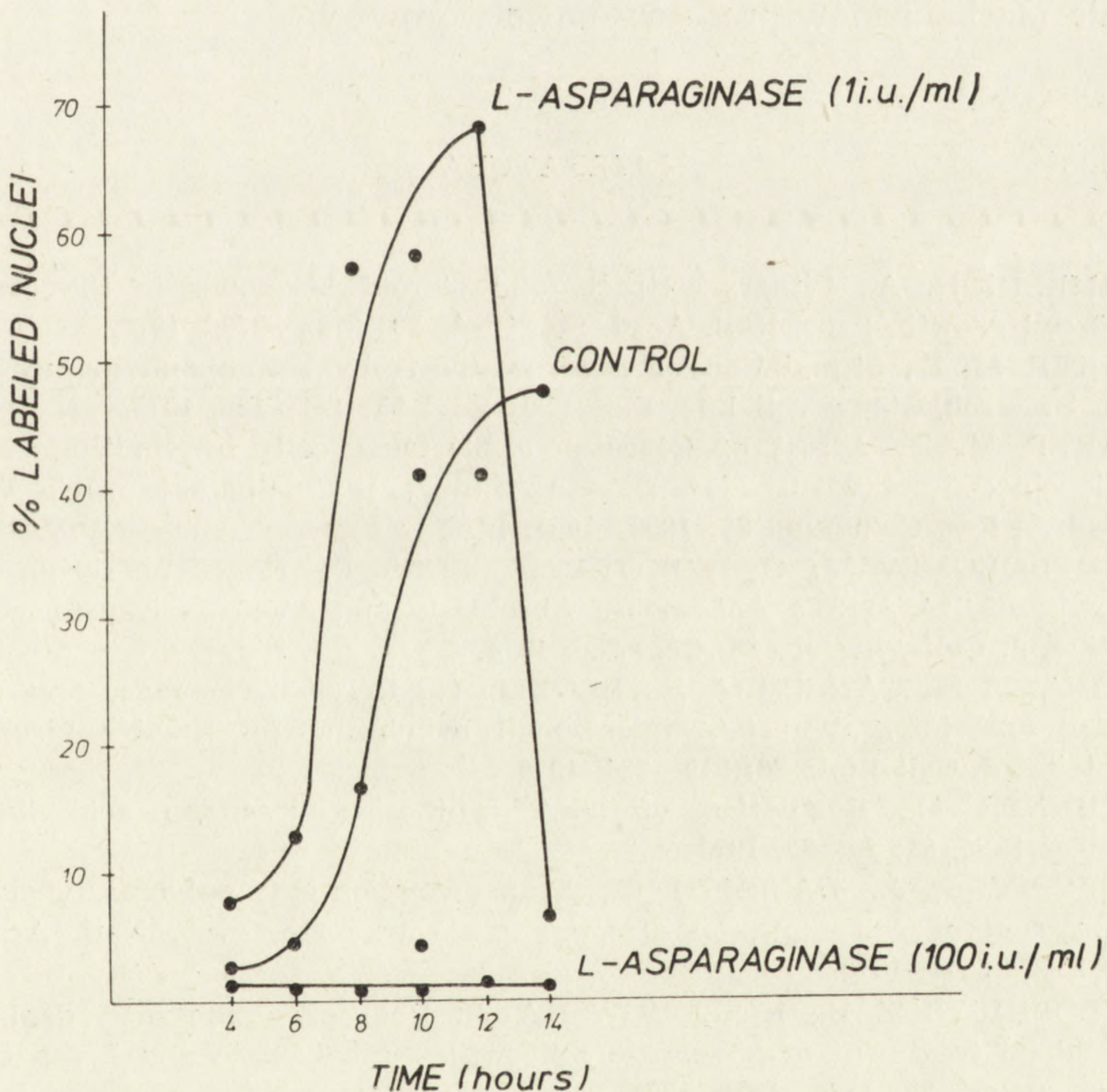
POTĘGOWANIE EFEKTÓW DZIAŁANIA ZWIĄZKÓW FAZOWO ZALEŻNYCH

Synchronizacja komórek może potęgować efekty działania związków chemicznych, o ile związki te są fazowo zależne. Stąd znaczenie aplikacyjne synchronizacji w chemioterapii nowotworów.

W stosowanej obecnie chemioterapii nowotworów uwzględnia się podawanie kilku leków jednocześnie lub naprzemiennie. Z praktyki klinicznej wiadomo, że tego rodzaju terapia przynosi lepsze efekty terapeutyczne niż terapia jednolekowa. Niektóre leki przeciwnowotworowe po-

wodują synchronizację komórek w określonych fazach cyklu życiowego i tym samym potęgują działanie innych następnie podawanych leków, o ile ich działanie jest fazowo zależne. Ten zaproponowany na podstawie badań *in vitro* schemat postępowania odnosi się przede wszystkim do terapii białaczek.

Z licznych badań wynika, że podawany następnie lek może trafić w nieodpowiednią dla swego działania fazę, co zmniejsza efekt terapeutyczny. Na przykład wiadomo, że L-asparaginaza albo nasila, albo niweluje cytotoksyczne działanie metotreksatu. W ramach badań własnych udowodniono [8], że L-asparaginaza w niskich stężeniach synchronizuje komórki w fazie S (ryc. 4), która jest fazą wrażliwą na działanie metotreksatu.



Ryc. 4. Inkorporacja tymidyny znakowanej trytem w komórkach L-929 hodowanych w pożywce z L-asparaginą przez 10 godzin; według Chłopkiewicz i Koziórowskiej [1975]

Cecha fazowej zależności jest związana nie tylko z działaniem leków przeciwnowotworowych, lecz również z działaniem chemicznych

związków rakotwórczych. Zdolność chemicznych związków rakotwórczych do wywoływania przemiany nowotworowej komórek mysich ulega nasileniu w przypadku synchronizacji komórek w fazie G_1 i następującym ich odblokowaniu [23]. Z ostatnich badań wiadomo, że niezbędnym warunkiem do uzyskania transformacji komórek ludzkich jest ich preinkubacja w pożywce bez glutaminy i argininy, prowadząca do ich zablokowania w fazie spoczynkowej [38, 39]. Po zmianie pożywki na pożywkę kompletną większość komórek znajduje się w fazie S. Po dodaniu czynników rakotwórczych w odpowiednich stężeniach, populacje w ten sposób hodowanych komórek ludzkich ulegają przemianie nowotworowej. Wydaje się prawdopodobne, że poznanie procesów metabolicznych determinujących zwiększoną wrażliwość komórek na działanie czynników rakotwórczych może mieć kluczowe znaczenie w próbach wyjaśnienia mechanizmów procesów nowotworowych.

LITERATURA

- [1] ARMELIN H. A., Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 2702—2706, 1973.
- [2] BAKER M. E., Stimulation of DNA synthesis by serum and amino acids in a rat neuroblastoma cell line, *Exp. Cell Res.*, **95**: 121—126, 1975.
- [3] BAKER M. E., Arrest of C1300 neuroblastoma cells by limiting serum or isoleucine: implications for growth control in malignant cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**: 1059—1065, 1976.
- [4] BARTHOLOMEW J. C., YOKOTA H., ROSS P., Effect of serum on the growth of BALB 3T3 A31 mouse fibroblasts and SV40 — transformed derivative, *J. Cell Physiol.*, **88**: 277—286, 1976.
- [5] BONATTI S., CANCEDDA R., BLOBEL G., In vitro cleavage, core glycosylation and integration into microsomal membranes of Sindbis virus glycoproteins, *J. Cell Biol.*, **80**: 219—224, 1979.
- [6] BRUNNER M., Regulation of DNA synthesis by amino acid limitation, *Cancer Res.*, **33**: 29—32, 1973.
- [7] BURSTIN S. J., BASILICO C., Transformation by polyoma virus alters expression of cell mutation affecting cycle traverse, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**: 2540—2544, 1975.
- [8] CHŁOPKIEWICZ B., KOZIOROWSKA J., Role of amino acid depletion in combined treatment of neoplastic cells with methotrexate and L-asparaginase, *Cancer Res.*, **35**: 1524—1529, 1975.
- [9] CHOU J. Y., MARTIN R. G., DNA infectivity and the induction of host DNA synthesis with temperature-sensitive mutants of simian virus 40, *J. Virol.*, **15**: 145—150, 1975.
- [10] DULBECCO R., ELKINGTON J., Conditions limiting multiplication of fibroblastic and epithelial cells in dense cultures, *Nature*, **246**: 197—199, 1973.
- [11] EVERHARDT L. P., PRESCOTT D. M., Reversible arrest of chinese hamster cells in G_1 by partial deprivation of leucine, *Exp. Cell Res.*, **75**: 170—174, 1972.

- [12] EVERHARDT L. P., Effects of deprivation of two essential amino acids on DNA synthesis in Chinese hamster cells, *Exp. Cell Res.*, **74**: 311—318, 1972.
- [13] FODGE D. W., RUBIN H., Differential effects of glucocorticoids on DNA synthesis in normal and virus-transformed chick embryo cells, *Nature*, **257**: 804—806, 1975.
- [14] FODGE D. W., RUBIN H., Glucose utilization, pH reduction and density dependent inhibition in cultures of chick embryo fibroblasts, *J. Cell Physiol.*, **85**: 635—642, 1975.
- [15] FROELICH J. E., ANASTASSIADES T. P., Possible limitation of growth in human fibroblast cultures by diffusion, *J. Cell Physiol.*, **86**: 567—580, 1975.
- [16] GOSPODAROWICZ D., Localization of fibroblastic growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth, *Nature*, **249**: 123—127, 1974.
- [17] HADDOX M. K., HADDOCK D. R., Cell cycle-specific locus of vitamin A inhibition of growth, *Cancer Res.*, **39**: 2476—2480, 1970.
- [18] HASSELL J., ENGELHARDT D. L., Factors regulating the multiplication of animal cells in culture, *Exp. Cell Res.*, **107**: 159—167, 1977.
- [19] HATTEN M. E., HOROWITZ A. F., BURGER M. M., The influence of membrane lipids on the proliferation of transformed and untransformed cell lines, *Exp. Cell Res.*, **107**: 31-34, 1977.
- [20] HOLLEY R. W., KIERNAN J. A., Control of initiation of DNA synthesis in 3T3 cells, Serum factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 2908—2911, 1974.
- [21] HOLLEY R. W., BALDWIN J. H., KIERNAN J. A., MESSMER T. O., Control of growth of benzo(a)pyrene-transformed 3T3 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 3229—3232, 1976.
- [22] HSUEH H. W., STOCKDALE F. E., Serum and insulin initiation of DNA synthesis in mammary gland epithelium in vitro, *J. Cell Physiol.*, **83**: 297—308, 1974.
- [23] JONES P. A., BENEDICT W. F., BAKER M. S., MONDAL S., RAPP Ulf, Heilderberger Ch., Oncogenic transformation of C3H/10T 1/2 clone 8 mouse embryo cells by halogenated pyrimidine nucleosides, *Cancer Res.*, **36**: 101—107, 1976.
- [24] KAMELY D., RUDLAND P., Nutrient-dependent arrest of fibroblast growth is partially reversed by insulin but not fibroblast growth factor, *Nature*, **260**: 51—53, 1976.
- [25] KIMURA G., ITAGAKI A., Initiation and maintenance of cell transformation by simian virus 40: a viral genetic property, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 673—677, 1975.
- [26] LANDY-OTSUKA F., SCHEFFER I. E., Induction of ornithine decarboxylase activity in a temperature-sensitive cell cycle mutant of Chinese hamster cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 5001—5005, 1978.
- [27] LEFFERT H. I., WEINSTEIN D. B., Growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. IX. Specific inhibition of DNA synthesis inhibition by very low density lipoprotein and possible significance to the problem of liver regeneration, *J. Cell Biol.*, **70**: 20—32, 1976.
- [28] LEY D., ROBEY R. A., Regulation of initiation of DNA synthesis and cell division by isoleucine and glutamine in G₁ arrested cells in suspension culture, *J. Cell Biol.*, **47**: 453—459, 1970.
- [29] LINDGREN A., WESTERMARK B., PONTEN J., Serum stimulation of statio-

- nary human glia and glioma cells in culture, *Exp. Cell Res.*, **95**: 311—319, 1975.
- [30] LINDGREN A., WESTERMARK B., Subdivision of G₁ phase of human glia cells in culture, *Exp. Cell Res.*, **99**: 357—362, 1976.
- [31] LINDGREN A., WESTERMARK B., Serum requirement and density dependent inhibition of human malignant glioma cells in culture, *Exp. Cell Res.*, **104**: 293—299, 1977.
- [32] LITTLEFIELD J. W., *Molecular biology of the mammalian genetic apparatus*, wyd. P. Ts'o, Elsevier North-Holland Biomed Press, Amsterdam, 181—190, 1977.
- [33] MARIN G., LABELLA T., Chromosome replication in somatic hybrids of mouse and temperature sensitive Chinese hamster cells, *J. Cell Physiol.*, **90**: 71—78, 1977.
- [34] MARTIN R. G., CHOU J. Y., Simian virus 40 functions required for the establishment and maintenance of malignant transformation, *J. Virol.*, **15**: 599—612, 1975.
- [35] MARTIN R. G., STEIN S., Resting state in normal and simian virus 40 transformed Chinese hamster lung cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 1655—1659, 1976.
- [36] MEISS H. K., BASILICO C., Temperature sensitive mutants of BHK 21 cells, *Nature (London) New Biol.*, **239**: 66—68, 1972.
- [37] MELVIN W. T., BURKE J. F., SLATER A. A., KEIR H. M., Effect of amino acid deprivation on DNA synthesis of BHK-21/C13 cells, *J. Cell. Physiol.*, **98**: 73—80, 1979.
- [38] MILO G. E., DiPAOLO J. A., Presentization of human cells with extrinsic signals to induce chemical carcinogenesis, *Int. J. Cancer*, **26**: 805—812, 1980.
- [39] MILO G. E., OLDHAM J. W., ZIMMERMAN R., HATCH G. G., WEISBRODE S. A., Characterization of human cells transformed by chemical and physical carcinogens in vitro, *In Vitro*, **17**: 719—729, 1981.
- [40] NISHIMOTO T., RASKAS H. J., BASILICO C., Temperature-sensitive cell mutations that inhibit adenovirus 2 replication in BHK cell line/host functions and viral growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 328—332, 1975.
- [41] OTSUKA H., MOSKOWITZ M., Arrest of 3T3 cells in G₁ phase in suspension culture, *J. Cell Physiol.*, **87**: 213—220, 1976.
- [42] PARDEE A. B., JAMES L. J., A restriction point for control of normal animal cell proliferation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**: 4994—4998, 1975.
- [43] PARDEE A. B., BUBROW R., HAMLIN J. L., KLETZIEN R. F., Animal cell cycle, *Ann. Rev. Biochem.*, **47**: 715—750, 1978.
- [44] PARODI A. J., LELOIR L. F., The role of lipid intermediates in the glycosylation of proteins in the eucaryotic cell, *Biochim. Biophys. Acta*, **559**: 1—38, 1979.
- [45] PAUL D., LIPTON A., KLINGER J., Serum factor requirements of normal and simian virus — 40 transformed 3T3 mouse fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**: 645—648, 1971.
- [46] PAUL D., HENAHAN M., WALTER S., Changes in growth control and growth requirements associated with neoplastic transformation in vitro, *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**: 1499—1503, 1974.
- [47] PAUL D., WALTER S., Growth control in primary fetal rat liver cells in culture, *J. Cell Physiol.*, **85**: 113—124, 1975.
- [48] POPESCU N. C., CASTO B. C., DiPAOLO J. A., Infrequent chromosome

- aberrations in syrian hamster cells following partial synchrony by amino-acid deprivation, *J. Cell Physiol.*, **86**: 599—604, 1975.
- [49] RIDDLE G. H., LEHTOMAKI D. M., Growth arrest states of RNA virus — and chemically transformed mouse cells, *Cancer Res.*, **41**: 1778—1783, 1983.
- [50] ROBINSON J. H., SMITH J. A., TOTTY N. F., RIDDLE P. N., Transition probability and the hormonal and density-dependent regulation of cell proliferation, *Nature*, **262**: 298—300, 1976.
- [51] ROSCOE D. H., READ H., ROBINSON H., Isolation of temperature sensitive mammalian cells by selective detachment, *J. Cell Physiol.*, **82**: 325—332, 1973.
- [52] ROSCOE D. H., ROBINSON H., CARBONELL A. W., DNA synthesis and mitosis in a temperature sensitive Chinese hamster cell line, *J. Cell Physiol.*, **82**: 333—338, 1973.
- [53] ROSSOW P. W., RIDDLE V. G., PARDEE H. B., Synthesis of labile, serum-dependent protein in G_1 controls animal cell growth, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **9**: 1446—1450, 1979.
- [54] SHEININ R., *The molecular biology of viruses*, wyd.: J. S. Colter i W. Parachych, Academic Press, New York, 627—643, 1967.
- [55] SHEININ R., *Nuclear cytoplasmic interactions in the cell cycle. Temperature-sensitive mutants in the study of cell cycle progression in mammalian cells*, wyd.: G. L. Whitson, Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 105—106, 1980.
- [56] SIMENE de ASUA L. J., O'FARRELL M., BENNET D., CLINGAN D., RUDLAND P., Interactions of the hormones and their effect on observed rate of initiation of DNA synthesis in 3T3 cells, *Nature*, **265**: 151—153, 1977.
- [57] SKEHAN P., FRIEDMAN S. J., On the reinitiation of cell growth in culture, *Exp. Cell Res.*, **101**: 315—322, 1976.
- [58] SMITH B. J., WIGGLESWORTH N. M., A cell line which is temperature-sensitive for cytokinesis, *J. Cell Physiol.*, **80**: 253—259, 1972.
- [59] SMITH B. J., WIGGLESWORTH N. M., Studies on a Chinese hamster line that is temperature sensitive for the commitment to DNA synthesis, *J. Cell Physiol.*, **84**: 127—133, 1974.
- [60] SOKAWA Y., WATANABE Y., KAWADA Y., Interferon supresses the transition of quiescent 3T3 cells to a growing state, *Nature*, **268**: 236—238, 1977.
- [61] STOKER M. G. P., Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth, *Nature*, **246**: 200—203, 1973.
- [62] TEGTMEYER P., Function of simian virus 40 gene A in transforming infection, *J. Virol.*, **15**: 613—618, 1975.
- [63] TERASIMA T., TOLMACH L. J., Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells, *Exp. Cell Res.*, **30**: 344—362, 1963.
- [64] THRASH C. R., CUNNINGHAM D. D., Stimulation of division of density inhibited fibroblasts by glucocorticoids, *Nature*, **242**: 399—401, 1973.
- [65] THRASH C. R., CUNNINGHAM D. D., Growth limitation of 3T3 mouse fibroblasts by available growth surface area and medium components, *J. Cell Physiol.*, **86**: 301—310, 1975.
- [66] TOBEY R. A., WALTERS R. A., HOHMANN P. G., HILDEBRAND C. E., GURLEY L. R., *Sequential biochemical events in the cell cycle. Cell culture and its application*, wyd.: R. T. Acton, J. D. Lynn, Academic Press, New York, San Francisco, London, str. 5—22, 1977.

- [67] TONEGUZZO F., GHOSH H. P., In vitro synthesis of vesicular stomatitis virus membrane glycoprotein and insertion into membranes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 715—719, 1978.
- [68] WHITSON G. L., Nuclear cytoplasmic interactions in the cell cycle, wyd. Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, str. 105—161, 1980.
- [69] YANAGI K., TALAVERY S., NISHIMOTO T., RUSH M. G., Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication in temperature-sensitive cell cycle mutants, J. Virol., 25: 42—50, 1978.

Otrzymano: 3 maja 1983.

Przyjęto: 25 czerwca 1983.

Adres autora: ul. Chełmska 30/34, 00—725 Warszawa.

RECENZJE

G. J. REYNOLDS, *Lymphoid Tissue. A Histological Approach.*

J. Wright and Sons Ltd, Bristol, 1982. str. IX + 114, £ 5.50.

Układ limfatyczny ssaków obejmuje centralne (grasica, szpik kostny) i obwodowe narządy limfatyczne (śledziona, węzły chłonne, grudki limfatyczne przewodu pokarmowego). W specyficznym mikrośrodkowisku grasicy, utworzonym przez komórki nabłonkowe, mioidalne, splatające się oraz rogowaciejące ciała grasicze, różnicują się poszczególne subpopulacje limfocytów T-grasiczozależnych. Szpik kostny opuszczają natomiast limfocyty B, zdolne do przekształcania się w komórki plazmatyczne uwalniające przeciwciała. Limfocyty obu populacji krążą w krwi i limfie oraz zasiedlają przynależne im strefy obwodowych narządów limfatycznych. Śledziona filtruje wyłącznie krew, natomiast do węzłów chłonnych i grudek limfatycznych skupionych przewodu pokarmowego limfocyty wnikają zarówno z krwiobiegu, przez wyspecjalizowane, cylindryczne komórki śródbłonna żyłek pozawłosowatych, jak i z naczyń limfatycznych doprowadzających. W obrębie narządów obwodowych dochodzi do wzajemnego „porozumienia się” limfocytów T i B z udziałem komórek pochodzących z linii fagocytów jednojądrzastych, przyjmujących w strefach grasiczozależnych postać komórek splatających się, natomiast w strefach niezależnych od grasicy — wygląd komórek drzewkowatych.

Obraz centralnych narządów limfatycznych zmienia się w toku rozwoju osobniczego, natomiast narządy obwodowe ulegają radykalnym zmianom po zadziałaniu bodźców antygenowych. Zachodzi w nich wówczas transformacja blastyczna części limfocytów oraz ich przemieszczanie się. Kierunek ruchu limfocytów poszczególnych subpopulacji, a więc o różnych markerach powierzchniowych, zależy prawdopodobnie od mikrośrodkowiska wytworzonego przez komórki nielimfatyczne zasiedlające określone nisze narządu, reagujące odmiennie w testach histochemicznych.

Oczywiste jest zatem, że do badania dynamicznych procesów zachodzących w narządach limfatycznych niezbędne jest równoczesne stoso-

wanie różnorodnych technik badawczych, uwidoczniających nie tylko lokalizację komórek, lecz również ich markery powierzchniowe i skład enzymów. O tendencji tej świadczą bieżące artykuły z czasopism fachowych. Doskonale stało się więc, że G.J. Reynolds podjął się zgrupowania w jednej książce opisów wszelkich współcześnie stosowanych technik badania narządów limfatycznych. Po omówieniu struktury i funkcji ssących narządów limfatycznych autor podaje metodykę badań histologicznych, histochemicznych, budzących ogromne nadzieje testów immunocytochemicznych oraz badania markerów powierzchniowych komórek. Gdy tylko to możliwe, autor przedstawia teoretyczne podstawy danej metodyki. W większości przypadków, opierając się na własnych doświadczeniach, opisuje zasadzki danej techniki: najczęstsze artefakty i przyczyny ich powstania, a tym samym sposoby ich uniknięcia. Przyswojenie treści ułatwiają znakomite schematyczne ryciny oraz czarno-białe i kolorowe mikrofotografie. Omawiana pozycja z całą pewnością będzie bardzo przydatna dla immunobiologów badających komórkowe podłoże reakcji obronnych organizmu.

Barbara Płytycz

E. W. ROGERS, Cell and Tissues. An Introduction to Histology and Cell Biology.

Academic Press, London, 1983, str. XIII + 242, £ 12.20

„Każdy przekrój przez tkankę lub narząd zawiera setki komórek. Tym niemniej możliwe jest, przy odrobinie treningu, zidentyfikowanie danego organu. Co więcej, łatwiej jest nazwać narząd niż powiedzieć, z jakiego zwierzęcia pochodzi... Histologia składa się bowiem głównie z powtarzających się wzorów, spośród których wiele związanych jest z określoną funkcją” — pisze autor omawianej książki, po czym udowadnia, iż łatwo można odróżnić komórki syntetyzujące białka „na eksport” od komórek wytwarzających białka głównie na własny użytek oraz od komórek specjalizujących się w syntezie sterydów. Inny plan budowy mają nabłonki gruczołowe, inny nabłonki absorbujące substancje, a jeszcze odmienny epitelia stanowiące głównie mechaniczne bariery między różnymi środowiskami. Wiele narządów ma postać cewy. Pamiętając jednak o ich zróżnicowanych funkcjach, można odróżnić przekrój przez naczynia krwionośne czy kanaliki nerkowe od przekroju przez przewód pokarmowy.

Autor książki apeluje do wyobraźni oraz intelektu czytelników, a w niewielkim stopniu do ich pamięci. Podręcznik adresowany jest bowiem

do początkujących studentów i ma na celu ułatwić i uprzyjemnić im naukę histologii, jako dyscypliny łączącej elementy biochemii, fizjologii i anatomii. Natomiast drobiazgowo, nużące dla początkujących, opisy tkanek i narządów znajdą zainteresowani czytelnicy w innych podręcznikach, cytowanych przez A. W. Rogersa.

Tekst książki przerywany jest wielokrotnie krótkimi pytaniami, zmuszającymi czytelnika do przypomnienia sobie poprzednich informacji i połączenia ich w spójną całość. Na końcu książki znaleźć można syntetyczne odpowiedzi na postawione pytania i odnośniki do odpowiednich rozdziałów.

Książka zawiera ponad 200 ilustracji: diagramów, czarno-białych i kolorowych mikrofotografii oraz elektronogramów. Osobny rozdział poświęcony jest współczesnym technikom histologicznym, ich zaletom i ograniczeniom. Zatem, mimo iż autor świadomie nie wspomina o strukturze i funkcji wielu narządów, recenzowana książka jest doskonałym wstępem do studiowania histologii, gdyż może uczynić ten przedmiot bardzo atrakcyjny.

Barbara Płytycz

Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie 320 zł, półrocznie 160 zł

Prenumeratę na kraj przyjmuje się:

- do dnia 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 1 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Instytucje i zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę za zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa; konto NBP XV Oddział w Warszawie, Nr 1153-201045-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa, oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise
ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7. Poland.

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

SPIS TREŚCI

J. KLAG — Linia płciowa <i>Tetradontophora bielensis</i> (<i>Insecta, Collembola</i>). Analiza porównawcza powstawania i różnicowania się komórek prapłciowych w rozwoju zarodkowym owadów	289
A. JOACHIMIAK — Heterochromatyna. Budowa i funkcje w obrębie genomu	317
A. LIPIŃSKA — Strukturalno-funkcjonalne właściwości histonów rdzenia nukleosomu	339
Z. POJDA i W. W. JĘDRZEJCZAK — Badanie układu krwiotwórczego zwierząt i człowieka na podstawie hodowli w komorach dyfuzyjnych	359
J. KOZIOROWSKA — Znaczenie poznawcze i praktyczne synchronizacji komórek w fazach cyklu mitotycznego	385
Recenzje	401