

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE**

**TOM 11 - NR 2**  
**1984 (137-312)**

# **Postępy Biologii Komórki**

**PWN - WARSZAWA**

<http://rcin.org.pl>

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 537 + 93 egz. Ark. wyd. 14. Ark. druk. 11. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100 cm.  
Oddano do składania 8 VI 1984 r. Podpisano do druku w listopadzie 1984 r. Druk ukończono  
w listopadzie 1984 r. Zam. 284/84. Cena zł 80,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

## ROLA CYTOKININ W ONTOGENEZIE PLASTYDÓW

## THE ROLE OF CYTOKININS IN PLASTID ONTOGENESIS

Adam WOŻNY

Zakład Botaniki Ogólnej, Instytut Biologii UAM, Poznań

*Streszczenie.* Przedstawiono poglądy na temat możliwej roli jaką pełnią cytokininy w procesie ontogenezy plastydów i jakie są mechanizmy działania tych substancji na poziomie komórkowym i molekularnym. Szczegółowo opisano działanie cytokinin na: 1. biosyntezę i akumulację chlorofilu, 2. ultrastrukturę plastydów i ich podziały, 3. enzymy plastydowe i cytoplazmatyczne, 4. syntezę kwasów nukleinowych, 5. biosyntezę plastydowych białek.

Zaprezentowane wyniki badań nie pozwalają w sposób jednoznaczny wskazać co w chloroplastogenezie jest pierwotnym efektem działania cytokinin. Wydaje się jednak, że stymulacja przez te substancje rozwoju chloroplastów jest ściśle związana ze stymulacją ekspresji genów, a szczególnie z podwyższaniem tempa translacji plastydowych białek, chociaż inne miejsca działania tych roślinnych regulatorów wzrostu i rozwoju nie mogą być wykluczone.

*Summary.* The possible role of cytokinins in plastid ontogenesis and possible modes of action on the cellular and molecular levels are reviewed. The following aspects of cytokinin action in chloroplast formation are considered in detail: 1. chlorophyll biosynthesis and accumulation, 2. ultrastructure and replication of plastids, 3. plastid and cytoplasmic enzyme synthesis and activity, 4. nucleic acid biosynthesis, 5. plastid proteins biosynthesis.

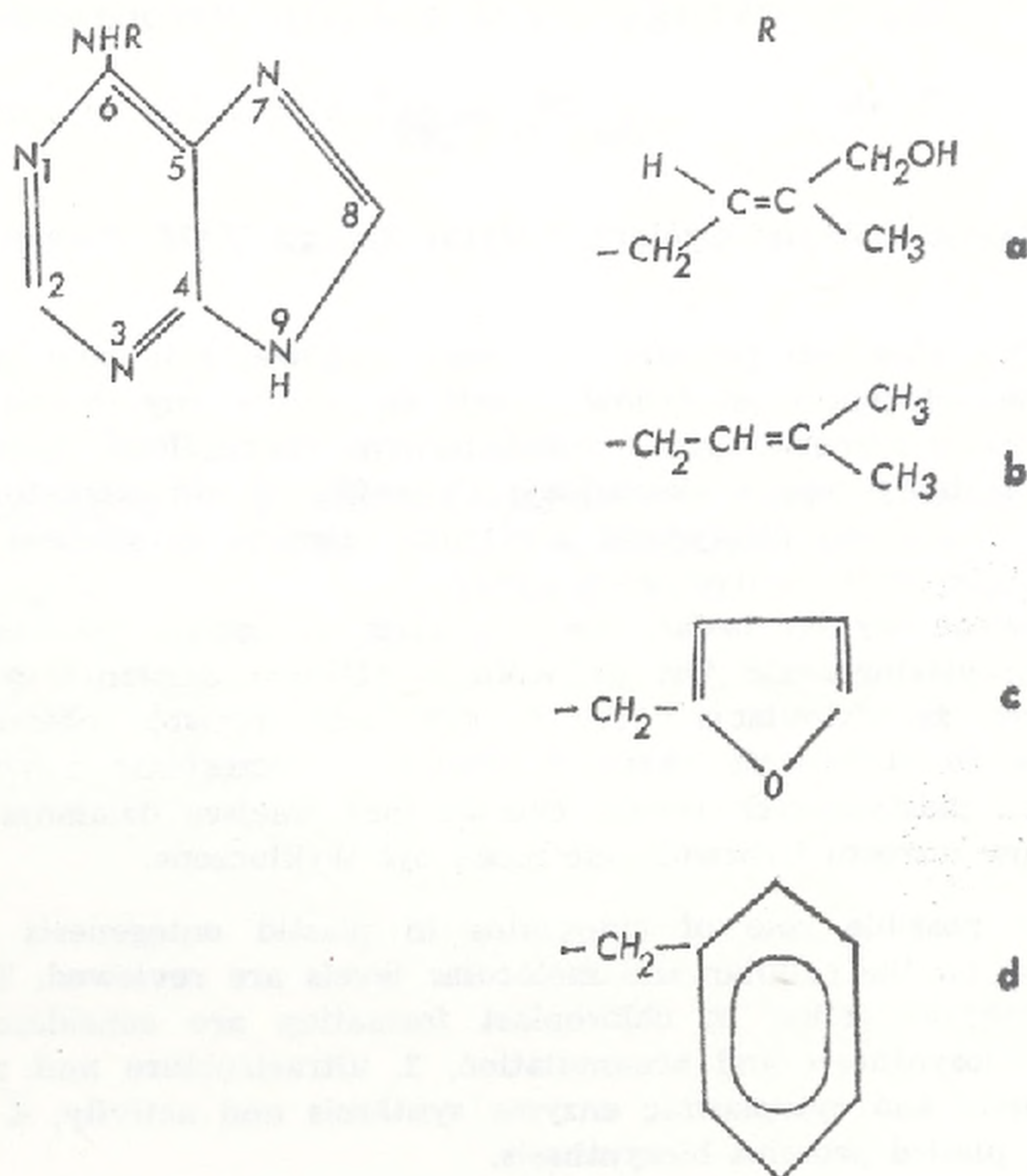
The results available at present are not sufficient for unequivocal demonstration of a primary or direct cytokinin action in chloroplastogenesis. Although there are indications that the promotion of chloroplast development by cytokinins is closely connected with a stimulation of the gene expression, in particular with enhanced translation of plastid proteins. However other sites of hormone action cannot be excluded.

## WSTĘP

Powszechnie wiadomo, że w pełni funkcjonalne chloroplasty roślin okrytozalążkowych mogą powstawać wyłącznie przy udziale światła. Żaden ze znanych do chwili obecnej czynników — tak fizycznych, jak i che-

micznych — nie może go zastąpić. Jednak opublikowane w końcu lat pięćdziesiątych i na początku sześćdziesiątych prace (np. [158, 185]), w których doniesiono o możliwości hamowania przez cytokininy procesów starzenia się liści, a nawet stymulowania syntezy niektórych składników plastydowych, pokazały, że również te roślinne regulatory wzrostu i rozwoju pełnią istotną rolę w ontogenezie plastydów.

Cytokininy są jak wiadomo pochodnymi 6-aminopuryny (adeniny), podstawionymi przy atomie azotu w pozycji 6 ( $N^6$ ) (ryc. 1). Ich biolo-

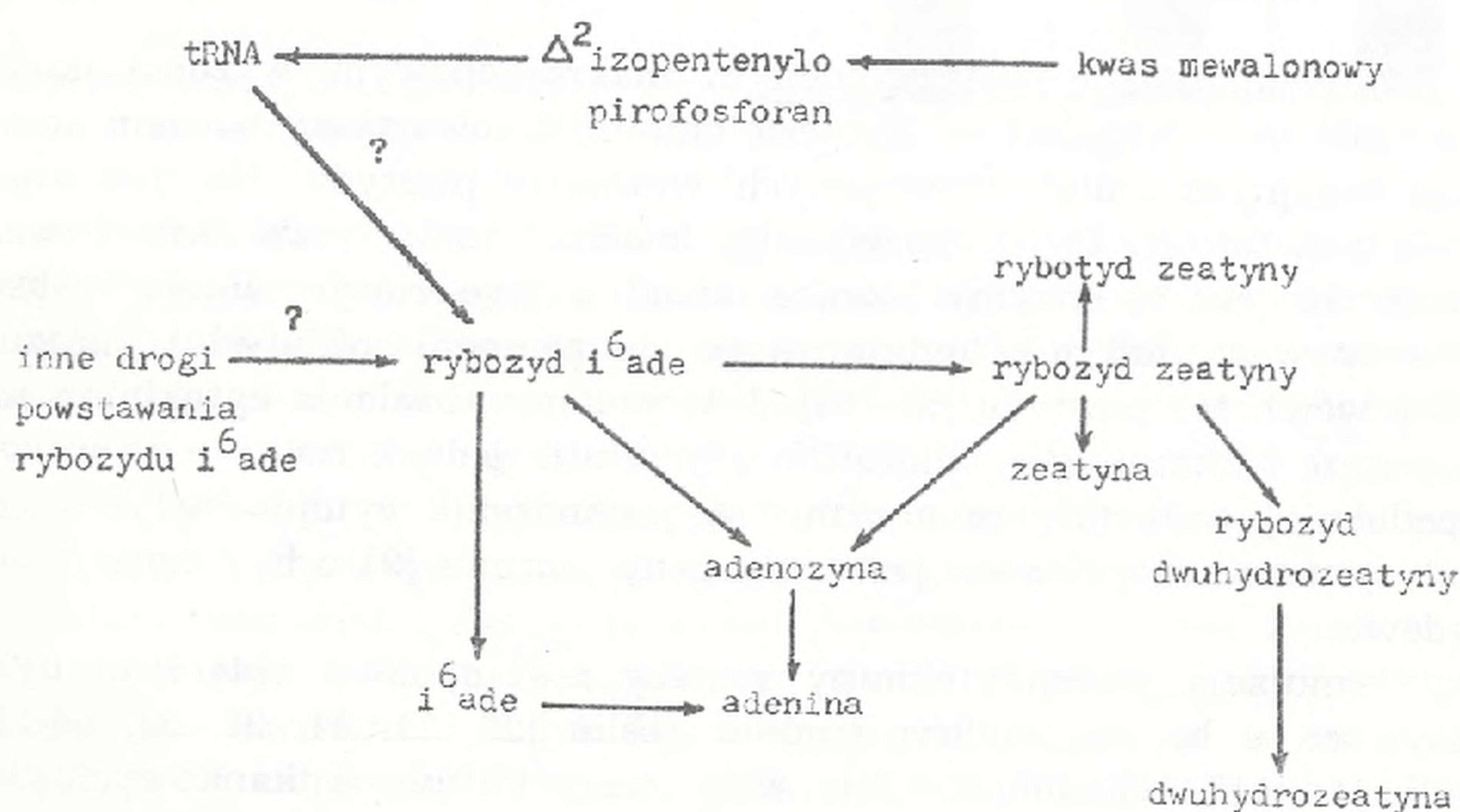


Ryc. 1. Budowa chemiczna niektórych cytokinin [85]; a — trans 6-(4-hydroksy-3-metylobut-2-enylo)aminopuryna = zeatyna, b — 6-(3-metylobut-2-enylo)aminopuryna = ( $\gamma,\gamma$ ,dwumetyloalliloamino)puryna = i<sup>6</sup>ade, c —  $N^6$ -furfuryloaminopuryna = kine-  
tyna, d —  $N^6$ -benzyloaminopuryna = BA

giczna aktywność wiąże się bardzo ściśle z budową cząsteczki. Według Skooga i Armstronga [212] mają na nią wpływ: (1) rodzaj podstawnika (alkil lub aryl), (2) długość łańcucha (w przypadku dołączonego podstawnika alkilowego), (3) liczba i rozmieszczenie wiązań wielokrotnych i grup hydroksylowych w podstawniku alkilowym, (4) długość mostka między adeniną a podstawnikiem pierścieniowym, (5) modyfikacja cząsteczki adeniny. Pierwszą zidentyfikowaną naturalną cytokininą była zeatyna,

która — jak już obecnie wiadomo — jest bardzo szeroko rozpowszechniona. Występuje ona zarówno w organizmach wyższych, jak i niższych. Drugą powszechnie występującą naturalną cytokininą jest 6-(3-metylobut-2-enylo)aminopuryna =  $i^6ade$ . Z kolei najszersze stosowanymi syntetycznymi cytokininami są:  $N^6$ -furfuryloaminopuryna = kinetyna i  $N^6$ -benzyloaminopuryna = BA.

Droga biosyntezy cytokinin jest poznana bardzo słabo<sup>1</sup>. Prekursorem bocznego łańcucha izoprenoidowego cytokinin, występujących zarówno w tRNA, jak i cytokinin wolnych, jest kwas mewalonowy i jego sole. Należy przy tym pamiętać, że cytokininy wolne mogą powstawać zarówno na drodze uwalniania się z tRNA, jak i niezależnie od form związanych [30, 85]. Hall [85] zaproponował schemat znanych do tej pory etapów biosyntezy i przemian cytokinin w tkance roślinnej (ryc. 2). Wiadomo, że — w odróżnieniu od hormonów zwierzęcych — roślinne



Ryc. 2. Schemat etapów biosyntezy i przemian cytokinin w tkankach roślinnych [85]

regulatory wzrostu i rozwoju działają niespecyficznie. Efekt, jaki obserwujemy, zależy nie od obecności czy braku określonego regulatora, ale od współdziałania występujących w roślinie stymulatorów i inhibitorów. Tak więc w badaniach, w których do organizmu roślinnego wprowadza się na przykład egzogenną cytokininę, należy liczyć się z możliwością przekroczenia optymalnego stężenia, a także naruszenia ilości-

<sup>1</sup> Już po napisaniu niniejszego artykułu ukazała się, w *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34: 163-197, 1983, praca przeglądowa na ten temat: D. S. Letham, L. M. S. Palni — „The biosynthesis and metabolism of cytokinins”.

wej równowagi pomiędzy poszczególnymi stymulatorami i inhibitorami. Z tego powodu rolę cytokinin bada się najczęściej w organach odciętych do rośliny (np. w liścieniach czy liściach), bowiem głównym miejscem biosyntezy tych substancji są korzenie [237].

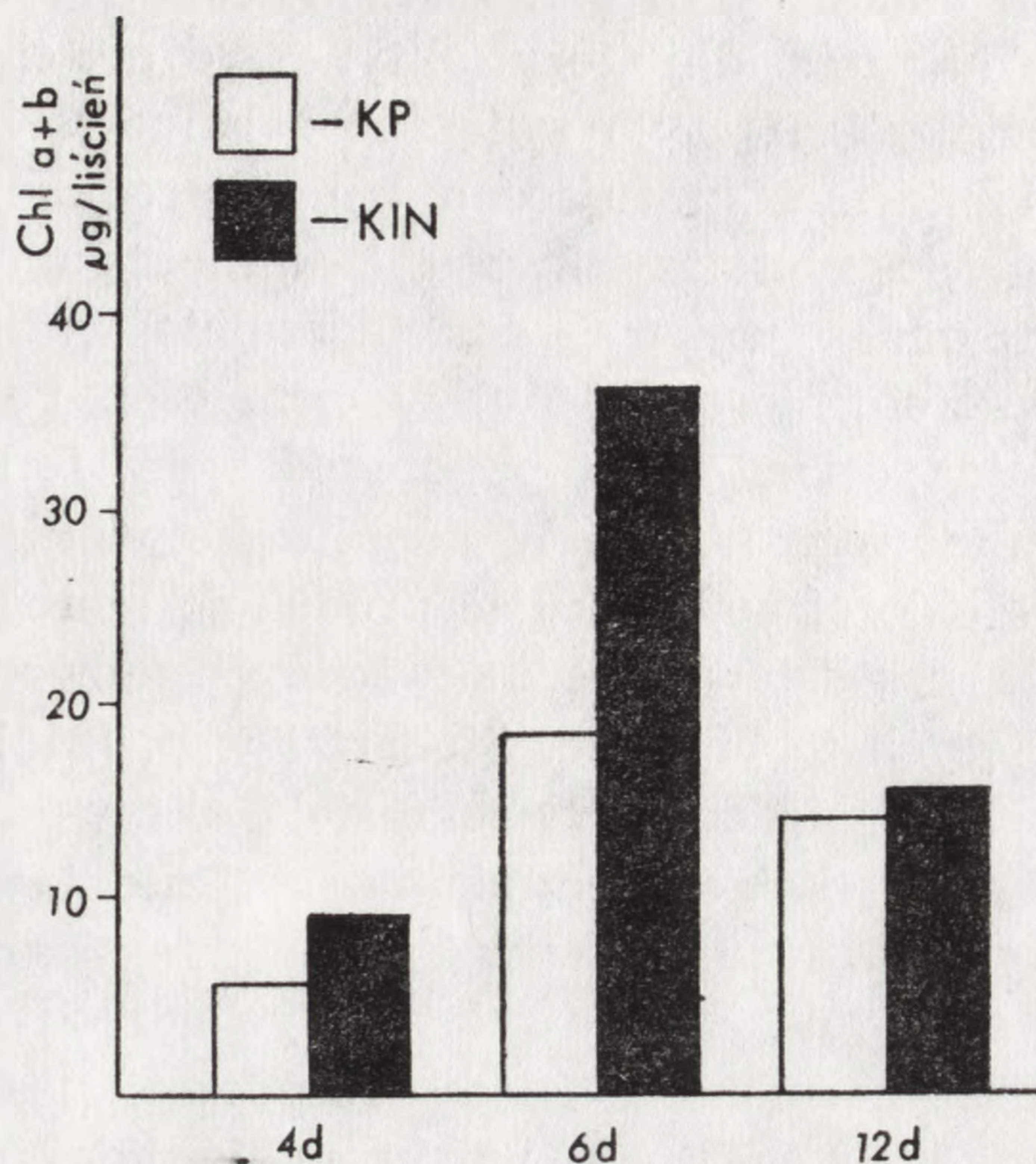
Zakres biologicznego działania cytokinin w roślinach jest bardzo szeroki — bliższe dane na ten temat można znaleźć w licznych pracach przeglądowych [22, 85, 97, 106, 115, 157]. W niniejszym opracowaniu skoncentrowano głównie uwagę na roli, jaką pełnią cytokininy w ontogenezie plastydów. Parthier [172], przyjmując za kryterium wyraźną zależność od egzogennych cytokinin, wyróżnił pięć aspektów tej ontogenezy. Są nimi: biosynteza i akumulacja chlorofilu, struktura plastydów, biosynteza i aktywacja cytoplazmatycznych i plastydowych enzymów, procesy transkrypcji i translacji.

#### I. CYTOKININY A BIOSYNTENZA I AKUMULACJA CHLOROFILU

Zazielenianie się jest wygodnym makroskopowym wyznacznikiem tworzenia się chloroplastów. Syntezie chlorofilu towarzyszy bowiem kompleks kolejnych zmian rozwojowych wewnątrz plastydu. Nie bez znaczenia jest także i to, że barwnik ten można bardzo łatwo ekstrahować i oznaczać oraz że enzymy biorące udział w jego biosyntezie od kwasu glutaminowego lub  $\alpha$ -ketoglutazarowego do protochlorofilu(-idu) znajdują się wewnątrz plastydu [9, 184]. Interpretację działania cytokininy na biosyntezę i akumulację chlorofilu komplikuje jednak fakt, że najprawdopodobniej wszystkie te enzymy są pochodzenia cytoplazmatycznego, a ich synteza kontrolowana jest przez geny jądrowe [9], a być może i plastydowe.

Stymulacja przez cytokininy syntezy i akumulacji chlorofilu była opisywana u bardzo wielu gatunków roślin [23, 24, 31, 32, 35, 56-58, 63-65, 112, 113, 163, 200, 219, 244, 250] oraz w kulturach tkankowych [93, 101, 104, 105]. Należy jednak pamiętać, że znane są również doniesienia, w których stymulacji nie uzyskano [231, 251].

Biosynteza chlorofilu zależy zarówno od rozwoju komórki, jak i plastydu. Jak wykazały badania przeprowadzone na izolowanych liścieniach ogórka odcinanych od etiolowanych siewek znajdujących się w różnym wieku (Woźny — niepublikowane), najsilniejsza akumulacja chlorofilu pod wpływem kinetyny miała miejsce w liścieniach pochodzących z młodych siewek. Liścienie 4- czy 6-dniowych siewek akumulowały w obecności kinetyny ponad dwa razy więcej chlorofilu niż liścienie kontrolne. Z kolei liścienie odcięte od siewek 12-dniowych akumulowały w takich samych warunkach w obecności cytokininy już tylko o około 5-7% chlorofilu więcej (ryc. 3). W pewnych warunkach za-



Ryc. 3. Wpływ kinetyny ( $100 \mu\text{M}$ ) na akumulację chlorofilu w izolowanych liścieniach ogórka (*Cucumis sativus* cv. Monastyrski) w zależności od wieku siewki. KP — kontrola, KIN — wodny roztwór kinetyny, d — dni (Woźny — niepubl.)

wartość chlorofilu może być nawet podwyższona przez cytokininę o 450% [63]. Szybkość obserwowanego efektu jak również fakt, że po wystawieniu na światło eliminowana była, w obecności cytokinin, faza opóźnienia (lag phase) w tworzeniu chlorofilu(-idu), sugeruje bezpośredni wpływ tych substancji na biosyntezę chlorofilu. Dla bliższego wyjaśnienia roli cytokinin w biosyntezie chlorofilu niezwykle istotne znaczenie mają wyniki uzyskane, przy udziale tych regulatorów, w tkankach rosnących w ciemności. I tak na przykład Buschmann [31] oraz Buschmann i Sironval [35], badając różnowiekowe siewki *Raphanus*, uzyskali (podobnie jak Awierina i Szłyk [6]) wyniki wskazujące, że w materiale rosnącym w ciemności kinetyna indukowała silniejszą akumulację całkowitego protochlorofilu(-idu), szczególnie zaś jego zdolnej do fototransformacji formy —  $\text{PCh}_{657-650}$ . Najlepsze efekty uzyskiwano w doświadczeniach z 6-10-dniowymi siewkami. Z kolei zdolność do resyntezy  $\text{PCh}_{657-650}$  w ciemności po krótkim błysku światła (rzędu 1 ms) była w znacznej mierze niezależna od traktowania cytokininą, natomiast wyraźnie zależała od wieku siewek, tzn. z wiekiem malała. Odmienne wyniki uzyskali Szłyk i wsp. [222] oraz Walter i wsp. [240], którzy nie zauważyli żadnego specyficznego wpływu wywołanego przez kinetynę ani na zdolną do fototransformacji formę  $\text{PCh}_{650}$ , ani na „nieaktywną” formę  $\text{PCh}_{635}$ . Walter i wsp. [240] w konkluzji stwierdzili, że cytokinina powoduje wzrost akumulacji chlorofilu zwiększając jedynie zawartość białkowej części kompleksu protochlorofil(-id) białko.

Inaczej interpretowali uzyskane przez siebie wyniki Fletcher i wsp.

[64, 65]. Uważali oni, że hamowanie indukowanej BA akumulacji chlorofilu przez inhibitory (aktynomycynę, chloramfenikol = CAP, cykloheksimid = CHI) było związane z hamowaniem przez te związki aktywności enzymu limitującego tempo produkcji protochlorofilu(-idu), a mianowicie syntetazy kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego (ALAS). Nie udało się im jednak wykazać doświadczalnie wpływu cytokininy na formowanie się protochlorofilu(-idu) w ciemności. Postawili więc hipotezę, że cytokinina działa na etap poprzedzający formowanie się kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego (ALA). W konkluzji stwierdzili, że BA stymuluje formowanie chlorofilu indukując produkcję szeregu białek (w tym także ALAS). Nie przedstawili jednak żadnych dowodów eksperymentalnych popierających tę hipotezę. Stobart i wsp. [218] przedstawili dane wskazujące, że kinetyna zachowywała stałą aktywność dehydratazy ALA w etiolowanych liściach jęczmienia, a Naito i wsp. [162], że BA podwyższała zdolność syntetyzowania ALA i aktywność dehydratazy ALA w liściach fasoli. Efekty zależały jednak od wieku liścia, który był traktowany hormonem. Kiedy rozpoczęto traktowanie w późnych stadiach rozwojowych liścia, wtedy miało miejsce podwyższenie poziomu ALA i zahamowanie obniżania zawartości chlorofilu, lecz pozostawało bez wpływu na obniżanie się aktywności dehydratazy ALA. Na tej podstawie autorzy ci stwierdzili, że synteza chlorofilu może być regulowana przez cytokininy nie tylko na drodze podwyższania zawartości ALA, lecz także przez wpływ na aktywność dehydratazy ALA. Wiadomo z kolei, że miejscem formowania ALA w zazieleniających się roślinach są plastydy, natomiast wydaje się, że enzymy regulujące jego syntezę są syntetyzowane w cytoplazmie [9]. W swej kolejnej pracy Naito i wsp. [163] podjęli więc próbę wyjaśnienia czy zasadniczy wpływ BA na tworzenie ALA ma miejsce na poziomie transkrypcji RNA czy translacji. Uzyskane przy użyciu inhibitorów syntezy RNA i białka wyniki wydają się wskazywać, że cytokinina w ciemności powoduje jedynie aktywację już istniejącego mRNA, natomiast po oświetleniu akumulacja ALA i synteza chlorofilu (regulowana przez syntezę enzymów odpowiedzialnych za produkcję ALA i innych białek włączonych w biosyntezę chlorofilu) jest rezultatem podwyższenia syntezy mRNA w jądrze, a nie zwiększenia jego aktywności. Potwierdza to pogląd, że cytokinina, przynajmniej przy regulacji syntezy chlorofilu, działa na poziomie transkrypcji, a nie — jak postulowali na przykład Maass i Klämbt [140] — na poziomie translacji.

Z przedstawionych danych widać, że istnieją w chwili obecnej przesłanki wynikające z rezultatów eksperymentalnych, które pozwalają na przypuszczenie, że cytokininy wpływają na akumulację chlorofilu już na poziomie formowania enzymów zaangażowanych w biosyntezę tego



barwnika. Z drugiej jednak strony ścisła korelacja, jaka istnieje między stanem fizjologicznym komórek i tkanek a efektem cytokinin na procesy zazieleniania się, przemawia raczej za pośrednim wpływem tych substancji na syntezę i akumulację chlorofilu.

## II. WPŁYW CYTOKININ NA ULTRASTRUKTURĘ CHLOROPLASTÓW I ICH PODZIAŁY

Proplastydy (eoplasty), będące małymi, bezbarwnymi lub lekko zielonkawymi, niezróżnicowanymi plastydami o stosunkowo homogennym wnętrzu, mogą się różnicować w wiele różnych form plastydów charakteryzujących się, szczególnie u roślin wyższych, różnorodnością struktur wewnętrznych i pełnionych funkcji. Spośród znanych form na szczególną uwagę zasługują chloroplasty, będące według wielu autorów jedną z najważniejszych organelli. Te zawierające chlorofil plastydy są wyspecjalizowane w wychwytywaniu energii świetlnej i wykorzystywaniu jej do produkcji wysokoenergetycznych cząsteczek włączanych następnie do energetycznego metabolizmu komórek. Są one też podstawowym źródłem większości naszego „paliwa” i pierwotnym producentem pokarmu.

Stetler i Laetsch [217] pierwsi wykazali nieodzowność cytokinin dla zależnego od światła rozwoju chloroplastów w kulturze tkankowej tytoniu. Brak kinetyny w pożywce powodował, że proplastydy zwiększały na świetle swoje wymiary do wymiarów normalnych chloroplastów, jednak tylakoidy powstające drogą odcinania pęcherzyków od wewnętrznej błony otoczki plastydowej nie formowały gran. Plastydy takie nie akumulowały także chlorofilu, a ich struktura wewnętrzna przypominała strukturę plastydów mutantów jęczmienia „albina” po wystawieniu ich na światło. Z kolei tkanka rosnąca w obecności kinetyny wykształcała w pełni zróżnicowane chloroplasty. Przeciętna zawartość chlorofilu w takich chloroplastach była zbliżona do wartości, jaką uzyskiwano dla dojrzałych liści tytoniu. Autorzy ci obserwowali również ścisłą, odwrotną zależność między różnicowaniem się chloroplastów a wzrostem tkanki — dwoma procesami, na które wpływa kinetyna. Kultury, które szybko się zazieleniały, równie szybko stawały się kulturami stacjonarnymi, natomiast tak długo jak komórki aktywnie się dzieliły, populacja proplastydów nie różnicowała się w dojrzałe chloroplasty. Przyjmuje się, że odwrotna zależność między wzrostem tkanki a różnicowaniem się chloroplastów jest wynikiem replikacji plastydów i aktywności podziałowej komórek w kulturze tkankowej, przy czym określone ilości cytokininy bardziej stymulowały podziały chloroplastów niż wzrost komórek [20]. Istnienie takiej korelacji między wzrostem ko-

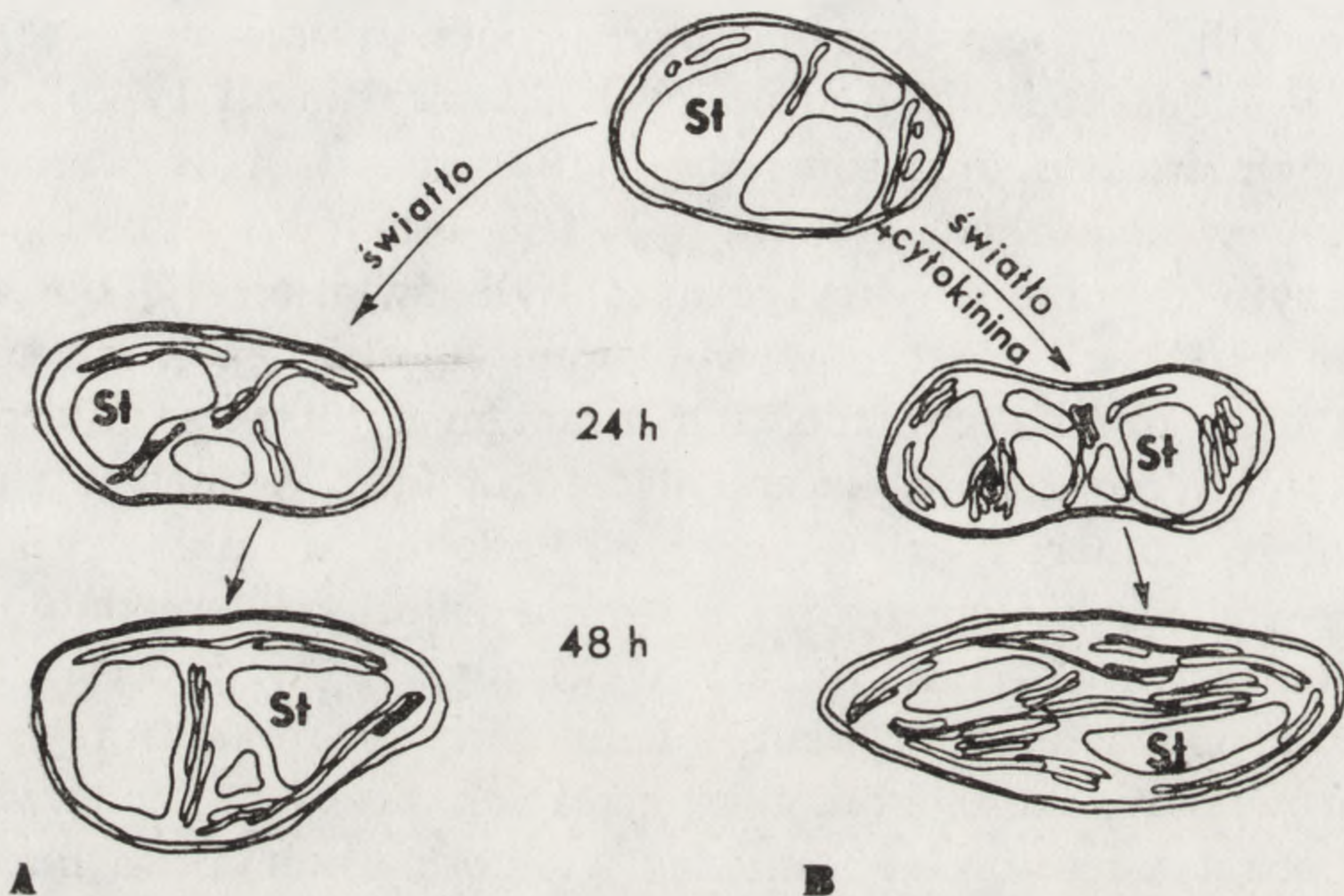
mórki a formowaniem chloroplastów zostało potwierdzone przez doświadczenia przeprowadzone z zależnymi od cytokinin i autonomicznymi kulturami tkankowymi tytoniu [101]. Podobnie linia AG<sub>14</sub> kultury komórkowej tytoniu była zdolna do normalnego wzrostu bez egzogennej cytokininy, lecz wymagała jej do produkcji chlorofilu i formowania chloroplastów [209]. Seyer i wsp. [209] wykazali, że plastydy ulegały cyklicznym transformacjom morfologicznym w czasie cyklu podziałowego komórki. I tak komórki stanowiące materiał wyjściowy miały dojrzałe chloroplasty z dobrze rozwiniętym systemem tylakoidowym. Po pierwszych trzech dniach wzrostu na pożywce z dodatkiem kinetyny w plastydach zmniejszała się wydatnie liczba tylakoidów, a pojawiały się stosunkowo liczne i duże ziarna skrobi. Powierzchnia plastydów (określana na przekrojach) w zasadzie się nie zmieniła. Po kolejnych trzech dniach zmniejszyła się nieco zawartość skrobi, a powierzchnie przekrojów plastydów były wyraźnie mniejsze. W stadium tym plastydy wydłużały się, a na terenie gęstej dla elektronów stromy obecne były nieliczne, chociaż osiągające niekiedy duże wymiary plastoglobule i stosunkowo słabo wykształcony system tylakoidowy. Pod koniec okresu wzrostu i w czasie fazy stacjonarnej obserwowano ponowny wzrost liczby tylakoidów budujących grana. Zwiększyła się też powierzchnia przekroju plastydów, które były bardzo zbliżone do chloroplastów dojrzałych liści. Seyer i wsp. [209] stwierdzili również, że wrażliwość tego systemu doświadczalnego na cytokininy (w odniesieniu do różnicowania chloroplastów) była ograniczona tylko do określonej fazy wzrostu komórki. Cytokinina dodawana w czasie fazy stacjonarnej była nieaktywna, co wskazuje, że substancja ta podczas logarytmicznej fazy wzrostu komórek musiała inicjować jakieś wydarzenie będące warunkiem wstępnym akumulacji chlorofilu i tworzenia tylakoidów.

W chwili obecnej nie ma właściwie dowodów popierających pogląd, że plastydy komórek roślin wyższych mogą powstawać *de novo*, pomimo że niektóre elementy plastydów są syntetyzowane dzięki informacji zawartej w jądrze. Tak więc wszystkie te plastydy należy uważać za wywodzące się z plastydów już istniejących [92]. Warto przypomnieć, że istnienie ciągłości plastydów postulował już w dziewiętnastym wieku Schimper [199]. Pogląd o ciągłości plastydów potwierdziły też między innymi obserwacje przeprowadzone na komórkach liści za pomocą mikroskopu świetlnego i elektronowego. Wykazały one mianowicie, że zwiększanie się liczby plastydów wraz ze wzrostem liścia odbywa się dzięki podziałom już istniejących plastydów [123, 179, 241]. Na wzrost i podziały plastydów ma wpływ bardzo wiele czynników, jak na przykład: światło, temperatura, warunki troficzne, poziom jądrowego DNA, a najprawdo-

podobnie także poziom plastydowego DNA [178]. Również cytokininy mogą stymulować replikację plastydów. I tak np. kinetyna zwiększała intensywność podziałów chloroplastów w krążkach dojrzałych liści tytoniu [19-21, 78], chociaż Possingham i Smith [180] nie uzyskali takiego efektu w krążkach młodych liści szpinaku. Substancja ta podwyższała również (w porównaniu z materiałem kontrolnym) liczbę plastydów w zazieleniających się liścieniach łubinu [245]. Z kolei Naito i wsp. [166] stwierdzili, że benzyloaminopuryna podwyższała replikację chloroplastów w nieuszkodzonych, rosnących liściach fasoli tylko w określonej fazie ich wzrostu. Poasson i wsp. [19] stwierdzili, że wzrost liczby chloroplastów w komórkach tytoniu był sumą efektów cytokininy i światła, przy czym czynnikiem krytycznym było światło. Nie obserwowali oni bowiem replikacji plastydów w ciemności, niezależnie od tego, czy cytokinina była obecna czy nie. Ich zdaniem replikacja chloroplastów była związana tylko z powiększaniem się komórek, ponieważ nie udało im się znaleźć komórek dzielących się. Podobne wyniki uzyskano dla zazieleniających się liścieni ogórka i łubinu (Woźny — niepubl.). Mikułowicz i Kułajewa [147] natomiast wykazały, że w procesie wzrostu liścieni dyni pod wpływem benzyloaminopuryny miało miejsce zwiększenie zarówno wielkości komórek, jak i ich liczby. Z kolei wiadomo, że istnieje pozytywna korelacja między wielkością komórki a liczbą chloroplastów przypadających na komórkę [166, 180, 223]. Szulgin i wsp. [223] obliczyli na przykład, że stosunek między powierzchnią komórek a powierzchnią chloroplastów, w sprzyjających warunkach świetlnych, był stały i wynosił średnio 1,33-1,36. Nie wiadomo więc, czy obserwowana przez tak wielu autorów stymulacja przez cytokininę replikacji plastydów była efektem wtórnym, stanowiącym konsekwencję zmian (podziały lub powiększanie się) wywołanych przez tę substancję w komórkach, a nie w samych plastydach.

Badania przeprowadzone przez Naito i wsp. [166] pokazały, że w traktowanych BA liściach fasoli liczba chloroplastów przypadających na komórkę zwiększyła się o 25%, poziom chlorofilu aż o 43-51%. Wzrost zatem poziomu chlorofilu w chloroplaście wynosił 14-21%, co jak wiadomo musiało się wiązać z rozbudową systemu tylakoidowego. Wpływ cytokininy na ultrastrukturę plastydów głównie w odciętych, etiolowanych liścieniach był bardzo często przedmiotem badań [37, 55, 56, 86, 137, 146, 155, 195, 231, 244, 248, 250]. W tym przypadku procesy różnicowania się plastydów w tkankach były z reguły wyraźnie stymulowane przez cytokininy i to zarówno na świetle, jak i w ciemności. W roślinach etiolowanych przyspieszonemu przez cytokininę (w obecności światła) rozwojowi systemu tylakoidowego i dezintegracji ciała prolamellarnego towarzyszyło zwiększenie tem-

pa syntezy chlorofilu. Chociaż cytokininy nie mogą zmieniać typowych dróg rozwoju plastydów ani w ciemności, ani na świetle [37], to jednak często obserwowano pod ich wpływem pewne nienormalne cechy przejawiające się na przykład znacznym wzrostem liczby tylakoidów w granum i równocześnie słabym rozwojem systemu tylakoidów intergranowych [56, 152, 244] (ryc. 4). Z rozbudową wewnętrznych błon plastydu

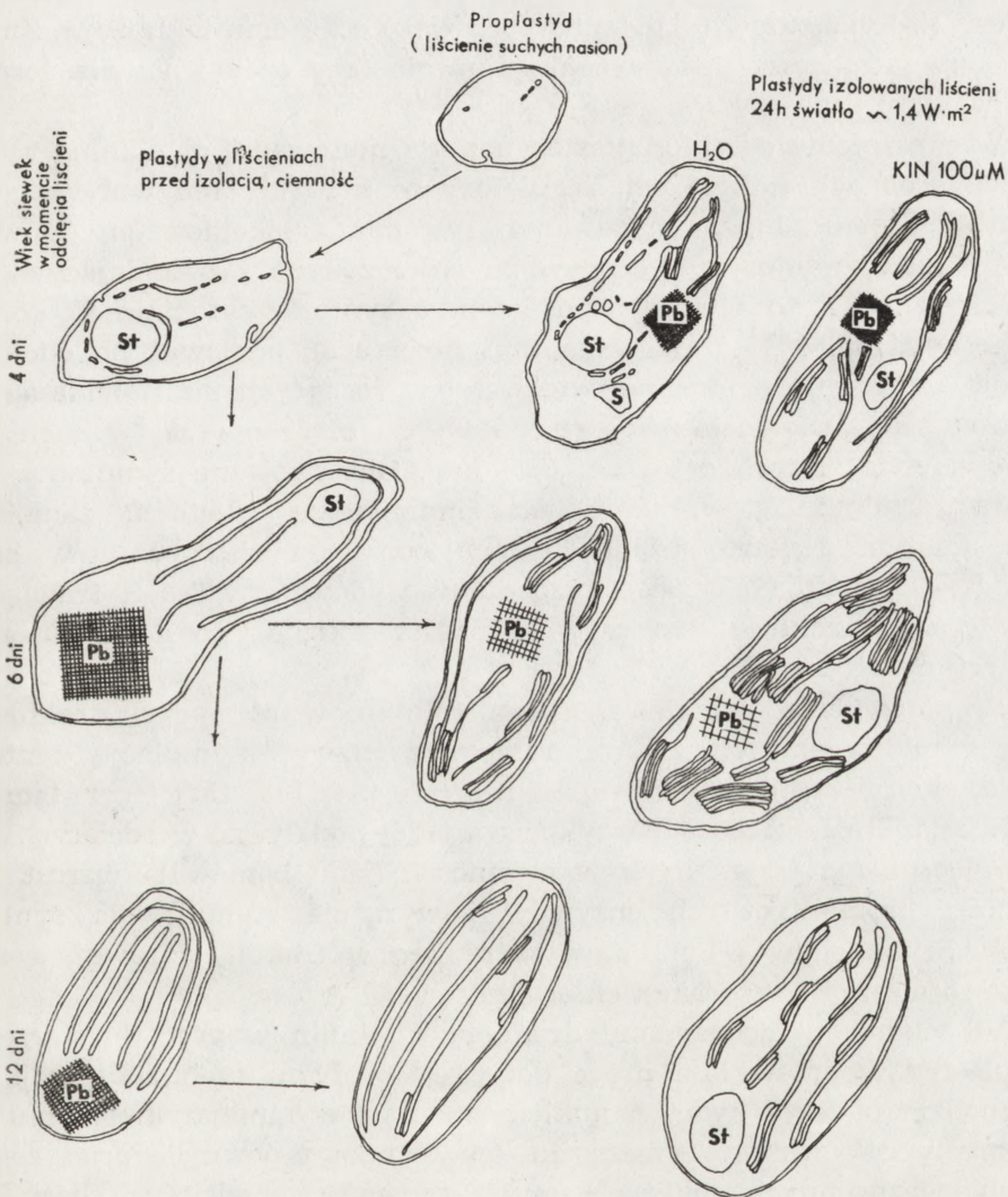


Ryc. 4. Wczesne etapy rozwoju chloroplastów hodowanego uprzednio w ciemności splotka mchu *Ceratodon purpureus*: A — w splotku kontrolnym (rosnącym na pożywce podstawowej bez cytokininy), B — w splotku rosnącym na pożywce z dodatkiem cytokininy ( $i^{6}ade$  —  $100 \mu M$ ), St — skrobia (Woźny — niepubl.)

wiązał się funkcjonalny wzrost efektywności aparatu fotosyntetycznego, np. fosforylacji, głównie cyklicznej [99], poziomu chlorofilu (patrz rozdział I), aktywacji lub syntezy enzymów plastydowych (rozdział III) i syntezy RNA (rozdział IV).

W doświadczeniach z izolowanymi, etiolowanymi organami, np. liścieniami ogórka, stwierdzono (Woźny — dane niepubl.), że stymulujący wpływ cytokininy na poziom chlorofilu (patrz rozdział I) i rozwój ultrastruktury plastydów był w znacznej mierze uzależniony od wieku siewki, od której odcinano liścienie. Najlepsze efekty uzyskiwano w młodych (odciętych od 4-6-dniowych etiolowanych siewek) liścieniach. Komórki takich liścieni zawierały jeszcze znaczne ilości materiałów zapasowych, a ich plastydy były albo z reguły pozbawione ciał prolamelarnych (w 4-dniowym materiale), albo dominował w nich luźny typ tych ciał; natomiast komórki liścieni odciętych od 12-dniowych, etiolowanych siewek były już prawie bez materiałów zapasowych, w plastydach zaś obserwowano duże, zwarte ciała prolamellarne. Liścienie takie

reagowały bardzo słabo zarówno na światło, jak i na obecność egzogennej cytokininy, czego efektem był, między innymi, słaby rozwój gran w plastydach (ryc. 5). Częściowego wyjaśnienia tego zjawiska dostarczył stosunkowo niedawno Lütz [138, 139]. Wykazał on mianowicie, że istnieje ścisła korelacja między długością fazy opóźnienia (lag phase) dla for-



Ryc. 5. Schemat ultrastruktury plastydów liści ogórka (*Cucumis sativus* cv. Monastyrski) w zależności od wieku siewki z której odcinano liście. Pokazano plastyd przed izolacją liści oraz zmiany jakie zaszły w strukturze plastydów po 24 h od momentu izolacji liści, które inkubowano w wodzie (H<sub>2</sub>O) lub w wodnym roztworze kinetyny (KIN — 100 μM) i naświetlano ciągłym, białym światłem jarzeniowym (1,4W · m<sup>-2</sup>), Pb — ciało prolamellarne, St — skrobia (Woźny — niepubl.)

mowania chlorofilu a czasem inkubacji rośliny w ciemności. W młodych liściach, których plastydy charakteryzowały się stosunkowo luźnym typem ciał prolamellarnych i dobrze rozwiniętymi protylakoidami, stwierdzał niski poziom saponin i bardzo krótką fazę opóźnienia. Wydłużenie czasu inkubacji roślin w ciemności powodowało w plastydach wzrost objętości ciała prolamellarnego, zawartości w nim saponin i redukcję długości protylakoidów (dla *Avena* począwszy od 9 dnia inkubacji). Zmianom tym towarzyszyło wyraźne wydłużanie fazy opóźnienia dla formowania chlorofilu.

W odróżnieniu od chloroplastogenezy stymulowanej cytokininą w odciętych organach i tkankach, regulatory te z reguły nie wpływały na akumulację chlorofilu, formowanie systemu tylakoidowego (głównie gran) i funkcje fotosyntetyczne w nieuszkodzonych zazieleniających się liściach [1]. Jest to zgodne z poglądem o syntezie cytokinin w korzeniach (np. [158, 237] i cytowana tam literatura), ponieważ po odcięciu korzeni czułość na egzogenne cytokininy w rosnących i zazieleniających się liściach wzrastała proporcjonalnie do obniżania się w nich zawartości endogennych cytokinin [52, 196]. Obserwowane symptomy degeneracji chloroplastów, takie jak zmniejszenie objętości, zanikanie gran, obniżenie zawartości chlorofilu, chloroplastowych rybosomów, białka i RNA, aż do końcowego rozpadu plastydów w wakuoli trawiącej, ulegały zwolnieniu lub wręcz zatrzymaniu wkrótce po dodaniu egzogennych cytokinin [152, 247].

W porównaniu z materiałem kontrolnym, w plastydach traktowanych cytokininami, obserwowano niekiedy nawet stymulację syntezy białka, chlorofilu, formowania gran itd. (np. [44, 153, 157] i cyt. tam literatura [169]). Legocka i Szweykowska [126] podały, że w odciętych liściach jęczmienia trzymany w ciemności, <sup>6</sup>ade hamowała wzrost aktywności proteolitycznych enzymów i wyraźnie stymulowała syntezę białek. Stymulacja ta była najwyraźniejsza w frakcji jądrowej, a stosunkowo niewielka w frakcji chloroplastowej.

W badaniach mechanizmu działania cytokinin w procesie starzenia się plastydów przeważają prace dotyczące wpływu tych substancji na metabolizm białek i kwasów nukleinowych, a w mniejszym stopniu na przemiany cukrowców. Tymczasem, jak wynika z pewnych prac, zastosowanie egzogennych cukrów hamuje starzenie się odciętych liści [np. 45], a udział cytokinin w regulacji metabolizmu cukrowców jest w wielu pracach wyraźnie akcentowany [12, 136, 156, 230]. Cytokininy mogą także hamować proces starzenia się chloroplastów, modyfikując na przykład przepuszczalność błon [47, 186]. Opublikowane niedawno wyniki badań Gilberta i wsp. [73] potwierdzają przypuszczenia, zgodnie z którymi hamowanie starzenia przez cytokininy odbywa się na drodze kon-

troli funkcji błon komórkowych. Mechanizm, dzięki któremu substancje te utrzymują integralność błon, hamując tym samym procesy starzenia, nie jest jeszcze jasny. Pewne światło rzucają na to zagadnienie informacje o zapobieganiu przez egzogenne cytokininy wzrostowi aktywności lipoksygenazy. Wzrost aktywności tego enzymu towarzyszył starzeniu się odciętych liści grochu [79]. Powyższa informacja wiąże się również z danymi wskazującymi, że formowanie się krystalicznych lipidów w starzejących się błonach było wywołane utlenianiem lipidów (peroksydacja [174]). Podzielone są natomiast opinie na temat zjawiska obniżania się poziomu endogennych cytokinin w miarę starzenia się liści. I tak, między innymi Hewett i Wareing [91] oraz Mayak i Halevy [142] stwierdzili, że koncentracja cytokinin w starzejących się liściach była niższa niż w tkankach młodych. Z drugiej strony Engelbrecht [51], Ilan i Goren [96] oraz Van Staden [236] uzyskali wyniki wskazujące na wysoki poziom tych substancji w żółknących liściach, a u pewnych drzew nawet wyższy niż w liściach młodszych, nie wykazujących oznak starzenia. Nie zawsze więc można tłumaczyć hamowanie przez egzogenne cytokininy procesów starzenia tylko spadkiem zawartości endogennych cytokinin.

Możliwość odwracania procesów degeneracji plastydów przemawia raczej za udziałem cytokinin głównie w stymulowaniu syntezy materiałów budujących strukturę chloroplastów. Z danych przedstawionych w niniejszym rozdziale wynika, że cytokininy wpływają szczególnie na tworzenie gran. Już w 1974 r. Młodzianowski [152] zakładał, że jednym z możliwych mechanizmów oddziaływania cytokinin na ten proces może być stymulowanie syntezy białka wchodzącego w skład pewnych cząstek odpowiedzialnych za łączenie się tylakoidów w grana. Obecnie wiadomo, że za łączenie to odpowiedzialne są przede wszystkim zbierające światło kompleksy chlorofil a/b — białko = LHC [143]. Z kolei Axelos i Peaud-Lenoël [7] opublikowali wyniki wskazujące, że cytokinina warunkowała obecność w plastydach jednego z głównych składników tego kompleksu, a mianowicie polipeptydu o masie cząsteczkowej 25 kilodaltonów. Nie wiadomo jednak jeszcze, czy cytokinina kontroluje biosyntezę czy penetrację tego białka do wnętrza plastydu.

### III. DZIAŁANIE CYTOKININ NA ENZYMY PLASTYDOWE I CYTOPLAZMATYCZNE

Istnieje wiele dowodów wskazujących, że w procesie zazieleniania się etiolowanych roślin światło funkcjonuje nie tylko jako aktywator już istniejących enzymów, ale również jako promotor syntezy de novo [2, 25, 238]. Szczególnie dobrze udokumentowane są wyniki ilustrujące

rolę światła w aktywacji karboksylazy rybulozo-1,5-dwufosforanu (np. [27, 206]). Mało natomiast poznana jest rola światła w aktywacji innych chloroplastowych enzymów związanych z błonami. Najbardziej kompletne wyniki w tym zakresie uzyskał Bennett [10]. W 1977 r. wykazał on, że po oświetleniu polipeptydy związane ze zbierającym światło kompleksem chlorofil a/b — białko były fosforylowane w nieuszkodzonych chloroplastach. Zaś w roku 1979 [11] udowodnił, że światło jest również aktywatorem związanej z błonami tylakoidowymi kinazy. Z kolei z pracy Millsa i Hinda [150] wynika, że światło indukuje także aktywność zależnej od  $Mg^{2+}$  ATPazy. Inne dane na temat roli światła w regulacji chloroplastowych enzymów można znaleźć w opracowaniu Buchanana [28].

Cytokininy w działaniu na niektóre organy roślinne wykazują szereg analogii do efektów jakie powoduje białe światło. Najwięcej dowodów eksperymentalnych potwierdzających te analogie pochodzi z badań wpływu cytokinin na rozwój plastydów. Dane o wzroście aktywności (spowodowanej przede wszystkim syntezą de novo) karboksylazy rybulozo-1,5-dwufosforanu i NADP-zależnej dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerolowego po potraktowaniu cytokininą siewek żyta (niezależnie od tego czy rosły na świetle, czy w ciemności) opublikował Feierabend [58, 59]. Informacja Feierabenda o aktywacji przez cytokininę syntezy karboksylazy RuBP została potwierdzona przez Chochłową i wsp. [38], Harveya i wsp. [86], Klyachko i Parthiera [111], Klyachko i wsp. [112], Romanko i wsp. [192]. Wzrost aktywności pod wpływem cytokininy także innych enzymów plastydowych wykazali w siewkach żyta Feierabend i De Boer [60] oraz Romanko i wsp. [192]; w pełni rozwiniętych liściach fasoli — Treharne i wsp. [233], a w liścieniach ogórka — Harvey i wsp. [86]. Ze wzrostem aktywności karboksylazy RuBP wiązała się między innymi wyższa liczba polirybosomów plastydowych (tabela 1). Obecność zarówno chloramfenikolu (CAP), jak i cykloheksimidu (CHI) wpływała hamująco na wzrost aktywności tego enzymu, przy czym CAP ( $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) blokował wzrost aktywności natychmiast, a CHI ( $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) przez początkowe 4 godziny swej obecności tego wzrostu nie hamował, co wskazuje, że większa podjednostka karboksylazy RuBP może być syntetyzowana także wtedy, gdy równolegle nie zachodzi synteza mniejszej podjednostki [112]. Z kolei aktywność zależnej od NADP dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerolowego i niektórych enzymów cytoplazmatycznych była obniżona tylko po traktowaniu materiału CHI [58, 59, 86, 102]. Obserwowane różnice w hamowaniu przez dwa antybiotyki można łatwo wyjaśnić miejscem syntezy różnych enzymów na polirybosomach plastydowych — 70S (wrażliwe na CAP) lub na polirybosomach cytoplazmatycznych — 80S (wrażliwe na CHI).



TABELA 1

Zmiany w aktywności niektórych enzymów i w zawartości polirybosomów po 3-5 dniach traktowania cytokininami siewek żyta albo odciętych liścieni ogórka umieszczonych w ciemności lub na świetle. Wszystkie dane wyrażone jako procent kontroli (tkanka wyjściowa lub rosnąca w ciemności na wodzie). o — siewki żyta pozbawione korzeni. Za [173]

Enzym	Cytokina				Literatura
	— ciemność	+ —	— światło	+ —	
Karboksylaza RuBP	29°	190°	208	240	[58, 60]
Karboksylaza RuBP	114	172	165	206	[86]
Karboksylaza RuBP	65°	280°	170°	245	[192]
Fruktozodwufosfataza	28°	122°	540	—	[60]
Kinaza fosforybulozy	53°	188°	665	—	[60]
Transketolaza	41°	160°	224	—	[60]
NADP zależna dehydrogenaza jabłczanowa	33°	160°	327	—	[60]
NADPH zależna dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerolowego	87	167	97	192	[86]
	41°	187°	160	330	[42, 58]
Katalaza	40°	135°	270	—	[42]
Reduktaza hydroksypirogronianowa	37°	127°	310	—	[42]
Dehydrogenaza glukozo-6-fosforanu	75°	145°	100	—	[42]
Oksydaza cytochromu c	65°	132°	79	—	[42]
Zawartość polirybosomów 16S rRNA (plastydowe)	91°	147°	325	—	[60]
Zawartość polirybosomów 18S rRNA (cytoplazmatyczne)	100°	110°	169	—	[60]

Dodanie cytokinin przed lub równocześnie z inhibitorami nie przywracało pierwotnej aktywności enzymów w siewkach żyta. Ten brak zdolności do odwracania hamującego wpływu antybiotyku na syntezę enzymu obserwowano tylko dla enzymów plastydowych; hamowanie przez CHI aktywności dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu i dehydrogenazy 6-fosfoglukonianu było kompensowane przez kinetykę [59]. Należy zaznaczyć, że w etiolowanych liścieniach dyni hamujące efekty wywołane antybiotykami były zwykle mniejsze (mniej dotkliwe) niż w etiolowanych siewkach żyta. Ponadto działanie CHI nie było lub tylko w niewielkim stopniu było zmniejszane przez cytokininę [86, 102]. Rozbieżności, jakie istnieją między tymi dwoma tkankami, mogą odzwierciedlać wyższy stopień podatności na antybiotyki syntetyzowanych de novo cząsteczek enzymu w siewkach żyta. Jednakowoż obserwowane różnice mogą być też spowodowane niejednakowym tempem penetracji inhibitora do miejsca działania lub odmiennym metabolizmem inhibitora.

Wnioski te nie zostały jednak gruntownie sprawdzone doświadczalnie. Dlatego dedukcja na podstawie wyników badań, w których użyto inhibitorów, o wpływie cytokinin na syntezę de novo, szczególnie enzymów plastydowych, powinna być bardzo ostrożna. Feierabend [58] w swej pionierskiej pracy opublikował dane, które informują, że po zaaplikowaniu kinetyny rosnącym w ciemności siewkom żyta karboksylaza RuBP i NADP zależna dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerolowego osiągnęły w przybliżeniu taką samą aktywność, jaką wykazują te enzymy w roślinach nietraktowanych kinetyną, ale rosnących na świetle (tabela 1). Tempo wzrostu aktywności zależało od poziomu cytokinin w siewkach rosnących w ciemności, a obecność tej substancji wydawała się wstępnym warunkiem dla syntezy enzymu. Podobne wyniki przedstawili Harvey i wsp. [86], Klyachko i wsp. [112] oraz Lampugnani i wsp. [121], jednak oświetlając etiolowane liście traktowane przedtem BA uzyskali jeszcze dodatkowy wzrost aktywności enzymatycznej, przy czym wynik działania obu efektorów zastosowanych łącznie był silniejszy niż suma wyników uzyskanych przy zastosowaniu każdego z tych efektorów oddzielnie [121]. Z kolei Klyachko i wsp. [112], badając kinetykę wzrostu aktywności karboksylazy RuBP w liściach dyni pod wpływem światła lub BA, stwierdzili istnienie fazy opóźnienia (lag phase), której czas trwania zależał od fizjologicznego stanu liści. Również rodzaj efektora wydawał się ważny dla długości tej fazy: wcześniej bowiem obserwowano reakcję na oświetlenie niż na podanie egzogennej cytokinin. W chwili obecnej nie jest jeszcze jasne, czy szybkość reakcji odzwierciedla różny czas, jakiego te efekторы wymagają na dotarcie do będących ich celem cząsteczek (receptorów). Klyachko i wsp. [112] podali ponadto, że preinkubacja liści z BA w ciemności znosiła fazę opóźnienia we wzroście aktywności karboksylazy RuBP po oświetleniu. Wiadomo także, że cytokinin skracają lub nawet całkowicie likwidują istnienie fazy opóźnienia w syntezie chlorofilu (patrz rozdział I). Prawdziwy więc wydaje się pogląd, zgodnie z którym cytokinina w ciemności działa stymulująco na pewne etapy biosyntezy karboksylazy RuBP i chlorofilu. Jednak kompleksowy charakter karboksylazy RuBP i rozdzielanie miejsc kodujących dla jej podjednostek w różnych przedziałach komórki sugeruje konieczność istnienia kooperacyjnego mechanizmu w regulacji biosyntezy tego enzymu. Formowanie na drodze enzymatycznej określonych aminoacylo-tRNA jako bezpośrednich substratów w biosyntezie białka może być czynnikiem regulacyjnym w procesie translacji. A na tym właśnie poziomie postuluje się miejsce działania cytokinin. Wiadomo, że zlokalizowane w plastydach syntetazy aminoacylo-tRNA, jak również odpowiadające im syntetazy cytoplazmatyczne są kodowane w jądrze i syntetyzowane na polirybosomach cytoplazmatycz-

nych ([243] i cytowana tam literatura). Badania Klyachko i Parthiera [111] wykazały, że cytokininy podwyższały szczególnie syntezę plastydowych syntetaz (leucylo-tRNA syntetazy i walilo-tRNA syntetazy). Enzymy te, podobnie jak na przykład NADPH-zależna dehydrogenaza aldehydu fosfoglicerolowego, kinaza 5-fosforybulozy czy izomeraza 5-fosforybulozy, należą do enzymów stromy, które są syntetyzowane na cytoplazmatycznych polirybosomach. Tak więc stymulowana przez BA ekspresja genów w przedziale cytoplazmatyczno-jądrowym może dotyczyć przede wszystkim polipeptydów specyficznych dla plastydów, chociaż przy obecnym stanie wiedzy nie można także wykluczyć istnienia innego mechanizmu, a mianowicie ułatwiania przez cytokininę transportu przez błony. Fakt zwiększania przez cytokininy przepuszczalności błon znany był bowiem od dawna [61, 135]. Cytokinina podwyższała również aktywność ATPazy [181, 201], która między innymi odgrywa istotną rolę w transporcie jonów przez błony [53, 62, 119, 128, 167].

Zależna od hormonu stymulacja aktywności dotyczy przede wszystkim enzymów zlokalizowanych w plastydach. Aktywność na przykład enzymów cyklu pentozofosforanowego zlokalizowanych na terenie cytoplazmy była mniej podwyższana po zastosowaniu egzogennej cytokininy (tabela 1). Z kolei aktywność enzymów markerowych dla peroksysomów (oksydaza glikolanowa i reduktaza hydroksypirogronianowa), które są funkcjonalnie związane z aktywnością chloroplastów przez swój współudział w procesie fotooddychania, była również podwyższana po potraktowaniu cytokininą tkanki wrażliwej na tę substancję (tabela 1; [42]). Lista enzymów, których aktywność zależała od cytokinin została poważnie rozszerzona między innymi dzięki badaniom Gepsteina i Ilana [72], Ilana i Gepsteina [95], Karawajko i wsp. [102], Romanko i wsp. [192], Schneider i Szweykowskiej [204, 205], Spychały i wsp. [215]. Na przykład Karawajko i wsp. [102] oraz Romanko i wsp. [192] wykazali wyraźną zależność od cytokinin enzymów roślin typu „C<sub>4</sub>” (np. zasadowej pirofosfatazy). Również aktywność kinazy rybulozo-5-fosforanu była w dużej mierze uzależniona od cytokininy, natomiast kwaśna pirofosfataza, karboksylaza fosfoenolopirogronianu, izomeraza rybozo-5-fosforanu, dehydrogenaza 6-fosfoglukonianu i fruktozo-1,6-dwufosfataza należały do enzymów mniej wrażliwych na tę substancję. Coraz więcej danych przemawia obecnie za poglądem, że wzrost aktywności enzymów pod wpływem cytokinin jest spowodowany stymulacją przez te substancje ich syntezy. Feierabend [58] uważa, że nie ma tu miejsca derepresja genów. Cytokininy według niego określały jedynie zakres ekspresji genów. Pogląd o wywołanych przez fitohormony ilościowych raczej zmianach niż jakościowych znalazł też poparcie w doświadczeniach z inhibitorami ekspresji genów [59, 60, 86, 102, 112].

Podsumowując ten rozdział można przyjąć, że cytokininy w zazieleniających się liściach i liścieniach dają dwa wyraźne efekty na poziomie ekspresji genu: ogólnie, ale stosunkowo słabo stymulują aktywność cytoplazmatycznych enzymów, silniej natomiast — formowanie plastydowych enzymów i akumulację chlorofilu [60, 102]. Preferencja stymulacji aktywności plastydowych enzymów nie wiąże się jednak z pojawieniem się nowych ich rodzajów. Cytokinina nie wpływa więc na reakcje, które są związane z wywołaną światłem indukcją rozwoju chloroplastu. Obecne wyniki nie pozwalają jeszcze na jednoznaczną konkluzję, że substancje te działają wprost na ekspresję genów wewnątrz plastydu, ponieważ większość plastydowych enzymów pochodzi z przedziału jądrowo-cytoplazmatycznego lub przynajmniej jest pod jego kontrolą. Niemniej cytokininy mogą działać w sposób specyficzny na syntezę tych produktów pochodzenia cytoplazmatycznego, które są włączone w chloroplastogenezę, np. mniejszej podjednostki karboksylazy RuBP. Efekt ten może występować niezależnie od światła, które najprawdopodobniej stymuluje syntezę większej podjednostki (jest to ilustracja następującej po sobie kooperacji dwóch efektorów syntezy enzymu). Równocześnie nie powinno się wykluczać możliwości specyficznego działania cytokininy na syntezę większej podjednostki karboksylazy RuBP. Cytokinina może na przykład stymulować syntezę większej podjednostki wprost w plastydzie lub wpływać pośrednio przez ogólną kontrolę syntezy cytoplazmatycznego białka ([110, 172] i cytowana tam literatura).

#### IV. WPLÝW CYTOKININ NA SYNTĘZĘ KWASÓW NUKLEINOWYCH

Efekt działania cytokininy na syntezę DNA jest niejasny i kontrowersyjny [15, 43, 75, 100, 147, 161, 164, 166, 242, 251]. Naito i wsp. [166] na przykład przypuszczają, że oprócz wzrostu zawartości DNA na komórkę spowodowanego endopoliploidią lub amplifikacją genu, poważny wpływ na ten wzrost może mieć również obserwowane przez nich zwiększenie liczby chloroplastów na komórkę i ich wymiarów w wyniku traktowania liści cytokininą. Herrmann [89] oraz Herrmann i Kowallik [90] wykazali bowiem istnienie pozytywnej korelacji między wymiarami chloroplastu a zawartością DNA na chloroplast. Także Lamppa i Bendich [120] uzyskali dane, według których procent chloroplastowego DNA, określanego względem globalnej zawartości DNA w komórce, wzrastał z 8% w młodych liściach grochu do 12% w liściach w pełni zielonych. Z drugiej jednak strony Scott i Possingham [207] uważają, że najwyższy poziom plastydowego DNA mają małe, nie całkowicie zróżnicowane pod względem struktury i funkcji chloroplasty pochodzące z młodych liści szpinaku. Duże liście zawierały, według autorów, średnio 30 kopii

plastomu na chloroplast (tj.  $5 \times 10^{-15}$  g DNA), podczas gdy w mniejszych chloroplastach pochodzących z bazalnej części dwucentymetrowych liści było ich aż około 200 ( $32 \times 10^{-15}$  g DNA). Bezděk i Vyskot [15] na podstawie badań przeprowadzonych na autotroficznych pod względem cytokinin komórkach *Nicotiana* konkludują, że substancje te są włączane w kontrolę syntezy DNA. Niezgodności zaś w wynikach uzyskiwanych przez różnych autorów mogą być odzwierciedleniem złożoności problemu. Najprawdopodobniej bowiem cytokininy działają przynajmniej w dwóch (powiązanych ze sobą) kategoriach procesów — na etapie translacji [cfr. 229] oraz przez strukturalne i funkcjonalne zmiany w błonach komórkowych [cfr. 48].

W przeciwieństwie do ciągle kontrowersyjnej kwestii wpływu cytokinin na syntezę DNA, pogląd o ich stymulującym wpływie na syntezę RNA jest ogólnie akceptowany. Na podstawie wyników uzyskanych za pomocą różnych metod badawczych wiadomo, że cytokinina stymuluje syntezę całkowitego RNA jak również wszystkich trzech głównych klas RNA w zazieleniających się lub starzejących tkankach [46, 78, 85, 108, 110, 115, 117, 125, 161, 165, 171, 208, 210, 234, 242, 251]. Jednak metody stosowane w wymienionych pracach były z reguły zbyt mało czułe, aby można było za ich pomocą rozdzielić wszystkie klasy RNA i stwierdzić ilościowe różnice wywołane przez cytokininę. Należy ponadto uwzględnić błędy w interpretacji uzyskanych wyników doświadczeń z włączaniem prekursorów. Mogły być one spowodowane na przykład różnicami w puli prekursora, jaka wymagana jest dla różnych klas RNA, różnicami metabolicznej stabilności itp. Daleko więc jeszcze do jednoznacznego stwierdzenia, że cytokininy bezpośrednio lub pośrednio wpływają na określone klasy RNA silniej niż na inne. Szczególnie odczuwany jest brak dobrze udokumentowanych doniesień wskazujących, że cytokininy działają na syntezę frakcji, którą można by bez wątpienia traktować jako mRNA. Sugestie Rijvena [87] oraz Rijvena i Parkasha [189], że indukowany kinetyną wzrost odciętych liścieni kozieradki (*Trigonella*) był wywołany zmianą w syntezie mRNA, zostały oparte wyłącznie na dowodach pośrednich. Także Shininger [210] przypuszcza tylko, że wywołana traktowaniem kinetyną synteza RNA, w proporcjonalnie niewielkiej z początku liczbie komórek wyizolowanej tkanki miękkiszowej korzeni grochu, obejmowała frakcję podobną do mRNA. Później już więcej komórek syntetyzowało RNA, był to jednak przede wszystkim rRNA. Romanko i Selivankina [190] obserwowały stymulację przez BA włączania  $^{14}\text{C}$  adeniny głównie do frakcji RNA zbieranych między 18S rRNA i 4S RNA. Rejestrowały one również podwyższone wyznaczenie w polisomach materiału traktowanego cytokininą. Najlepiej udokumentowane wyniki wskazujące, że stymulowany BA wzrost

liścieni ogórka w ciemności był spowodowany wpływem tej substancji na syntezę mRNA, przedstawili Naito i wsp. [161]. Niemniej ciągle brak przekonujących dowodów na to, że cytokinina wpływa stymulująco na syntezę plastydowego mRNA. Uważa się, że najlepszą metodą charakteryzowania poszczególnych mRNA oraz rozpoznania ich produktów są doświadczenia z zastosowaniem translacji w systemach bezkomórkowych. Posłużenie się tą metodą nie jest jednak jeszcze możliwe dla chloroplastowych mRNA [172]. Szczególne znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmu działania cytokinin miały badania grupy Fosketa. Istotne w tych badaniach było między innymi stwierdzenie, że stymulacja przez cytokininę poziomu polirybosomów była niezależną od syntezy *de novo* mRNA, ale była wynikiem aktywacji zablokowanego, cytoplazmatycznego mRNA kodującego syntezę specyficznych białek umożliwiających podziały komórek [67]. W ostatnich latach intensywnie badano przede wszystkim organelowe RNA, głównie w odniesieniu do syntezy pod wpływem cytokinin rRNA. Jest to uwarunkowane między innymi względami metodycznymi, ponieważ oddzielenie, na przykład elektroforetycznie, różnych rodzajów plastydowych rRNA od cytoplazmatycznych, pozwala na określenie zawartości i tempa syntezy każdego z czterech wysokocząsteczkowych rRNA. Treharne i wsp. [233], pracując na dojrzałych liściach fasoli, nie obserwowali, podobnie jak Legocka i Szweykowska [124] w liściach kalarepy, stymulującego działania kinetyny na zawartość plastydowego rRNA. Pod wpływem tego regulatora wzrastała natomiast znacznie aktywność karboksylazy RuBP. Brak stymulującego wpływu BA na syntezę RNA w nieuszkodzonych chloroplastach wyizolowanych z liścieni dyni opisały też Mikulovich i Kukina [144]. W krążkach starzejących się liści tytoniu Takegami [226] stwierdził, że zawartość chloroplastowych rRNA malała szybciej niż cytoplazmatycznych, a w ciemności BA zapobiegała temu procesowi. Kiedy krążki liściowe trzymane na świetle, wtedy zwiększała się w nich zawartość zarówno plastydowych, jak i cytoplazmatycznych rRNA, jednak wówczas nie wykazywały one wrażliwości na BA. Założono więc, że światło i cytokininy kontrolują syntezę rRNA niezależnie od siebie.

Analizując inne wyniki można wyciągnąć odmienne wnioski. Dla przykładu: w izolowanych krążkach liściowych tytoniu umieszczonych na pożywce zawierającej sacharozę [78] oraz w etiolowanych lub zazieleniających się liścieniach [108, 145, 194] — synteza chloroplastowych rRNA była stymulowana przez BA zarówno na świetle, jak i w ciemności. Warto zaznaczyć, że chociaż oba efektory (cytokinina i światło) wyraźnie zwiększały syntezę cytoplazmatycznych rRNA, to jednak światło znacznie silniej podwyższało syntezę plastydowych rRNA niż cytoplaz-

matycznych [145]. Autorzy ci uważają, że stymulacja akumulacji plastydowego rRNA przez BA była wywołana zarówno przez wzrost liczby plastydów w komórce, jak i przez podwyższenie zawartości rRNA w plastydzie. Donieśli oni również, że istnieje wyraźna różnica w kinetyce wzrostu zawartości plastydowych i cytoplazmatycznych rRNA. W okresie 0-24 godzin, BA na świetle znacznie słabiej stymulowała nagromadzenie się plastydowych rRNA niż cytoplazmatycznych. Z kolei porównując kinetykę indukowanej światłem i BA akumulacji plastydowych rRNA stwierdzili, że efekt światła ujawnił się wcześniej niż efekt cytokininy. Z drugiej strony, Roussaux i wsp. [194] uzyskali wyniki wskazujące, że cytokininy w czasie chloroplastogenezy w izolowanych liściach ogórka działają najpierw na poziom syntezy cytoplazmatycznego rRNA. Bowiem stymulacja, pod wpływem BA, włączania  $^{32}\text{P}$  do cytoplazmatycznego rRNA była silniejsza niż do plastydowego rRNA, a ponadto indukowana światłem synteza plastydowego rRNA nie była już bardziej podwyższana przez BA. Podobne rezultaty uzyskały Legocka i Szweykowska [125] badając wpływ  $i^6ade$  na włączanie  $^{14}\text{C}$  uracylu do rRNA odciętych i umieszczonych w ciemności liści jęczmienia. Stosowana przez te autorki cytokinina zapobiegała wzrostowi aktywności RNAazy, powodowała wzrost poziomu całkowitego RNA oraz stymulowała włączanie  $^{14}\text{C}$  uracylu do cytoplazmatycznych rRNA, ich prekursorów i do niskocząsteczkowych RNA. Wywołane  $i^6ade$  zmiany w RNA frakcji plastydowej były bardzo niewielkie lub nie obserwowano ich wcale. Pogląd, zgodnie z którym cytokinina hamując procesy starzenia liści działa głównie na poziom cytoplazmatycznych rRNA, popierają również wyniki opublikowane przez Romanko i wsp. [191] oraz Schneider i wsp. [203]. Stwierdzili oni, że podwyższenie aktywności polimerazy RNA w traktowanych cytokinina liściach jęczmienia, dotyczyło polimerazy I — katalizującej właśnie syntezę rRNA. Wpływ cytokininy na syntezę cytoplazmatycznych rRNA był także obserwowany w badaniach, w których materiał stanowiły liście kalarepy, liścienie ogórka, liścienie rzodkiewki, miękisz tytoniu [124, 161, 171, 254]. Naito i wsp. [161] badając wpływ BA na włączanie  $^3\text{H}$  urydyny do RNA izolowanych liści ogórka wykazali, że cytokinina w ciemności stymulowała znacznie silniej syntezę cytoplazmatycznego rRNA niż plastydowego rRNA. Również Takegami [226] posługując się innym systemem doświadczalnym doszedł do podobnych wniosków. Używając w swych doświadczeniach cykloheksimidu stwierdził, że inhibitor ten obniżał efekt wywierany przez BA na poziom plastydowego rRNA. Wskazuje to, że cytoplazmatyczne rybosomy poprzez syntezę określonych białek uczestniczą w kontroli syntezy plastydowego rRNA. Kinoshita i wsp. [108] wykazali natomiast,

że BA w podobnym stopniu zwiększała zawartość zarówno cytoplazmatycznego rRNA, jak i plastydowego, przy czym proporcjonalnie wzrost ten był taki sam w ciemności, jak i na świetle [172].

Parthier [172] uważa, że stymulacja przez cytokininę procesu formowania się plastydowego rRNA w czasie chloroplastogenezy może być wyjaśniona jako zależna od hormonu aktywacja aparatu jądrowej transkrypcji lub cytoplazmatycznej translacji, na przykład przez podwyższenie zawartości plastydowej polimerazy RNA lub rybosomalnych białek, które produkowane są na rybosomach cytoplazmatycznych. Ponadto pozostaje otwartą kwestia, czy cytokininy i światło wpływają w taki sam, czy w różny sposób na pobieranie prekursorów RNA i ich dostępność w dwóch różnych miejscach polimeryzacji wewnątrzkomórkowej. Wiadomo również, że rybosomalne RNA mniej podlegają jakościowym zmianom w czasie procesów różnicowania niż RNA o mniejszej cząsteczce. Z tego też powodu należy oczekiwać większych różnic w spektrach i funkcjach na przykład izoakceptorowych tRNA, które podobnie jak mRNA są ściśle związane z regulacją procesów różnicowania. Istnieją co prawda opublikowane informacje o selektywnym wpływie cytokinin na tRNA po ich rozdziale na izoakceptory. Cytokinina powodowała jednak wyłącznie ilościowe zmiany i to tylko w pewnych izoakceptorach. W traktowanych BA liścieniach soi dwa plastydowe izoakceptory tRNA, specyficzne dla leucyny, wykazywały wzrost w porównaniu z kontrolą [16]. Zawartość cytoplazmatycznego izoakceptora tRNA<sup>leu</sup> ulegała w porównaniu z kontrolą zmniejszeniu. Modyfikujący wpływ cytokinin na różnicowanie się niektórych tRNA obserwowano także w zarodkach łubinu [127]. Cztery lata później Pillay i Cherry [176] stwierdzili, że obok tRNA<sup>leu</sup> zmieniała się także zawartość serylo- i tyrozylo-tRNA chociaż przy innych koncentracjach zeatyny i BA. Brak jakościowych różnic w izoakceptorach tRNA w czasie starzenia się liścieni jest zgodny z faktem nie pojawiania się nowych izoakceptorów tRNA przy transformacji etioplastów w chloroplasty [243].

W roku 1966, Zachau i wsp. [253] w swej pionierskiej pracy stwierdzili, że w dwóch tRNA specyficznych dla seryny znajduje się w bliskim sąsiedztwie końca 3'-anty kodonu rybozyd i<sup>6</sup>ade (= 6-(3-metylobut-2-enyloamino)-9-β-D-rybofuranosylopuryna = i<sup>6</sup>ado). Od tego czasu znajdowano cytokininy w preparatach tRNA pochodzących z szeregu organizmów: bakterii, drożdży, roślin wyższych, a nawet zwierząt ([170, 212] i cyt. tam lit.). Wyróżniającymi się cytokininami w roślinnych tRNA są według Swaminathana i wsp. [221]: (1) i<sup>6</sup>ado, (2) cis-rybozyd zeatyny = 6-(4-hydroksy-3-metylobut-cis-2-enyloamino)-9-β-D-rybofuranosylopuryna oraz (3) metylotio-rybozyd zeatyny = 6-(4-hydroksy-3-metylobut-2-enyloamino)-2-metylotio-9-β-D-rybofuranosylopuryna. Warto zaznaczyć, że ostatni typ podstawienia zlokalizowany jest wyłącznie we frak-



cji chloroplastowego tRNA u *Euglena gracilis*, brak go w tRNA aplastydowych mutantów tego gatunku [87, 221]. Vreman i wsp. [239] stwierdzili, że chloroplastowe tRNA z liści szpinaku zawierały i<sup>6</sup>ado oraz tylko izomer cis-metylotio-rybozydu zeatyny, natomiast, rybozyd zeatyny występował jedynie w cytoplazmatycznych frakcjach tRNA, a nie wykryto go we frakcji chloroplastowego tRNA.

Obecność substancji wykazujących aktywność cytokininową w antykodonowej pętli tRNA nie jest najprawdopodobniej przypadkowa. Brak jednak dowodów na istnienie bezpośredniej korelacji między reakcją fizjologiczną a obecnością cytokinin w tRNA. Szereg faktów bezpośrednio przemawia na korzyść poglądu o ich raczej niewielkiej roli. I tak zeatyna, na przykład jako naturalna, wolna cytokinina, w formie trans jest sto razy bardziej biologicznie aktywna niż formy cis, które są najczęściej wykrywanymi cytokininami w tRNA komórek roślinnych. Doświadczenia zaś, w których posługiwano się metodą włączania prekursorów, dostarczyły informacji, że tylko jedna cząsteczka cytokininy przypada na 2000-10 000 cząsteczek tRNA [29]. Ponadto znakowana BA czy kinetyna znacznie silniej włączane były w rRNA niż w tRNA [159]. Istnieją też uzasadnione przypuszczenia, że i<sup>6</sup>ado nie wykazuje w ogóle aktywności cytokininowej tak długo jak długo stanowi integralny składnik cząsteczki tRNA [30, 237]. Przypuszczenia te potwierdza dodatkowo fakt, że tkanki zależne od cytokininy, a zawierające takie substancje w swoich tRNA, wymagają stałego dopływu z zewnątrz wolnych cytokinin [172]. Z drugiej strony wiadomo, że obecność cytokinin w tRNA ma duże znaczenie dla zdolności aminoacylo-tRNA do wiązania się z rybosomami. Pozostaje też otwarta kwestia, czy aktywność nukleotydylotransferazy tRNA (EC 2.7.7.25), kontrolującej proces translacji przez regenerację końcowych sekwencji tRNA (co stanowi warunek do estrowego połączenia tRNA z aminokwasem), jest w głównej mierze zależna od cytokinin [205].

Jak więc widać z przedstawionych faktów, informacje, które są obecnie do dyspozycji, nie pozwalają jeszcze jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy cytokininy wpływają na procesy transkrypcji w plastydach i jądrze komórkowym. Nadal także nie wiadomo, czy pewne rodzaje RNA są wybiórczo syntetyzowane pod wpływem tych substancji, mimo że na ten temat prowadzonych jest bardzo wiele prac doświadczalnych w licznych laboratoriach na całym świecie.

#### V. WPŁYW CYTOKININ NA BIOSYNTEZĘ BIAŁEK CHLOROPLASTOWYCH

Już dość wcześnie stwierdzono, że cytokininy stabilizują poziom syntezy białka w starzejących się liściach [169, 185]. Dalsze badania wykazały, że stymulacja syntezy RNA i białka jest jednym z najbar-

dziej charakterystycznych biochemicznych efektów działania cytokinin (cfr. [29, 97, 106, 116]). Grebanier i wsp. [77] zbadali zmiany, jakim uległy plastydowe białka kukurydzy przy przekształcaniu się etioplastów w chloroplasty. Na podstawie uzyskanych wyników wytypowali trzy klasy białka: do pierwszej zaliczyli białka obecne w etioplastach i zanikające w czasie zazieleniania się; do drugiej białka nieobecne lub obecne w niewielkich ilościach w etioplastach, a pojawiające się lub ulegające zwiększeniu wraz z rozwojem chloroplastów, natomiast w trzeciej klasie znalazły się białka, które były obecne zarówno w etioplastach, jak i chloroplastach. Podobne klasy wyróżnili Ohya i wsp. [168] wśród białek budujących błony plastydowe izolowanych liścieni ogórka. Do pierwszej klasy należały białka o masie 36 kilodaltonów (kd), w obrębie drugiej klasy znalazły się białka o masie 24 kd i 48 kd, zaś w trzeciej białka o masie 56 kd i 59 kd oraz kilka innych. Na świetle obserwowali oni szczególnie wyraźny wzrost zawartości białka o masie 24 kd. Podobnie charakterystyczny wzrost zawartości w czasie zazieleniania opisywano dla białkowych składników LHC [3, 4, 5, 77]. Choć 24 kd białko plastydów liścieni ogórka różniło się masą (podjednostki białkowe LHC kukurydzy mają na przykład masy cząsteczkowe 26; 27; 27,5 kd [77]), to Ohya i wsp. [168] uważają, że jest to podjednostka białkowa LHC. Z kolei białka o masach 59 kd i 56 kd są, według Ohya i wsp. [168], odpowiednio podjednostkami  $\alpha$  i  $\beta$  zewnątrz błonowego oligomeru czynnika sprzęgającego ( $CF_1$ ). Autorzy ci stwierdzili również, że w liścieniach ogórka BA stymulowała w ciemności zanikanie białka o masie 36 kd oraz eliminowała fazę opóźnienia syntezy LHC obserwowaną w kontroli i zwiększała jego poziom, ale tylko na świetle. Już w roku 1980 Axelos i Péaud-Lenoël [7] opublikowali dane, zgodnie z którymi białkowy składnik LHC może nawet być wykorzystywany w charakterze molekularnego markera aktywności cytokininy w komórkach kultury komórkowej tytoniu linii AG<sub>14</sub>, rosnących przy ciągłym oświetleniu na płynnej pożywce. W swych wcześniejszych pracach zauważyli oni, że tylko wtedy, gdy doda się cytokininę w czasie fazy wzrostu tej kultury, w komórkach rozwijają się normalne chloroplasty z dobrze wykształconym systemem tylakoidowym [209]. Kiedy wyizolowano takie chloroplasty i przebadano w nich zawartość polipeptydów metodą SDS elektroforezy na żelu poliakrylamidowym, okazało się, że specyficzną cechą elektroforetycznego diagramu była obecność dużego polipeptydu migrującego razem z podjednostką białkową o masie 25 kd, a pochodzącą z oczyszczonego LHC. Pozbawione chlorofilu plastydy wyizolowane z komórek rosnących bez cytokininy nie miały tego polipeptydu. Rodzi się jednak od razu problem, czy cytokininy kontrolują biosyntezę białkowych podjednostek LHC czy też ich penetrację do wnętrza plastydu?

W liściach jęczmienia Apel i Kloppstech [4] pokazali, że polipeptyd o masie 25 kd jest transkrybowany jako prekursor o masie 29,5 kd i jako taki penetruje do wnętrza chloroplastu, gdzie łączy się z błonami po utracie małego fragmentu swej sekwencji. Do podobnych wniosków doszli Axelos i Péaud-Lenoël [7]. Uważają oni mianowicie, że prekursor białkowej podjednostki LHC przed penetracją do plastydu przechowywany jest w cytoplazmie, a jego obecność w plastydzie kontrolowana jest przez BA. Ohya i wsp. [168] nie negując opisanej możliwości sugerują ponadto, że cytokinina może w ciemności zastępować cytochrom ( $P_{fr}$ ) w stymulacji syntezy mRNA dla białka LHC, zaś na świetle zwiększać także tempo translacji.

Ogromne nadzieje na wyjaśnienie roli cytokinin w syntezie białka plastydów rokuje pozakomórkowe doświadczenia nad translacją. Eliminują one bowiem uboczny efekt cytokinin — zwiększone pobieranie prekursorów [249]. Wczesne doświadczenia z tego zakresu, na przykład Daviesa i Cockinga [41] oraz Kułajewej i Romanko [118], pomimo że wykonane na podstawie „surowej” frakcji chloroplastów i ledwie spełniające wymagania, jakie stawia się obecnie metodzie pozakomórkowej syntezy polipeptydów w plastydach, dostarczyły jednak informacji o stymulującym wpływie cytokinin na włączanie znakowanych aminokwasów do materiału nierozpuszczalnego w kwasie trójchlorooctowym (TCA). Także Richmond i wsp. [186] stwierdzili stymulację włączania  $^{14}C$  leucyny do białek izolowanych chloroplastów liści tytoniu traktowanych cytokininą. Uzyskiwane przez nich wyniki w znacznej mierze zależały od pory roku. I tak, chloroplasty nietraktowanych roślin zbieranych wiosną, jesienią i zimą wykazywały wyższe włączanie w porównaniu z chloroplastami roślin zbieranych latem. Jednak tylko w przypadku tych ostatnich obserwowano stymulację przez cytokininy i to z reguły w początkowym okresie. Przy przedłużającym się czasie inkubacji z cytokininą brak było efektu. Autorzy tłumaczyli to działaniem cytokinin na stopień uwodnienia chloroplastów i stabilizację przepuszczalności błon. Nie zanotowano natomiast bezpośredniego wpływu cytokinin na chloroplastowy aparat translacji [185]. Z kolei Rijven [188] obserwował zwiększoną zdolność rybosomów z liścieni kozieradki, traktowanych uprzednio zeatyną, do inicjacji syntezy białka na matrycy poliU. Bezpośrednie dodanie fitochromu do takiego układu pozostawało bez efektu. Klämbt [109] doniósł o niewielkiej stymulacji procesu translacji przez  $i^6ade$  (o 20-30% wyższa niż w układzie kontrolnym) w systemie *in vitro*. Autor ten uzyskał stymulację syntezy białka jedynie w wyniku stosowania polirybosomów poddanych przez 20 godzin dializie, co miało uwalniać cytokininę związaną z rybosomami, czyniąc je tym samym bardziej wrażliwe na cytokininę wprowadzoną do systemu *in vitro*.

Gwóźdź [81] natomiast, używając niedializowanych polirybosomów ze splećka mchu wykazał, że dodanie  $i^6ade$  w szerokim zakresie stężeń do mieszaniny inkubacyjnej nie miało żadnego wpływu na intensywność białka *in vitro*, co wskazuje zdaniem tego autora na brak w tym materiale bezpośredniego oddziaływania między polirybosomami a cytokininą. Również Ralph i wsp. [182] nie uzyskali dowodów na istnienie bezpośredniego wpływu BA lub zeatyny na proces syntezy białka *in vitro*. W konkluzji stwierdzili oni, że w syntezie *in vitro* cytokinina nie wpływała ani na inicjację ani elongację polipeptydu. Z kolei analiza produktu translacji *in vitro* z użyciem polirybosomów liścieni ogórka wykonana przez Gwoźdź [81] wykazała obecność kilkudziesięciu pasm, w tym wiele w obszarze białek wysokocząsteczkowych. Nie stwierdzono jednak różnic jakościowych między wariantem kontrolnym a cytokinowym w zakresie syntetyzowanych białek, a tylko zróżnicowanie w intensywności syntezy pewnych frakcji białkowych. Sugeruje to, że cytokinina w liścieniach ogórka zwiększała tylko poziom polirybosomów odznaczających się wyższą intensywnością syntezy pewnych białek. We wszystkich tych doświadczeniach nie stwierdzono jednak, czy włączenie aminokwasów do materiału nierozpuszczalnego w TCA jest odzwierciedleniem biosyntezy określonego plastydowego czy cytoplazmatycznego polipeptydu. Dokonano tego dla pewnych rozpuszczalnych i tylakoidowych białek, włącznie z większą podjednostką karboksylazy RuBP [49]. Także Lescure [132] stwierdziła różnicę, kiedy porównywała syntezę *in vitro* polipeptydów w materiale traktowanym cytokininą i nietraktowanym. W plastydach wyizolowanych z komórek tytoniu linii AG<sub>14</sub>, które hodowała w kulturach zawieszinowych, bez cytokininy uzyskała znacznie słabsze wyznakowanie dwóch niskocząsteczkowych polipeptydów (16 kd i 11 kd) niż w wariacie z cytokininą. Na tej podstawie uważała, że cytokinina, która jest wymagana w tych komórkach do wyróżnicowania się dojrzałych chloroplastów, specyficznie stymuluje syntezę pewnych plastydowych polipeptydów. Ze względu na to, że doświadczenie wykonano opierając się na „surowej” frakcji chloroplastów, autorka ponownie przeprowadziła analizę syntezy polipeptydów po uprzednim oczyszczeniu chloroplastów na gradiencie gęstości krzemionki. Przeprowadzona następnie, metodą SDS elektroforezy na żelu poliakrylamidowym, analiza syntezy polipeptydów z oczyszczonej frakcji chloroplastów wykazała, że radioaktywne wierzchołki zajmowały podobne pozycje, jak w przypadku, kiedy stosowano „surową” frakcję [133]. Stanowi to zdaniem autorki dowód, że opisane w pracy [132] niskocząsteczkowe polipeptydy są rzeczywiście chloroplastowego pochodzenia. Dość powszechnie przyjmuje się, że o intensywności syntezy białka można wnioskować, m.in.

na podstawie zawartości polirybosomów. Jednym z charakterystycznych efektów traktowania cytokininą różnorodnego materiału roślinnego jest wzrost zawartości w komórkach i organellach rybosomów i polirybosomów [60, 81, 83, 98, 140, 216, 229, 246], przy czym cytokininy, podobnie jak światło, bardziej zwiększają zawartość plastydowych rybosomów niż cytoplazmatycznych [60, 226]. Feierabend i De Boer [60] podali na przykład, że w ciemności pod wpływem traktowania kinetyną, zawartość w liściu cytoplazmatycznych polirybosomów niewiele się zmieniła. Znacznie wyraźniej natomiast, zmieniała się zawartość polirybosomów plastydowych. W plastydach materiału kontrolnego polirybosomy stanowiły 11% całkowitej liczby plastydowych rybosomów, a w plastydach materiału traktowanego cytokininą liczba ta wzrosła do 18%. Jednak samo tylko działanie światła powodowało, że polirybosomy stanowiły aż 39% wszystkich rybosomów znajdujących się w plastydach liści żyta. Mimo że istnieje wiele doniesień, w których wykazano stymulujący wpływ roślinnych regulatorów wzrostu i rozwoju na formacje polirybosomowe, nadal niezbyt jasny jest mechanizm tego procesu. Niektóre dane sugerują na przykład, że hormonalna stymulacja powstawania polirybosomów może odbywać się na drodze przegrupowania wolnych rybosomów w polirybosomy, bez angażowania procesu transkrypcji [68, 83, 160, 246]. Nie można jednak wykluczyć innych możliwości, jak chociażby zmniejszenia, pod wpływem cytokininy, aktywności bądź syntezy RNazy [17]. Z kolei wyniki badań Gwoździa [81] pokazały, że cytokininowej stymulacji tworzenia się polirybosomów nie odpowiadało zwiększone włączenie prekursora ( $^3\text{H}$ -adenozyny) do tej frakcji. Większą korelację w rozmieszczeniu radioaktywności obserwował on w obszarze monosomów, co może wskazywać na obecność nowo tworzonych rybosomów. Cytokininina powoduje nie tylko wzrost zawartości polirybosomów, ale także zwiększa ich efektywność w procesie translacji. Jakowlewa i wsp. [98] wykazali na przykład, że polisomy otrzymane z odciętych liścieni dyni traktowanych BA ( $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), były aż dwukrotnie aktywniejsze w syntezie białka *in vitro* niż polirybosomy liścieni kontrolnych, które inkubowano w wodzie. Podobne wyniki uzyskali Gwóźdź i Szweykowska [82] używając rybosomów splećka mchu *Ceratodon purpureus*. Maass i Klämbt [140] zaś opublikowali dane, z których wynika, że w komórkach kultury tkankowej tytoniu, po uprzednim zablokowaniu syntezy RNA za pomocą aktynomycyny D, hormon stymulował *in vivo* włączenie znakowanych prekursorów do polipeptydów przyłączonych do rybosomów. Dane te sugerują, że wpływ cytokinin na syntezę białka może być związany z modyfikacją samych rybosomów [cfr. 83]. Wskazują na to także doniesienia o przyłączaniu się cytokinin do tych struktur [13]

za pośrednictwem specyficznego białka receptorowego, funkcjonalnie związanego z rybosomami [69, 70, 227, 228]. Funkcjonalna rola tego białka nie została jednak dotychczas wyjaśniona.

## VI. MECHANIZM DZIAŁANIA CYTOKININ

Od szeregu lat w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie prowadzi się intensywne badania mające na celu wyjaśnienie molekularnych podstaw działania cytokinin (i innych hormonów roślinnych). Jednak uzyskane dotychczas wyniki nadal nie pozwalają w sposób jednoznaczny określić, jaki jest najbardziej pierwotny mechanizm, dzięki któremu substancje te wpływają na wzrost i rozwój roślin. Jest to spowodowane między innymi tym, że większość badań wykonana została *in vivo*, gdzie efekty egzogennych fitohormonów były modyfikowane przez przeważnie nieznaną poziom i fizjologiczną aktywność endogennych hormonów. Z wpływem cytokinin na rozwój plastydów *in vivo* interferuje także wiele innych czynników, jak chociażby interakcje między cytokininą a innymi hormonami. Nie bez znaczenia jest w takich badaniach również wiek tkanki, warunki pokarmowe, obecność lub brak systemu korzeniowego i wiele innych. Szereg doświadczeń nad wpływem cytokinin na rozwój plastydów wykonuje się używając kultur komórkowych i tkankowych. Należy jednak pamiętać, że zawierające na przykład chloroplasty komórki kultury tkankowej nie są ekwiwalentne komórkom mezofilu tego samego gatunku rośliny ani strukturalnie ani funkcjonalnie.

Na podstawie aktualnego stanu wiedzy wysunięto kilka możliwych hipotez na temat sposobów działania cytokinin. Na przykład Miller [148, 149], badając wpływ tych substancji na mitochondria i komórki kultury zawieszinowej soi, opisał że powodują one, w zależności od czasu podania i koncentracji, podwyższenie lub obniżanie metabolizmu p-kumaranu (najprawdopodobniej jego utleniania). W stężeniu 0,5 mM niektóre z badanych cytokinin hamowały zużycie tlenu zarówno przez komórki, jak i przez preparaty mitochondriów. Hamowały one również utlenianie: gwajakolu, benzydyny, pirogalolu, L-epinefryny i innych. Miller sądzi więc, że hormony te oddziałują w niezbadany dotąd sposób na pewien etap oddychania. Z kolei Perl [175] doniósł, że cytokininy wpływają stymulująco na syntezę ATP. Autor ten stwierdził, że kinetyna ( $10^{-5}$ - $10^{-3}$  M) zwiększała aktywność jednej z dwu wyodrębnionych przez niego frakcji kinazy adenylanowej (EC 2.7.4.3) w kierunku syntezy ATP z ADP. Intensywniejsza synteza ATP odbywała się, zdaniem autora, dzięki przyłączeniu kinetyny ( $33 \mu\text{mole} \cdot \text{mg}^{-1}$  białka) do tej frakcji (uzyskanej z nasion grochu) przez co zwiększało się powinowactwo kina-

zy adenylanowej do ADP. Wpływ cytokinin na ATP i inne składniki komórkowe z konfiguracją pierścienia purynowego sugerowano już wcześniej. Kende [106] uważał, że cytokininy jako pochodne puryny mogą pełnić funkcję kofaktorów o specyficznej, regulacyjnej funkcji.

Z kolei hamowanie przez cytokininy procesów starzenia [151, 153, 154, 247] sugeruje, że substancje te kontrolują degradację RNA i białka, głównie na drodze hamowania aktywności RNazy i proteazy [39, 106, 171]. Przy analizowaniu wpływu cytokinin na procesy fizjologiczne należy pamiętać, że podobnie jak i pozostałe fitohormony mogą one wykazywać dwa typy działania: indukujące i stymulujące. Oba mogą być ściśle ze sobą związane i zachodzić równocześnie, jednak ich molekularne mechanizmy są odmienne. Bardzo dogodnymi obiektami do badania sposobu działania cytokinin są mchy. Jedną z najbardziej specyficznych reakcji na cytokininy jest bowiem indukcja masowego formowania pąków gametoforowych w splątkach mchów [76, 84, 225, 235]. U wielu mchów tylko kaulonema jest zdolna do takiej reakcji. Chloronema albo nie wykazuje reakcji, albo reaguje tylko niespecyficznym stymulacją podziałów komórkowych [224]. Z tego powodu traktuje się komórki kaulonemy jako „komórki docelowe” (target-cells), gdyż dysponują one mechanizmem(-ami) rozpoznawania sygnałów zarówno endo-, jak i egzogennych. Percepcja bodźców hormonalnych związana jest najprawdopodobniej z obecnością specyficznych białek receptorowych. Badania autoradiograficzne z użyciem  $^{14}\text{C}$  benzyloaminopuryny wykazały akumulowanie się radioaktywności w komórkach kaulonemy, jak również w samych pąkach gametoforowych [26]. Jednak brak zarówno akumulacji, jak i fizjologicznej reakcji po delikatnym płukaniu nitek wskazuje, że wiązania hormonu z miejscami receptorowymi nie miały charakteru kowalencyjnego. Mimo dalszych licznych prac [13, 14, 36, 54, 69, 70, 71, 114, 177, 220, 227, 228, 252] i istotnego postępu w badaniach nad białkami receptorowymi (wiązącymi cytokininy), uzyskane dane nadal nie wyjaśniają mechanizmu ani miejsca działania cytokinin. Istnieją bowiem na przykład znaczne niezgodności w subkomórkowej lokalizacji i masach cząsteczkowych wiążących cytokininy białek wyizolowanych w różnych laboratoriach (tabela 2). Badania Berridge'a i wsp. [13, 14] wykazały, że wiązanie cytokinin ma miejsce na rybosomach cytoplazmatycznych. Wyniki te zostały potwierdzone przez Foxa i Eriona [69, 70] oraz przez Takegami i Yoshidę [227, 228], którzy wyizolowali z rybosomów białka wiążące hormon. Jest to również fakt potwierdzający pogląd o kontrolowaniu przez cytokininy procesu syntezy białka na poziomie translacji. Gwóźdź [81] przypuszcza, że kontrola taka może odbywać się bądź na drodze syntezy czy aktywacji któregoś z czynników inicjacyjnych lub też poprzez taką modyfikację rybosomów, która zwię-

TABELA 2

Ogólna charakterystyka białek wiążących cytokininy. Kd — stała dysocjacji wzbogaconego lub oczyszczonego białkowego receptora cytokininy, której skrót nazwy umieszczono w nawiasach. Glikoproteid uzyskany z *Achlya* wiąże oprócz cytokinin także IAA i tryptofan. Do oczyszczania białek zastosowano różne metody chromatograficzne [172]

Materiał roślinny	Fracja komórkowa	Ciężar cząsteczkowy (D)	Kd (M)	Literatura
<i>Achlya</i>	błony	6000 (glikoproteid)	około $10^{-5}$	[129]
liście tytoniu	rybosomy	5 000	$4 \times 10^{-5}$ (BA) do $4 \times 10^{-6}$	[227, 228, 252]
kiełki pszenicy	rybosomy, frakcja rozpuszczalna	93 000	$5 \times 10^{-7}$ do $1 \times 10^{-6}$ (BA)	[70]
kiełki pszenicy komórki tytoniu	frakcja rozpuszczalna	30 000 180 000	$2 \times 10^{-7}$ (KIN)	[177]
Funaria hygrometrica komórki zawieszinowej kultury <i>Daucus carota</i>	frakcja ziarnistości nierybosomowych		$10^{-7}$ (BA) $3 \times 10^{-8}$ (BA) $3 \times 10^{-6}$ (BA)	[220] [71] [114]

kszałaby ich powinowactwo do matrycy lub błon cytoplazmatycznych. Białka wiążące cytokininy znajdowano także we frakcji cytozolowej. Sussman i Kende [220] uzyskali z komórek tytoniu ziarnistą (nierybosomową) frakcję, która sedymentowała przy  $80\,000 \times g$ . W frakcji tej autorzy stwierdzili obecność przynajmniej dwóch składników wiążących cytokininy. Jeden z nich (główny) wykazywał niskie powinowactwo do cytokinin, był odporny na podgrzewanie do  $100^{\circ}\text{C}$  oraz nie był specyficzny dla biologicznie aktywnych analogów cytokinin. Drugi, rzadziej spotykany składnik, był wrażliwy na wysoką temperaturę, wykazywał wysokie powinowactwo do cytokinin i był specyficzny dla biologicznie aktywnych analogów hormonu. Z drugiej strony, Polya i Davies [177], używając cytozolowej frakcji uzyskanej z kiełków pszenicy, wyizolowali z niej białko o wysokim powinowactwie zarówno do naturalnych cytokinin jak i ich pochodnych. Stała dysocjacji tego białka (Kd) wynosiła  $2 \times 10^{-7}$  M, co stanowi o dwa rzędy wielkości mniej niż Kd „receptora” opisanego przez Takegami i Yoshidę [227, 228]. Należy również wspomnieć o możliwości przyłączania się cytokinin do niebiologicznych materiałów, na przykład do talku [71, 220]. Szczegółowa charakterystyka takiego wiązania się BA z talkiem wykazała co prawda pewne różnice w porównaniu z wiązaniem cytokininy do biologicznych struk-



tur, jednak we wszystkich badaniach wiązania cytokinin powinno się mieć pewność, że dany przypadek nie jest tylko zwykłą adsorpcją bez większego biologicznego znaczenia.

Podsumowując zagadnienie receptorów wydaje się, że do zrozumienia, jak interakcja: hormon-specyficzny receptor inicjuje biochemiczne reakcje (prowadzące do efektu fizjologicznego) wymagana jest dalsza szczegółowa charakterystyka receptorowych białek, poznanie sposobu (typu) interakcji cytokinina-receptor, a przede wszystkim precyzyjne określenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji receptorów.

Znane są także próby zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu działania cytokinin na innej drodze. Pogląd Skooga i Armstronga [212], że cytokininy mogą kontrolować syntezę i funkcje tRNA był jednak począwszy od roku 1971 [106] wielokrotnie krytykowany. Nie zostały również potwierdzone dane opublikowane przez Matthyse'a i Abramsa [141]. Według tych autorów cytokinina miałaby aktywować geny przez specyficzne przyłączanie się fitohormonu do białek jądrowych.

Znaczne zainteresowanie budzi natomiast rola cytokininy w ekspresji genów na poziomie translacji, formowania polirybosomów i dekodowania mRNA. Poważne osiągnięcia uzyskali w tym zakresie Fosket i jego współpracownicy. Niestety używana przez nich kultura tkankowa soi (linia wymagająca cytokininy) wydaje się nie rozwijać chloroplastów. Uzyskane w pracowni Fosketa wyniki pokazały, że cytokinina podwyższała formowanie polirybosomów, a także umożliwiała translację tych rodzajów mRNA, które w komórkach pozbawionych cytokininy nie podlegały translacji. Dawka cytokininy wymagana do tworzenia się polirybosomów była bardzo zbliżona do dawki wymaganej dla wzrostu kultury. Sugeruje to, że cytokininy wpływają na podziały komórkowe przez stymulację formowania polirybosomów [211]. Z kolei Fosket i Tepper [67] oraz Gwóźdź i Woźny [83], stosując różnorodne techniki biochemiczne, wykazali, że cytokininowa stymulacja powstawania polirybosomów jest niezależna od syntezy de novo RNA, ale jest wynikiem aktywacji pewnej puli cytoplazmatycznego mRNA i włączania go do polirybosomów. Ten „odblokowujący” efekt cytokininy na nieaktywne mRNA powodował jakościowe zmiany w syntezie białka (odblokowaniu przez cytokininę ulegają, zdaniem autorów, między innymi mRNA specyficznych białek wymaganych do podziału komórki). Z drugiej strony, wyniki uzyskane między innymi przez Romanko i wsp. [193] wskazują, że cytokininy aktywują zarówno jądrowe, jak i cytoplazmatyczne polimerazy RNA. Po otrzymaniu z liści jęczmienia (za pomocą metody chromatografii powinowactwa) receptorowych białek dla cytokinin, wykazali, że w układzie in vitro kompleksy cytokinina-receptorowe białko aktywowały syntezę RNA. Jednak niedawno opublikowane wyniki uzys-

kane przez Schneider i wsp. [202] wskazują, że cytokinina w izolowanych jądrach etiolowanych liści jęczmienia zwiększała tylko aktywność I polimerazy RNA (odpowiedzialnej za syntezę rRNA). Działanie cytokinin może obejmować także zapobieganie degradacji aktywnych mRNA, na co wskazują wyniki, w których obserwowano wyraźną korelację między spadkiem aktywności RNazy a cytokininową indukcją pączkotwórczą w splątku mchu *Ceratodon purpureus* [215]. Fosket i Tepfer [67] w konkluzji stwierdzili, że cytokininy są czynnikami „zezwalającymi” (permissive). Nie pełnią one inicjującej funkcji w ekspresji genu, mitozie czy cytokinezie, są natomiast konieczne do zakończenia genetycznie zdeterminowanego programu. Odbywa się to poprzez kontrolę lub modulację translacji mRNA. Funkcja taka wyjaśnia zarówno wysoce specyficzną regulację cyklu komórkowego przez cytokininy, jak i przypisywane tym substancjom liczne efekty w procesach rozwoju roślin.

Dla zrozumienia możliwych sposobów działania cytokinin istotna jest także rola, jaką pełnią te substancje w kontrolowaniu pobierania i przepływu jonów. Istnieje wiele danych wskazujących, że cytokininy przynajmniej częściowo wywierały swój wpływ na rośliny modulując wewnątrzkomórkową koncentrację jonów wapnia. Wykazano na przykład, że cytokininy u *Achlya* powodowały uwalnianie związanych z powierzchnią komórek jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i równocześnie zwiększały ich pobieranie przez komórki [130, 131]. Wapń z kolei intensyfikował zarówno zjawiska hamowania przez cytokininy procesu starzenia liści, jak i stymulowaną cytokininami produkcję etylenu [122]. Pierwiastek ten uważany jest ponadto za czynnik regulujący powstawanie i funkcje aparatu mitotycznego [88, 107]. Jednak wyniki uzyskane na siewkach *Raphanus sativus* przez Bittnera i Buschmanna [18] pokazały, że kinetyna może również hamować pobieranie jonów  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  nie wpływając na ich rozmieszczenie wewnątrz liścieni, hypokotyli i korzeni. Saunders i Hepler [197] zaś, badając zmiany w ilości związanego z błonami  $\text{Ca}^{2+}$  (zachodzące podczas indukowanego cytokininami formowania pąków gametoforowych), stwierdzili, że w komórkach tworzących się pąków gametoforowych względna ilość wapnia przypadająca na jednostkę błony wyraźnie wzrastała (np. wewnątrz inicjalnej komórki pąka ilość błon wzrastała o 50% a ilość związanego z błonami  $\text{Ca}^{2+}$  o ponad 400%). Podwyższony poziom  $\text{Ca}^{2+}$  utrzymywał się przez cały okres formowania pąków. Zdaniem autorów wzrost ilości związanego z błonami  $\text{Ca}^{2+}$  spowodowany był zwiększeniem, w wyniku działania cytokininy, koncentracji wolnych  $\text{Ca}^{2+}$  wewnątrz komórki. Tak więc cytokininy mogą uzyskiwać swoje efekty (np. efekt pączkotwórczy u mchów), przynajmniej częściowo, także poprzez zlokalizowaną, wewnątrzkomórkową modulację jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Jak z przedstawionych danych wynika, w kwestii

poznania mechanizmu działania cytokinin zostało niestety jeszcze bardzo wiele do wyjaśnienia. Podstawową trudnością jest tu między innymi ograniczona dostępność możliwych do identyfikacji komórkowych i subkomórkowych docelowych miejsc (target sites) recepcji i działania hormonu [183].

Podsumowując — mimo wyraźnej zależności od egzogennych cytokinin, żaden z przedstawionych pięciu aspektów różnicowania plastydów nie może być uważany za taki, który z pewnością jest bezpośrednio i specyficznym kontrolowany przez tę grupę roślinnych regulatorów wzrostu i rozwoju.

Dla pełniejszego poznania miejsca i sposobu działania cytokinin warto jeszcze zwrócić uwagę na powiązania działań tych substancji i światła. Światło na przykład reguluje pobieranie i przemieszczanie się cytokinin [33]. Efekty wywołane przez kinetynę są wyraźniejsze w ciemności i przy niskiej intensywności światła [34]. Rodzaj światła może też decydować czy wywołany kinetyną wzrost syntezy cukrowców doprowadzi w efekcie do syntezy skrobi (przy świetle czerwonym i białym), czy rozpuszczalnych cukrów redukujących [94]. Z kolei, jak już wspomniano, cytokininy w plastogenezie mogą wywoływać efekty podobne do efektów działania określonego światła. Lichtenthaler [134] wykazał na przykład, że podanie egzogennych cytokinin zazieleniającym się siewkom powodowało w tworzących się chloroplastach podobne zmiany w strukturze i składzie biochemicznym do tych, jakie obserwowano po zadziałaniu niebieskiego światła lub światła białego, ale o wysokiej intensywności. Uzyskane efekty można było odwrócić za pomocą czerwonego światła lub białego o niskiej intensywności. Na tej podstawie Lichtenthaler postulował udział fitochromu w stymulowanej hormonem plastogenezie. Należy zaznaczyć, że znanych jest bardzo wiele pozycji literaturowych informujących o udziale fitochromu w procesach różnicowania plastydów.

Smith [213], Giles i wsp. [74] donieśli, że fitochrom kontroluje biosyntezę białka na etapie formowania polirybosomów, a więc na poziomie post-transkrypcyjnym. Wzrost zawartości polirybosomów dotyczył głównie cytoplazmy, chociaż proporcjonalnie silniejszy efekt wywoływał fitochrom w chloroplastowych rybosomach. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Feierabenda i De Boer [60] w badaniach nad traktowanymi cytokininą, ale rosnącymi w ciemności siewkami żyta i siewkami nietraktowanymi, rosnącymi na świetle (tabela 1).

Opisane obserwacje nie obalają naturalnie istniejącego od dawna poglądu, że światło i cytokininy prowadząc do biogenezy chloroplastów działają w ekspresji genów niezależnie od siebie. Parthier [172, 173] na przykład uważa, że światło poprzez system fitochromu stymuluje trans-

krypcję na terenie jądra i plastydów, a w konsekwencji (lub niezależnie) także i translację. Hormony zaś mogą pierwotnie działać na etapie syntezy cytoplazmatycznych polipeptydów lub przyczyniać się do formowania polirybosomów, czy wreszcie oddziaływać na sam mechanizm polimeryzacji aminokwasów. W takim przypadku jest jednak mało prawdopodobne, by w plastogenezie światło i cytokininy były aktywne w tym samym łańcuchu przyczynowych zdarzeń. Potwierdzają to opublikowane w ostatnich trzech latach wyniki prac Forda i wsp. [66], Kasemir i Mohra [103], oraz Tonga i wsp. [232], które między innymi wskazują, że działanie fitochromu ( $P_{fr}$ ) na procesy rozwojowe nie zależy od zmian w poziomie cytokinin.

Innym, często dyskutowanym miejscem działania cytokinin są błony komórkowe. Spośród problemów związanych z taką lokalizacją aktywności cytokinin, do ważniejszych należy brak powszechnie akceptowanej hipotezy, która wyjaśniałaby sposób importu do wnętrza plastydów polipeptydów cytoplazmatycznego pochodzenia, na przykład mniejszej podjednostki karboksylazy RuBP. Wiadomo, że wiele chloroplastowych białek lub ich podjednostek, szczególnie gdy pochodzą z przedziału cytoplazmatyczno-jądrowego, jest syntetyzowanych w postaci prekursorowych polipeptydów. Wymiary takich polipeptydów podlegają wewnątrz organelli redukcji przed włączeniem ich w dojrzałe funkcjonalnie białka. Schatz [198] określił to post-translacyjne działanie mianem „dojrzewania wektorowego”. Obejmuje ono etap bezpośredniego transportu przez błony i odłączenie N-zakończonego peptydu („peptydu tranzytowego” [40]) od prekursorowego polipeptydu. Mniejsza podjednostka karboksylazy RuBP syntetyzowana jest na wolnych polirybosomach w cytozolu jako prekursorowe białko o względnej masie cząsteczkowej (=  $M_r$ ) wynoszącej 20 000 i transportowana do wnętrza chloroplastu, gdzie uzyskuje końcowy wymiar [92]. N-zakończony peptyd ( $M_r = 4000$ ) zostaje odczepiony przez nieznane endopeptydazy prawdopodobnie luźno związane z wewnętrzną błoną otoczki lub zlokalizowane w obszarze między błonowym otoczką [50, 214]. Transport stymulowany jest przez światło, a w ciemności wymaga energii w postaci ATP. Nie jest natomiast hamowany przez inhibitory plastydowej syntezy białka [80]. Tak więc funkcjonujące plastydowe rybosomy nie są konieczne dla pobierania i włączania w dojrzałe funkcjonalnie białka polipeptydów pochodzenia cytoplazmatycznego. Wydaje się natomiast, że musi istnieć jakiś mechanizm umożliwiający odróżnianie właściwych polipeptydów (podana na przykład egzogenicznie większa podjednostka karboksylazy RuBP nie była stwierdzona wewnątrz chloroplastów). Może on działać na przykład dzięki specyficznej interakcji cząsteczek prekursorowych z wewnętrzną błoną plastydu. Nie udało się jednak wykryć doświadczalnie

takiego mechanizmu. Istnieje znaczne prawdopodobieństwo, że w proces rozpoznawania włączony jest właśnie N-zakończony peptyd [50]. Połączenie obu podjednostek karboksylazy RuBP w aktywny holoenzym odbywa się w stromie prawdopodobnie za pośrednictwem mało jeszcze poznanego białka ( $M_r = 60\ 000 =$  „polipeptyd 60”), którego synteza ma miejsce na terenie cytoplazmy [8]. Niestety nie wiadomo, czy opisany przez Feierabenda i De Boer [60] wzrost pod wpływem cytokininy poziomu karboksylazy RuBP był wywołany wzrostem syntezy większej podjednostki, czy też intensywniejszą syntezą (lub transportem do chloroplastu) mniejszej podjednostki. Nie można także wykluczyć kontroli przez cytokininę syntezy (lub transportu) „polipeptydu 60”. Zdaniem Parthiera [172] cytokininy mogą kontrolować transport przez błony poprzez kontrolę syntezy „przenośnikowych” lub „receptorowych” białek. Burrows [29] zaś uważa, że fitohormon działa w błonie jako allosteryczny efektor.

Uzyskane dotąd wyniki badań nie pozwalają niestety na udzielenie jednoznacznej odpowiedzi, gdzie i w jaki sposób działają cytokininy w procesie ontogenezy plastydów. Pozostaje także otwartą kwestia, czy hormon specyficznie wpływa na ekspresję plastydowych genów, czy działa na błony otoczki plastydowej. Wobec dominowania jednak wyników wskazujących na cytoplazmatyczno-jądrową kontrolę i przedział cytoplazmatyczno-jądrowy jako miejsce działania cytokinin, nie można także wykluczyć, że właśnie zaktywowanie ekspresji jądrowej genów przyczynia się do przyspieszenia formowania się chloroplastów.

Pani Prof. dr Alicji Szweykowskiej składam serdeczne podziękowania za niezwykle cenne uwagi i wskazówki przy opracowaniu niniejszej pracy.

#### LITERATURA

- [1] ALBERTE R. S., NAYLOR A. W., The role of cytokinins in chloroplast lamellar development, *Plant Physiol.*, **55**: 1079-1081, 1975.
- [2] ANDERSON L. E., Dithiothreitol activation of some chloroplast enzymes in extracts of etiolated pea seedlings, *Plant Sci. Lett.*, **1**: 331-334, 1973.
- [3] APEL K., Phytochrome-induced appearance of mRNA activity for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of barley (*Hordeum vulgare*), *Eur. J. Biochem.*, **97**: 183-188, 1979.
- [4] APEL K., KLOPPSTECH K., The plastid membranes of barley (*Hordeum vulgare*). Light-induced appearance of mRNA coding for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein, *Eur. J. Biochem.*, **85**: 581-588, 1978.
- [5] APEL K., KLOPPSTECH K., The effect of light on the biosynthesis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. — Evidence for the requirement of

- chlorophyll a for the stabilization of the apoprotein, *Planta*, **150**: 426-430, 1980.
- [6] AWIERINA N. G., SZŁYK A. A., O wlijanii kinetina na nakoplenije i aktiwnost protochlorofilida w etiolirowannyh i postetiolirowannyh listiach jaczmienia, *Fiziol. Rast.*, **19**: 487-497, 1972.
- [7] AXELOS M., PÉAUD-LENOEL C., The apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b complex of tobacco cells as a molecular marker of cytokinin activity, *Plant Sci. Lett.*, **19**: 33-41, 1980.
- [8] BARRACLOUGH R., ELLIS R. J., Protein synthesis in chloroplasts. IX. Assembly of newly synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact pea chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **608**: 19-31, 1980.
- [9] BEALE S. I.,  $\delta$ -aminolevulinic acid in plants: its biosynthesis regulation, and role in plastid development, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **29**: 95-120, 1978.
- [10] BENNETT J., Phosphorylation of chloroplast membrane polipeptides, *Nature*, **269**: 344-346, 1977.
- [11] BENNETT J., Chloroplast phosphoproteins. The protein kinase of thylakoid membranes is light-dependent, *FEBS Lett.*, **103**: 342-344, 1979.
- [12] BERRIDGE M. V., RALPH R. K., Kinetin and carbohydrate metabolism in chinese cabbage, *Plant Physiol.*, **47**: 562-567, 1971.
- [13] BERRIDGE M. V., RALPH R. K., LETHAM D. S., The binding of kinetin to plant ribosomes, *Biochem. J.*, **119**: 75-84, 1970.
- [14] BERRIDGE M. V., RALPH R. K., LETHAM D. S., On the significance of cytokinin binding to plant ribosomes. W: *Plant Growth Substances* (ed. D. J. Carr), str. 248-255, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1972.
- [15] BEZDĚK M., VYSKOT B., DNA synthesis in cytokinin-autotrophic tobacco cells. Effect of bromodeoxyuridine, fluorodeoxyuridine, and kinetin, *Planta*, **152**: 215-224, 1981.
- [16] BICK M. D., LIEBKE H., CHERRY J. H., STREHLER B. L., Changes in leucyl- and tyrosyl-tRNA of soybean cotyledons during plant growth, *Biochim. Biophys. Acta*, **204**: 175-182, 1970.
- [17] BIRMINGHAM B. C., MACLACHLAN G. A., Generation and suppression of microsomal ribonuclease activity after treatments with auxin and cytokinin. *Plant Physiol.*, **49**: 371-375, 1972.
- [18] BITTNER A., BUSCHMANN C., Uptake and translocation of  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  by seedlings of *Raphanus sativus* L. treated with kinetin, *Z. Pflanzenphysiol.*, **109**: 181-189, 1983.
- [19] BOASSON R., BONNER J. J., LAETSCH W. M., Induction and regulation of chloroplast replication in mature tobacco leaf tissue, *Plant Physiol.*, **49**: 97-101, 1972.
- [20] BOASSON R., LAETSCH W. M., Chloroplast growth and replication in tobacco, *Science*, **106**: 749-751, 1969.
- [21] BOASSON R., LAETSCH W. M., Stimulation of replication of mature tobacco chloroplasts by kinetin, *Amer. J. Bot.*, **57**: 734, 1970.
- [22] BORKOWSKA B., Cytokiny, *Postępy Biochem.*, **22**: 197-209, 1976.
- [23] BORRISS H., SCHMERDER B., Der Einfluß von Phytohormonen auf die Ergrünungsprozesse nachgereifter und dormanter *Agrostemma* — Embryonen. *Wiss. Z. Univ. Greifswald, Math. Nat. R.*, **29**: 23-26, 1980.
- [24] BORZENKOWA R. A., MOKRONOSOW A. T., Rol fitogormonow w biogenezie chloroplastow, *Fiziol. Rast.*, **23**: 490-496, 1976.

- [25] BRADBEER J. W., The activities of the photosynthetic carbon cycle enzymes of greening bean leaves, *New Phytol.*, **68**: 233-245, 1969.
- [26] BRANDES H., KENDE H., Studies on cytokinin-controlled bud formation in moss protonemata, *Plant Physiol.*, **43**: 827-837, 1968.
- [27] BRÜNING K., DRUMM H., MOHR H., On the role of phytochrome in controlling enzyme levels in plastids, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **168**: 141-156, 1975.
- [28] BUCHANAN B. B., Role of light in the regulation of chloroplast enzymes, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**: 341-374, 1980.
- [29] BURROWS W. J., Mechanisms of action of cytokinins, *Curr. Adv. Plant Sci.*, **21**: 837-847, 1975.
- [30] BURROWS W. J., Evidence in support on biosynthesis de novo of free cytokinins, *Planta*, **138**: 53-57, 1978.
- [31] BUSCHMANN C., The influence of kinetin of the biosynthesis of chlorophyll. W: *Photosynthesis and Plant Development*, Proceedings of a Conference at Limburgs University Centre, ed. by R. Marcelle et al. The Hague, Netherlands, Dr W. Jung 193-204, 1979.
- [32] BUSCHMANN C., The influence of kinetin on the chlorophyll biosynthesis in radish cotyledons. W: *Biogenesis and Function of Plant Lipids*, ed. P. Mazliak, P. Benveniste, C. Costes and R. Douce. Elsevier/North-Holland Biomedical Press 1980.
- [33] BUSCHMANN C., GRUMBACH K., The effect of phytochrome and white light of high and low intensity on uptake and distribution of <sup>14</sup>C-labelled kinetin in radish seedlings (*Raphanus sativus*), *Physiol. Plant.*, **53**: 518-522, 1981.
- [34] BUSCHMANN C., LICHTENTHALER H. K., The effect of cytokinins on growth and pigment accumulation of radish seedlings (*Raphanus sativus* L.) grown in the dark and at different light quanta fluence rates, *Photochem. Photobiol.*, **35**: 217-221, 1982.
- [35] BUSCHMANN C., SIRONVAL C., Influence of kinetin on protochlorophyll(ide) accumulation and on the Shibata Shift in *Raphanus* seedlings, *Planta*, **139**: 127-132, 1978.
- [36] CHEN C.-M., MELITZ D. K., PETZSCHOW B., ECKERT R. L., Isolation of cytokinin-binding protein from plant tissues by affinity chromatography, *Eur. J. Biochem.*, **108**: 397-387, 1980.
- [37] CHOCHŁOWA W. A., Diejstwijsze citokinina na formirowanije plastid na swietu i w tiemnotie w izoliruwanych semjadolach tykwy, *Fiziol. Rast.*, **24**: 1189-1193, 1977.
- [38] CHOCHŁOWA W. A., KARAWAJKO N. N., PODIERGINA T. A., KUŁAJEWA O. N., Antagonizm w diejstwiu abscizowej kisloty i citokinina na strukturnuju i biochemiczskuju differenciaciju chloroplastow w izoliruwanych siemjadolach tykwy, *Citologia*, **20**: 1033-1039, 1978.
- [39] CHOE H. T., THIMANN K. V., The metabolism of oat leaves during senescence. II The senescence of isolated chloroplasts, *Plant Physiol.*, **55**: 828-834, 1975.
- [40] CHUA N. H., SCHMIDT G. W., Transport of proteins into mitochondria and chloroplasts, *J. Cell Biol.*, **81**: 461-483, 1979.
- [41] DAVIES J. W., COCKING E. C., Protein synthesis in tomatofruit locule tissue. Incorporation of amino acids into protein by aseptic cell-free systems. *Biochem. J.*, **104**: 23-33, 1967.

- [42] DE BOER J., FEIERABEND J., Comparison of the effects of cytokinins on enzyme development in different cell compartments of the shoot organs of rye seedlings, *Z. Pflanzenphysiol.*, **71**: 261-270, 1974.
- [43] DE BOER J., FEIERABEND J., Comparative analysis of the action of cytokinin and light on the growth of rye leaves, *Planta*, **142**: 67-74, 1978.
- [44] DENNIS D. T., STUBBS M., COULTATE T. P., The inhibition of brussels sprout leaf senescence by kinins, *Can. J. Bot.*, **45**: 1019-1024, 1967.
- [45] DE VECCHI L., Fine structure of detached oak leaves senescing under different experimental conditions, *Isr. J. Bot.*, **20**: 169-183, 1971.
- [46] DYER T. A., OSBORNE D. J., Leaf nucleic acids. II Metabolism during senescence and effect of kinetin, *J. Exp. Bot.*, **22**: 552-560, 1971.
- [47] EILAM Y., Permeability changes in senescing tissue, *J. Exp. Bot.*, **16**: 614-627, 1965.
- [48] ELLIOTT D. C., Ionic regulation for cytokinin-dependent betacyanin synthesis in *Amaranthus* seedlings. *Plant Physiol.* **53**: 264-268, 1979.
- [49] ELLIS R. J., Protein synthesis by isolated chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* **463**: 185-215, 1977.
- [50] ELLIS R. J., Chloroplast proteins: synthesis, transport and assembly, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **32**: 111-137, 1981.
- [51] ENGELBRECHT J., Cytokinins in buds and leaves during growth, maturation and ageing (with a comparison of two bio-assays), *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **162**: 547-558, 1971.
- [52] ENGELBRECHT L., RYBICKA H., KUŁAJEWA O. N., Compounds with cytokinin activity in pumpkin cotyledons, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **169**: 317-320, 1976.
- [53] ERDEI L., TOTTH I., ZSOLDS F., Potassium absorption by rice at different levels of organization. II ATPase activity in roots, calluses and redifferentiated roots, *Physiol. Plant.*, **41**: 105-108, 1977.
- [54] ERICHSEN J., KNOOP B., BOPP M., On the action mechanism of cytokinins in mosses: caulonema specific, proteins, *Planta*, **135**: 161-168, 1977.
- [55] FARINEAU N., HOFFELT M., ROUSSAUX J., Interactions entre le chloramphénicol et la 6-benzylaminopurine au cours du verdissement de cotylédons de concombre, *Can. J. Bot.*, **56**: 1186-1197, 1978.
- [56] FARINEAU N., ROUSSAUX J., Influence de la 6-benzylaminopurine sur la différenciation plastidiale dans les cotylédons de concombre, *Physiol. Plant.*, **33**: 194-202, 1975.
- [57] FASULO M. P., Kinetin counteracts the myomycin-inhibitory effect on plastid differentiation in excised cucumber cotyledons, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **175**: 322-332, 1980.
- [58] FEIERABEND J., Der Einfluß von Cytokininen auf die Bildung von Photosyntheseenzymen in Rogenkeimlingen, *Planta*, **84**: 11-29, 1969.
- [59] FEIERABEND J., Characterization of cytokinin action on enzyme formation during the development of the photosynthetic apparatus in rye seedlings. Enzymes of the reductive and oxidative pentose phosphate cyclus, *Planta*, **94**: 1-15, 1970.
- [60] FEIERABEND J., DE BOER J., Comparative analysis on the action of cytokinin and light on the formation of ribulose bisphosphate carboxylase and plastid biogenesis, *Planta*, **142**: 75-82, 1978.
- [61] FENG K. A., Effects of kinetin on the permeability of *Allium cepa* cells, *Plant Physiol.*, **57**: 868-870, 1973.
- [62] FISHER J. D., HANSEN D., HODGES T. K., Correlation between ion fluxes



- and ion stimulated adenosine triphosphatase activity of plant roots, *Plant Physiol.*, **46**: 812-814, 1970.
- [63] FLETCHER R. A., MC CULLAGH D., Cytokinin-induced chlorophyll formation in cucumber cotyledons, *Planta*, **101**: 88-90, 1971.
- [64] FLETCHER R. A., MC CULLAGH D., Benzyladenine as a regulator of chlorophyll synthesis in cucumber cotyledons, *Can. J. Bot.*, **49**: 2197-2201, 1971.
- [65] FLETCHER R. A., TEO C., ALI A., Stimulation of chlorophyll synthesis in cucumber cotyledons by benzyladenine, *Can. J. Bot.*, **51**: 937-939, 1973.
- [66] FORD M. J., KASEMIR H., MOHR H., The influence of phytochrome and kinetin on chlorophyll accumulation in mustard cotyledons: a two-factor analysis, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **94**: 35-41, 1981.
- [67] FOSKET D. E., TEPFER D. A., Hormonal regulation of growth in cultured plant cells. *In Vitro*, **14**: 63-75, 1978.
- [68] FOSKET D. E., VOLK M. J., GOLDSMITH M. R., Polyribosome formation in relation to cytokinin-induced cell division in suspension cultured of *Glycine max*, *Plant Physiol.*, **60**: 554-562, 1977.
- [69] FOX J. E., ERION J. L., A cytokinin binding protein from higher plant ribosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**: 694-700, 1975.
- [70] FOX J. E., ERION J. L., Cytokinin-binding proteins in higher plants. W: *Plant Growth Regulation*, ed. P. E. Pilet, 139-146, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1977.
- [71] GARDNER G., SUSSMAN M. R., KENDE H., In vitro cytokinin binding to a particulate cell fraction from protonemata of *Funaria hygrometrica*, *Planta*, **143**: 67-73, 1978.
- [72] GEPSTEIN S., ILAN I., Evidence for the involvement of cytokinins in the regulation of proteolytic activity in cotyledons of germinating beans, *Plant Cell Physiol.*, **21**: 57-63, 1980.
- [73] GILBERT M. L., THOMPSON J. E., DUMBROFF E. B., Delayed cotyledon senescence following treatment with a cytokinin; an effect at the level of membranes, *Can. J. Bot.*, **58**: 1797-1803, 1980.
- [74] GILES A. B., GRIERSON D., SMITH H., In-vitro translation of messenger-RNA from developing bean leaves. Evidence for the existence of stored messenger-RNA and its light-induced mobilisation into polyribosomes, *Planta*, **136**: 31-36, 1977.
- [75] GODLEWSKI M., Effect of kinetin on the course of cell cycle in successive developmental stages of the antheridial filaments of *Chara vulgaris* L., *Acta Soc. Bot. Pol.*, **51**: 21-37, 1982.
- [76] GORTON B. S., SKINNER C. G., EAKIN R. E., Activity of some 6-substituted purines on the development of the moss *Tortella caespitosa*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **66**: 493-496, 1957.
- [77] GREBANIER A. E., STEINBACK K. E., BOGORAD L., Comparison of the molecular weight of protein synthesized by isolated chloroplasts with those which appear during greening in *Zea mays*, *Plant Physiol.*, **63**: 436-439, 1979.
- [78] GRIERSON D., CHAMBERS S. E., PENNIKET L. P., Nucleic acid and protein synthesis in discs cut from mature leaves of *Nicotiana tabacum* L. and cultured on nutrient agar with and without kinetin, *Planta*, **134**: 29-34, 1977.
- [79] GROSSMAN S., LESHEM Y. Y., Lowering of endogenous lipoxxygenase activity in *Pisum sativum* foliage by cytokinin as related to senescence, *Physiol. Plant.*, **43**: 359-362, 1978.
- [80] GROSSMAN A., BARTLETT S., CHUA N. H., Energy dependent uptake of

- cytoplasmically synthesized polypeptides by chloroplasts, *Nature*, **285**: 625-628, 1980.
- [81] GWÓŹDŹ E. A., Rola cytokinin w biosyntezie białka. Praca habilitacyjna, UAM, Poznań 1979.
- [82] GWÓŹDŹ E. A., SZWEYKOWSKA A. M., Cytokinin-induced activation of polyribosomes in the protonema of *Ceratodon purpureus*, *Physiol. Plant.*, **55**: 214-220, 1982.
- [83] GWÓŹDŹ E. A., WOŻNY A., Cytokinin-controlled polyribosome formation and protein synthesis in cucumber cotyledons, *Physiol. Plant.*, **59**: 103-110, 1983.
- [84] HAHN H., BOPP M., A cytokinin test with high specificity, *Planta*, **83**: 115-118, 1968.
- [85] HALL R. H., Cytokinins as a probe of developmental processes, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**: 415-444, 1973.
- [86] HARVEY B. M. R., LU B. C., FLETCHER R. A., Benzyladenine accelerates chloroplast differentiation and stimulates photosynthetic enzyme activity in cucumber cotyledons, *Can. J. Bot.*, **52**: 2581-2586, 1974.
- [87] HECKER L. I., UZIEL M., BARNETT W. E., Comparative base compositions of chloroplast and cytoplasmic tRNAs<sup>Phe</sup> from *Euglena gracilis*, *Nucleic Acid Res.*, **3**: 371-380, 1976.
- [88] HEPLER P. K., WICK S. M., WOLNIAK S. M., The structure and role of membranes in the mitotic apparatus. W: *International cell biology (1980-1981)*, 673-687, ed. Schweiger H.-G., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1981.
- [89] HERRMANN R. G., Multiple amounts of DNA related to the size of chloroplasts. I. An autoradiographic study, *Planta*, **90**: 80-96, 1970.
- [90] HERRMANN R. G., KOWALLIK K. V., Multiple amounts of DNA related to the size of chloroplasts, *Protoplasma*, **69**: 365-372, 1970.
- [91] HEWETT E. W., WAREING P. E., Cytokinins in *Populus x robusta*: qualitative changes during development, *Physiol. Plant.*, **29**: 386-389, 1973.
- [92] HIGHFIELD P. E., ELLIS R. J., Synthesis and transport of the small subunit of chloroplast ribulose biphosphate carboxylase, *Nature*, **271**: 420-424, 1978.
- [93] HINNAWY E. El., Effect of some growth regulating substances and carbohydrates on chlorophyll production in *Melilotus alba* (Desr.) callus tissue cultures, *Z. Pflanzenphysiol.*, **74**: 95-105, 1974.
- [94] HOLZAPFEL A., WILD A., ZERBE R., Effects of kinetin and different light qualities on the content of carbohydrates, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **178**: 297-306, 1983.
- [95] ILAN I., GEPSTEIN S., Hormonal regulation of food reserve breakdown in germinating dicotyledonous seeds, *Israel J. Bot.*, **29**: 193-206, 1980/81.
- [96] ILAN I., GOREN R., Cytokinins and senescence in *Lemon leaves*, *Physiol. Plant.*, **45**: 93-95, 1979.
- [97] JACOBSEN J. V., Regulation of ribonucleic acids metabolism by plant hormones, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**: 537-564, 1977.
- [98] JAKOWLEWA L. A., KLJACZKO N. L., KUŁAJEWA O. N., Diejstwije 6-benzilaminopurina na wkljuczenie <sup>14</sup>C lejcina w białok w biezkletocznoj systemie iz izolirowanych siemjadolej tykwy, *Miol. Bioł.*, **11**: 868-876, 1977.
- [99] JAKUSZKINA N. I., PUSZKINA G. P., Izmienienije intensiwnosti fotofosforilirowanija w prorostkach kukuruzy pod wljanieniem gibberellina i kinitina, *Fiziol. Rast.*, **22**: 1132-1137, 1975.

- [100] JOUANNEAU J. P., DE MARSAC N. T., Stepwise effects of cytokinin activity and DNA synthesis upon mitotic cycle events in partially synchronized tobacco cells, *Exp. Cell Res.*, **77**: 167-174, 1973.
- [101] KAMINEK M., LUŠTINEC J., Reduced chlorophyll synthesis in cytokinin-autonomous strains of tobacco callus, *Z. Pflanzenphysiol.*, **73**: 65-73, 1974.
- [102] KARAWAJKO N. N., OMANN E. E., KUŁAJEWA O. N., Wlijanie citokinina na aktywność rządu fermentów w izolowanych semjadolach tykwy, *Fiziol. Rast.*, **22**: 1031-1038, 1975.
- [103] KASEMIR H., MOHR H., Coaction of three factors controlling chlorophyll and anthocyanin synthesis, *Planta*, **156**: 282-288, 1982.
- [104] KAUL K., SABHARWAL S., Effect of sucrose and kinetin on growth and chlorophyll synthesis in tobacco tissue cultures, *Plant Physiol.*, **47**: 691-695, 1971.
- [105] KAUL K., SABHARWAL S., Kinetin induced changes in  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase of tobacco callus, *Plant Physiol.*, **54**: 644-648, 1974.
- [106] KENDE H., The cytokinins, *Intern. Rev. Cytol.*, **31**: 301-338, 1971.
- [107] KIEHART D. P., Studies on the in vivo sensitivity of spindle microtubules to calcium ions and evidence for a vesicular calcium sequestering system, *J. Cell Biol.*, **88**: 601-617, 1981.
- [108] KINOSHITA I., KATAGIRI K., TSUJI H., Effects of benzyladenine and light on changes in various RNA species in etiolated cucumber cotyledons, *Plant, Cell Physiol.*, **20**: 707-713, 1979.
- [109] KLÄMBT D., Cytokinin effects on protein synthesis of in vitro systems of higher plants, *Plant, Cell Physiol.*, **17**: 73-76, 1976.
- [110] KLYACHKO N. L., ANANIEV E., KULAEVA O. N., Effect of 6-benzylaminopurine and abscisic acid on protein synthesis in isolated pumpkin cotyledons, *Physiol. Vég.*, **17**: 607-617, 1979.
- [111] KLYACHKO N. L., PARTHIER B., Cytokinin control of aminoacyl-tRNA synthetases and ribulosebisphosphate carboxylase in developing and greening excised *Cucurbita* cotyledons, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **175**: 333-345, 1980.
- [112] KLYACHKO N. L., PARTHIER B., CHAYANOVA S. S., VLODARSKY A. D., KULAEVA O. N., Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase synthesis in detached cytokinin-treated pumpkin cotyledons, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **175**: 712-721, 1980.
- [113] KNYPL J. S., CHYLIŃSKA K. M., Chlorophyll accumulation and protein synthesis in lettuce cotyledons treated with growth retardants, gibberellin, and benzylaminopurine, *Z. Pflanzenphysiol.*, **66**: 297-306, 1972.
- [114] KOBAYASHI K., ZBELL B., REINERT J., A high affinity binding site for cytokinin to a particulate fraction in carrot suspension cells, *Protoplasma*, **106**: 145-155, 1981.
- [115] KUŁAJEWA O. N., *Citokininy. Ich struktura i funkcja*, Izdatielstwo „Nauka”, Moskwa 1973.
- [116] KUŁAJEWA O. N., O regulacji ekspresji genów w rastitelnych kletkach, *Fiziol. Rast.*, **25**: 990-1008.
- [117] KUŁAJEWA O. N., JERKIEJEW M. I., CHOCHŁOWA W. A., SWIESZNIKOWA I. I., Gormonalnaja regulacja fizjologicznych processow w izolowanych semjadolach tykwy, *Fiziol. Rast.*, **19**: 1023-1033, 1972.
- [118] KUŁAJEWA O. N., ROMANKO E. G., Diejstwije 6-benzilaminopurina na izolowane chloroplasty, *Dokł. Akad. Nauk SSR*, **117**: 464-467, 1968.
- [119] LAI Y. F., THOMPSON J. E., Effects of germination on  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -stimulated

- adenosine 5'-triphosphatase and ATP-dependent ion transport of isolated membranes from cotyledons, *Plant Physiol.*, **50**: 452-457, 1972.
- [120] LAMPPA G. K., BENDICH A. J., Changes in chloroplast DNA levels during development of pea (*Pisum sativum*), *Plant Physiol.*, **64**: 126-130, 1979.
- [121] LAMPUGNANI M. G., MARTELLINI P., SERVETTAZ O., LONGO C. P., Interaction between benzyladenine and white light on excised watermelon cotyledons, *Plant Sci. Lett.*, **18**: 351-358, 1980.
- [122] LAU O.-L., YANG S. F., Interaction of kinetin and calcium in relation to their effect on stimulation of ethylene production, *Plant. Physiol.*, **55**: 738-740, 1975.
- [123] LEECH R. M., The replication of plastids in higher plants. W: *Cell Division in Higher Plants*, ed. M. M. Yeoman, London/New York/San Francisco: Academic Press, 135-159, 1976.
- [124] LEGOCKA J., SZWEYKOWSKA A., Effect of kinetin on nucleic acid synthesis in senescing and young leaves in *Brassica oleracea* L. var *gongylodes* L, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **44**: 553-565, 1975.
- [125] LEGOCKA J., SZWEYKOWSKA A., The role of cytokinin in the development and metabolism of barley leaves. III. The effect on the RNA metabolism in various cell compartments during senescence, *Z. Pflanzenphysiol.*, **102**: 363-374, 1981.
- [126] LEGOCKA J., SZWEYKOWSKA A., The role of cytokinins in the development and metabolism of barley leaves. VI. The effect on the protein metabolism in various cell compartments during leaf senescence, *Acta Physiol. Plant.*, **5**: 11-20, 1983.
- [127] LEGOCKI A., WOJCIECHOWSKA K., PECH K., Effect of plant growth substances on the differentiation of tRNA in embryos of yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) *Bull. Acad. Polon. Sci.*, **18**: 63-68, 1970.
- [128] LEIGHT R. A., WYN JONES R. G., Corelation between ion-stimulated adenosine triphosphatase activities and ion influxes in maize roots, *J. Exp. Bot.*, **26**: 508-520, 1975.
- [129] LE'JOHN H. B., A rapid and sensitive auxin binding system for detecting N<sup>6</sup>-substituted adenines and some urea and thiourea derivatives that show cytokinin activity in cell division tests, *Canad. J. Biochem.*, **53**: 768-778, 1975.
- [130] LE'JOHN H. B., CAMERON L. E., Cytokinins regulate calcium binding to a glycoprotein from fungal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**: 1053-1060, 1973.
- [131] LE'JOHN H. B., STEVENSON R. M., Cytokinins and magnesium ions may control the flow of metabolism and calcium ions through fungal cell membranes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**: 1061-1066, 1973.
- [132] LESCURE A. M., Chloroplast differentiation in cultured tobacco cells: in vitro protein synthesis efficiency of plastid at various stages of their evolution, *Cell Differ.*, **7**: 139-152, 1978.
- [133] LESCURE A. M., Polypeptides synthesized in vitro by plastids isolated from tobacco cultures: purification of the organelles on a silica density gradient, *Plant Sci. Lett.*, **19**: 181-191, 1980.
- [134] LICHTENTHALER H. K., Regulation of prenylquinone synthesis in higher plants. W: *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*, eds. M. Tevini and H. K. Lichtenthaler, 231-258, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1977.

- [135] LIVNE A., GRAZIANI Y., A rapid effect of kinetin on rehydration of tobacco leaf tissue, *Plant Physiol.*, **49**: 124-126, 1972.
- [136] LONGO G. P., LONGO C. P., ROSSI G., VITALE A., PEDRETTI M., Variations in carbohydrate and lipid content and in osmotic potential of watermelon cotyledons treated with benzyladenine, *Plant Sci. Lett.*, **12**: 199-207, 1978.
- [137] LONGO G. P., PEDRETTI M., ROSSI G., LONGO C. P., Effect of benzyladenine on the development of plastids and microbodies in excised watermelon cotyledons, *Planta*, **145**: 209-217, 1979.
- [138] LÜTZ C., Development and ageing of etioplast structures in dark grown leaves of *Avena sativa* L., *Protoplasma*, **108**: 83-98, 1981.
- [139] LÜTZ C., On the significance of prolamellar bodies in membrane development of etioplasts. *Protoplasma*, **108**: 99-115, 1981.
- [140] MAASS H., KLÄMBT D., Cytokinin effect on protein synthesis in vivo in higher plants, *Planta*, **133**, 117-120, 1977.
- [141] MATTHYSE A. G., ABRAMS M., A factor mediating interaction of kinins with the genetic material, *Biochim. Biophys. Acta*, **199**: 511-518, 1970.
- [142] MAYAK S., HALEVY A. H., Cytokinin activity in rose petals and its relation to senescence, *Plant Physiol.*, **46**: 497-499, 1970.
- [143] MC DONNEL A., STAEHELIN L. A., Adhesion between liposomes mediated by the chlorophyll a/b light-harvesting complex isolated from chloroplast membranes, *J. Cell Biol.*, **84**: 40-56, 1980.
- [144] MIKULOVICH T. P., KUKINA I. M., RNA synthesis in intact chloroplasts from excised pumpkin cotyledons: some characteristics of transcription and the effect of photohormones, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **177**: 414-429, 1982.
- [145] MIKULOVICH T. P., WOLLGIEHN R., KHOKHLOVA W. A., NEUMANN D., KULAEVA O. N., Synthesis of plastid and cytoplasmic ribosomal RNAs in isolated pumpkin cotyledons. II Effect of cytokinin and light, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **172**: 101-110, 1978.
- [146] MIKUŁOWICZ T. P., CHOCHŁOWA V. A., KUŁAJEWA O. N., SWESZNIKOWA J. N., Wlijanije 6-penzilaminopurina na izolirwanyje siemjadoli tykwy, *Fizioł. Rast.*, **18**: 98-106, 1971.
- [147] MIKUŁOWICZ T. P., KUŁAJEWA O. N., Sintez DNK w izolirwanych siemjadolach tykwy, *Fizioł. Rast.*, **24**: 521-527, 1977.
- [148] MILLER C. O., Cytokinin modification of metabolism of p-cumaric acid by a cell suspension of soybean /*Glycine max* (L.) Merrill/ *Planta* **140**: 193-199, 1978.
- [149] MILLER C. O., Cytokinin inhibition of respiration by cells and mitochondria of soybean, *Glycine max* (L.), Merrill, *Planta*, **146**: 503-511, 1979.
- [150] MILLS J. D., HIND G., Light induced  $Mg^{2+}$  ATPase activity of coupling factor in intact chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **547**: 455-462, 1979.
- [151] MITTELHEUSER C. J., VAN STEVENICK R. F. M., The ultrastructure of wheat leaves. I. Changes due to natural senescence and the effects of kinetin and ABA on detached leaves incubated in the dark, *Protoplasma*, **73**: 239-252, 1971.
- [152] MŁODZIANOWSKI F., Wpływ cytokinin na strukturę organelli komórkowych, Praca habilitacyjna, UAM, Poznań 1974.
- [153] MŁODZIANOWSKI F., KWINTKIEWICZ M., The inhibition of kohlrabi chloroplast degeneration by kinetin, *Protoplasma*, **76**: 211-226, 1973.
- [154] MŁODZIANOWSKI F., PONITKA A., Ultrastructural changes of chloro-

- plasts in detached persley leaves yellowing in darkness and the influence of kinetin on that process, *Z. Pflanzenphysiol.*, **69**: 13-25, 1973.
- [155] MŁODZIANOWSKI F., SZWEYKOWSKA A., Fine structure of kinetin-treated protonema and kinetin-induced gametophore buds in *Funaria hygrometrica*, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **40**: 547-555, 1971.
- [156] MŁODZIANOWSKI F., WESOŁOWSKA M., Morphological aspects of starch and cell wall material mobilization in developing lupine cotyledons and the effect of kinetin on these processes, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **44**: 529-536, 1975.
- [157] MŁODZIANOWSKI F., WOŻNY A., Degeneracja chloroplastów i możliwość jej odwracania, *Post. Biologii Kom.*, **2**: 271-286, 1975.
- [158] MOTHE K., Über das Altern der Blätter und die Möglichkeit ihrer Wiederverjüngung, *Naturwissenschaft.*, **47**: 337-351, 1960.
- [159] MURAI N., TALLER B. J., ARMSTRONG D. J., SKOOG F., MICKE M. A., SCHNOES H. K., Kinetin incorporated into tobacco ribosomal RNA and transfer RNA preparations, *Plant. Physiol.*, **60**: 197-202, 1977.
- [160] MUREN R. C., FOSKET D. E., Cytokinin-mediated translational control of protein synthesis in cultured cells of *Glycine max.*, *J. Exp. Bot.*, **28**: 775-784, 1977.
- [161] NAITO K., IKEDA K., SAITO T., SUZUKI H., YAMADA M., KURAIISHI S., Importance of RNA synthesis within the lag phase preceding benzyladenine-induced growth of cucumber cotyledons in the dark, *Plant, Cell Physiol.*, **21**: 1419-1430, 1980.
- [162] NAITO K., EBATO T., ENDO Y., SHIMIZU S., Effect of benzyladenine on  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetic ability and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase: differential responses to benzyladenine according to leaf age, *Z. Pflanzenphysiol.*, **96**: 95-102, 1980.
- [163] NAITO K., TAKAHASHI T., ENDO Y., SHIMIZU S., Benzyladenine-induced chlorophyll formation in etiolated cucumber cotyledons: Differential responses of  $\delta$ -aminolevulinic acid formation to inhibitors of RNA and protein synthesis in darkness and then after illumination, *Z. Pflanzenphysiol.*, **97**: 309-316, 1980.
- [164] NAITO K., TSUJI H., HATAKEYAMA I., Effect of benzyladenine on DNA, RNA, protein and chlorophyll contents in intact bean leaves: Differential responses to benzyladenine according to the leaf age, *Physiol. Plant.*, **43**: 367-371, 1978.
- [165] NAITO K., TSUJI H., HATAKEYAMA I., Effect of benzyladenine on ribonucleic acid, protein, and chlorophyll contents in bean leaves: Differentiation of benzyladenine effect according to age of the leaf. W: *Ecophysiology of Photosynthetic Productivity*, eds. M. Monsi, T. Saeki, JIBP Synthesis 19 Univ. of Tokyo Press, Tokyo: 58-61, 1978.
- [166] NAITO K., TSUJI H., HATAKEYAMA I., UEDA K., Benzyladenine-induced increase in DNA content per cell in intact bean leaves, *J. Exp. Bot.*, **30**: 1145-1151, 1979.
- [167] NELSON P. V., KUIPER P. J. C., Properties of (sodium, potassium) stimulated ATPases in English ryegrass root and implications in ion transport, *Physiol. Plant.*, **35**: 263-268, 1975.
- [168] OHYA T., NAITO K., SUZUKI H., Effect of benzyladenine on change in plastid membrane proteins of etiolated cucumber cotyledons during greening, *Z. Pflanzenphysiol.*, **102**: 167-172, 1981.

- [169] OSBORNE D. J., Effect of kinetin on protein and nucleic acid metabolism in *Xanthium leaves* during senescence, *Plant Physiol.*, **37**: 595-602, 1962.
- [170] PALNI L. M. S., HORGAN R., Cytokinins in transfer RNA of normal and crown-gall tissue of *Vinca rosea*, *Planta*, **159**: 178-181, 1983.
- [171] PARANJOTHY K., WAREING P. F., The effect of abscisic acid, kinetin and 5-fluorouracil on RNA and protein synthesis in senescing radish leaf discs, *Planta*, **99**: 112-119, 1971.
- [172] PARTHIER B., The role of phytohormones (cytokinins) in chloroplast development, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **174**: 173-214, 1979.
- [173] PARTHIER B., The cooperation of nuclear and plastid genomes in plastid biogenesis and differentiation, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **177**: 283-317, 1982.
- [174] PAULS K. P., THOMPSON J. E., In vitro simulation of senescence-related membrane damage by ozone-induced lipid peroxidation, *Nature*, **283**: 504-506, 1980.
- [175] PERL M., Kinetin effect on ATP synthesis and on adenylate kinase activity in pea seeds, *Phytochem.*, **20**: 2085-2088, 1981.
- [176] PILLAY D. T. N., CHERRY J. H., Changes in leucyl, seryl, and tyrosyl tRNAs in ageing soybean cotyledons, *Can. J. Bot.*, **52**: 2499-2504, 1974.
- [177] POLYA G. M., DAVIS A. W., Properties of a high-affinity cytokinin-binding protein from wheat germ, *Planta*, **139**: 139-147, 1978.
- [178] POSSINGHAM J. V., Plastid replication and development in the life cycle of higher plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**: 113-129, 1980.
- [179] POSSINGHAM J. V., SAURER W., Changes in chloroplast number per cell during leaf development in spinach, *Planta*, **86**: 186-194, 1969.
- [180] POSSINGHAM J. V., SMITH J. W., Factors affecting chloroplast replication in spinach, *J. Exp. Bot.*, **23**: 1050-1059, 1972.
- [181] PRZYMUSINSKI R., WOŹNY A., MŁODZIANOWSKI F., The effect of kinetin on cytochemical localization of  $Mg^{2+}$  dependent ATPase in isolated lupine cotyledons, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **50**: 575-581, 1981.
- [182] RALPH R. K., WOJCIK S. J., AIREY P., In vitro plant protein synthesis and cytokinins, *Plant Sci. Lett.*, **18**: 237-247, 1980.
- [183] RAPPAPORT L., Plant growth hormones: internal control points, *Bot. Gaz.*, **141**: 125-130, 1980.
- [184] REBEIZ C. A., CASTELFRANCO P. A., Protochlorophyll and chlorophyll biosynthesis in cell-free systems from higher plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**: 129-172, 1973.
- [185] RICHMOND A. E., LANG A., Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium leaves*, *Science*, **125**: 650-651, 1957.
- [186] RICHMOND A. E., SACHS B., OSBORNE D. J., Chloroplasts, kinetin and protein synthesis, *Physiol. Plant.*, **24**: 176-180, 1971.
- [187] RIJVEN A. H. G. C., Inhibitors and the dependence of kinetin-induced expansion on RNA synthesis in fenugreek cotyledons. Etionine as an inhibitor, *J. Exp. Bot.*, **23**: 1039-1049, 1972.
- [188] RIJVEN A. H. G. C., Initiation of polyphenylalanine synthesis and the action of cytokinins in fenugreek cotyledons, *Nature*, **252**: 257-259, 1974.
- [189] RIJVEN A. H. G. C., PARKASH V., Action of kinetin on cotyledons of fenugreek, *Plant Physiol.*, **47**: 59-64, 1971.
- [190] ROMANKO E. G., SELIWANKINA C. Ju., Wlijanije citokinina na sintez nieribosomalnoj RNK w etiolirowanych prorostkach rzi, *Fiziol. Rast.*, **24**: 1014-1020, 1977.

- [191] ROMANKO E. G., SELIWANKINA S. Ju., KUROJEDOW W. A., Wlijanije citokinina na sintez RNK i na aktiwnost swjazannoj s chromatinom RNK-polimerazy w srezannyh listjach jaczmienija, *Fizioł. Rast.*, **25**: 1199-1205, 1978.
- [192] ROMANKO E. G., SELIWANKINA S. Ju., OMANN E. E., Wlijanije citokininow na aktiwnost' rjada chloroplastnych i citoplazmaticzeskich fermentow w etiolirowannyh prorostkach rzi, *Fizioł. Rast.*, **23**: 543-549, 1976.
- [193] ROMANKO E. G., SELIWANKINA S. Ju., OWCZAROW A. K., KUŁAJEWA O. N., Aktiwacija citokinin-receptornym kompleksom u lista jaczmienija sinteza RNK in vitro, *Dokł. Akad. Nauk SSR*, **255**: 1009, 1980.
- [194] ROUSSAUX J., HOFFELT M., FARINEAU N., Evolution des RNA ribosomiaux au cours du verdissement de cotylédons de concombre en présence de 6-benzylaminopurine, *Can. J. Bot.*, **54**: 2328-2336, 1976.
- [195] ROUSSAUX J., HOFFELT M., FARINEAU N., Interactions entre le cycloheximide et la 6-benzylaminopurine du cours du verdissement de cotylédons de concombre, *Can. J. Bot.*, **58**: 1101-1110, 1980.
- [196] RYBICKA H., ENGELBRECHT L., MIKUŁOWICZ T. P., KUŁAJEWA O. N., Issledowanije endogennyh wieszczestw s citokininowoj aktiwnostju w siemjadolach tykwy w swjazi s osobiennostiami diejstwija na nich egzogennyh citokininow, *Fizioł. Rast.*, **24**: 371-379, 1977.
- [197] SAUNDERS M. J., HEPLER P. K., Localization of membrane-associated calcium following cytokinin treatment in *Funaria* using chlorotetracycline, *Planta*, **152**: 272-281, 1981.
- [198] SCHATZ G., How mitochondria import proteins from the cytoplasm, *FEBS Lett.*, **103**: 203-211, 1979.
- [199] SCHIMPER A. F. W., Untersuchungen über die Chlorophyllkörper und die ihnen homologen Gebilde, *Jahrbücher Wiss. Bot.*, **16**: 1-247, 1885.
- [200] SCHMERDER B., RABENSTEIN F., BORRISS H., Steuerung des Ergrünungsprozesses in den Kotyledonen nach gereifter *Agrostemma* — Embryonen durch Phytohormone, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **173**: 97-113, 1978.
- [201] SCHNEIDER J., DORAWA B., SZWEYKOWSKA A., Adenosine triphosphatase in the moss protonema and effect of a cytokinin on its activity, *Acta Physiol. Plant.*, **2**: 257-266, 1980.
- [202] SCHNEIDER J., GRUSZKA M., LEGOCKA J., SZWEYKOWSKA A., Role of cytokinins in development and metabolism of barley leaves. VII. Effect of light and kinetin on the transcriptional activity of nuclei from etiolated leaves, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **178**: 381-390, 1983.
- [203] SCHNEIDER J., GWÓŹDŹ E., SZWEYKOWSKA A., The role of cytokinins in the development and metabolism of barley leaves. II. The effect on the DNA-dependent RNA polimerase during leaf senescence, *Z. Pflanzenphysiol.*, **86**: 31-40, 1978.
- [204] SCHNEIDER J., SZWEYKOWSKA A., Changes in enzyme activities accompanying cytokinin-induced formation of gametophore buds in *Ceratodon purpureus*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **72**: 95-106, 1974.
- [205] SCHNEIDER J., SZWEYKOWSKA A., A tRNA-nucleotidyltransferase from moss protonema and promotion of its activity by cytokinin, *Biochem Physiol. Pflanzen*, **167**: 207-217, 1975.
- [206] SCHOPFER P., Phytochrome control of enzymes, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**: 223-252, 1977.



- [207] SCOTT N. S., POSSINGHAM J. V., Chloroplast DNA in expanding spinach leaves, *J. Exp. Bot.*, **31**: 1081-1092, 1980.
- [208] SELIWANKINA S. Ju., ROMANKO E. G., KUROJEDOW W. A., OMANN E., Wlijanije citokininow na sintez RNK w etiolirowanych prorostkach rzi, *Fiziol. Rast.*, **23**: 1011-1017, 1976.
- [209] SEYER P., MARTY D., LESCURE A. M., PÉAUD-LENOËL C., Effect of cytokinin on chloroplast cyclic differentiation in cultured tobacco cells, *Cell Differ.*, **4**: 187-197, 1975.
- [210] SHININGER T. L., Biochemical and cytological analyses of RNA synthesis in kinetin-treated pea root parenchyma, *Plant Physiol.*, **65**: 838-843, 1980.
- [211] SHORT K. C., TEPFER D. A., FOSKET D. E., Regulation of polyribosome formation and cell division in cultured soybean cells by cytokinin, *J. Cell Sci.*, **15**: 75-87, 1974.
- [212] SKOOG F., ARMSTRONG D. J., Cytokinins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**: 359-384, 1970.
- [213] SMITH H., Phytochrome-mediated assembly of polyribosomes in etiolated bean leaves. Evidence for post-transcriptional regulation of development, *Eur. J. Biochem.*, **65**: 161-170, 1976.
- [214] SMITH S. M., ELLIS R. J., Processing of small subunit precursor of ribulose biphosphate carboxylase and its assembly into whole enzyme are stromal events, *Nature*, **278**: 662-664, 1979.
- [215] SPYCHAŁA M., KORCZ-ZAJCHERT I., SZWEYKOWSKA A., Cytokinin-induced decrease in ribonuclease activity and initiation of gametophore buds in the protonema of mosses, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **45**: 327-334, 1976.
- [216] SRIVASTAVA B. I. S., WARE G., The effect of kinetin on nucleic acids and nucleases of excised barley leaves, *Plant Physiol.*, **40**: 62-64, 1965.
- [217] STETLER D. A., LAETSCH W. M., Kinetin-induced chloroplast maturation in cultures of tobacco tissue, *Science*, **149**: 1387-1388, 1965.
- [218] STOBART A. K., SHEWRY P. R., THOMAS D. R., The effect of kinetin on chlorophyll synthesis in ageing etiolated barley leaves exposed to light, *Phytochem.*, **11**: 571-577, 1972.
- [219] STRAUB V., LICHTENTHALER H. K., Die Wirkung von Gibberellinsäure A<sub>3</sub> und Kinetin auf die Bildung der Photosynthesepigmente, Lipochinone und Anthocyane in Raphanus-Keimlingen, *Z. Pflanzenphysiol.*, **70**: 308-321, 1973.
- [220] SUSSMAN M. R., KENDE H., In vitro cytokinin binding to a particulate fraction of tobacco cells, *Planta*, **140**: 251-259, 1978.
- [221] SWAMINATHAN S., BOCK R., SKOOG F., Subcellular localization of cytokinins in transfer ribonucleic acid, *Plant Physiol.*, **59**: 558-563, 1977.
- [222] SZŁYK A. A., WALTER G., AWIERINA N. G., SAWCZENKO G. E., Wlijanije kinetina na nakoplenie i aktiwnost protochlorofillida w zielonych i post-etiolirowanych listiach pszenicy, *Dokł. Akad. Nauk SSR*, **19**: 1429-1432, 1970.
- [223] SZULGIN I. A., NICZIPOROWICZ A. A., KLIMOW S. W., MUREJ I. A., K strukturnoj organizaciji lista kak optiko-fotosintezirujuszej sistiemy, *Fiziol. Rast.*, **24**: 684-690, 1977.
- [224] SZWEYKOWSKA A., The role of cytokinins on the control of cell growth and differentiation in culture. W: *Tissue Culture and Plant Science*, ed. H. E. Street, London-New York, Academic Press, 461-475, 1975.

- [225] SZWEYKOWSKA A., SCHNEIDER J., PRUSINSKA U., Studies on the specificity and sensitivity of the bud-induction response to cytokinins in the protonema of *Funaria hygrometrica*, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **38**: 139-142, 1969.
- [226] TAKEGAMI T., A study of senescence of tobacco leaf discs. II. Chloroplast and cytoplasmic rRNAs, *Plant, Cell Physiol.*, **16**: 417-425, 1975.
- [227] TAKEGAMI T., YOSHIDA K., Isolation and purification of cytokinin binding protein from tobacco leaves by affinity chromatography, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**: 782-789, 1975.
- [228] TAKEGAMI T., YOSHIDA K., Specific interaction of cytokinin binding protein with 40S ribosomal subunits in the presence of cytokinin in vivo, *Plant, Cell Physiol.*, **18**: 337-346, 1977.
- [229] TEPFER D. A., FOSKET D. E., Hormone-mediated translational control of protein synthesis in cultured cells of *Glycine max.*, *Dev. Biol.*, **62**: 486-497, 1978.
- [230] TETLEY R. M., The metabolism of oat leaves during senescence. I. Respiration, carbohydrate metabolism and the action of cytokinins, *Plant Physiol.*, **54**: 294-303, 1974.
- [231] THOMAS J., KUGRENS P., ROSS C. W., Cytological and biochemical aspects of cytokinin-enhanced growth of radish (*Raphanus sativus*) cotyledons *Amer. J. Bot.*, **67**: 456-464, 1980.
- [232] TONG ZHE, KASEMIR H., MOHR H., Coaction of light and cytokinin in photomorphogenesis, *Planta*, **159**: 136-142, 1983.
- [233] TREHARNE K. I., STODDART J. L., PUGHE I., PARANJOTHY K., WAREING P. F., Effects of gibberellin and cytokinins on the activity of photosynthetic enzymes and plastid ribosomal RNA synthesis in *Phaseolus vulgaris* L., *Nature*, **228**: 129-131, 1970.
- [234] VAJRANABHAI S. N., MEHTA A. R., Effects of kinetin on growth and nucleic acid metabolism in suspension cultures of *Cucumis melo* L., *Ann. Bot.*, **41**: 483-491, 1977.
- [235] VALADON L. R. G., MUMMERY R. S., Quantitative relationship between various growth substances and bud production in *Funaria hygrometrica*. A bioassay for abscisic acid, *Physiol. Plant.*, **24**: 232-234, 1971.
- [236] VAN STADEN J., Seasonal changes in the cytokinin content of *Ginkgo biloba* leaves, *Physiol. Plant.*, **38**: 1-5, 1976.
- [237] VAN STADEN J., DAVEY J. E., The synthesis, transport and metabolism of endogenous cytokinins, *Plant, Cell and Environment.*, **2**: 93-106, 1979.
- [238] VIDAL J., RIO M. C., GADAL P., Etude de l'évolution de la malate deshydrogenase a NADP durant le verissement des fevilles de *Phaseolus vulgaris* L., *Plant Sci. Let.*, **8**: 243-249, 1977.
- [239] VREMAN H. J., THOMAS R., CORSE J., SWAMINATHAN S., MURAI N., Cytokinins in tRNA obtained from *Spinacia oleracea* L. leaves and isolated chloroplasts, *Plant Physiol.*, **61**: 296-306, 1978.
- [240] WALTER G., AVERINA N. G., MEISTER A., Protochlorophyllid-Resynthese unter dem Einfluß von Kinetin. Spektrophotometrische Untersuchungen an Weizenpflanzen (*Triticum aestivum*) in vivo, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **171**: 409-417, 1977.
- [241] WHATLEY J. M., Plastid growth and division in *Phaseolus vulgaris*, *New Phytol.*, **86**: 1-16, 1980.
- [242] WOLLGIEHN R., Kinetin und Nukleinsäurestoffwechsel, *Flora Abt. A*, **156**: 291-302, 1965.

- [243] WOLLGIEHN R., PARTHIER B., RNA and protein synthesis in plastid differentiation. W: *Plastid Differentiation*, ed. J. Reinert., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1980.
- [244] WOŹNY A., Wpływ cytokinin na rozwój plastydów w spletku *Ceratodon purpureus* Brid. i w liścieniach ogórka (*Cucumis sativus*). UAM Poznań, *Seria Biologia* Nr 10, 1978.
- [245] WOŹNY A., The effect of kinetin on the incorporation of a precursor of protein synthesis in cells of lupine cotyledons, *Bull. Soc. Amis Sci. Lett.*, **22**: 33-35, 1983.
- [246] WOŹNY A., GWÓŹDŹ E. A., The effect of cytokinin on the polyribosome formation in cucumber cotyledons, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **175**: 476-480, 1980.
- [247] WOŹNY A., LEGOCKA J., SZWEYKOWSKA A., The role of cytokinins in the development and metabolism of barley leaves. I. The effect of cytokinins on leaf senescence, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **46**: 357-368, 1977.
- [248] WOŹNY A., MŁODZIANOWSKI F., Działanie cytokinin w procesie różnicowania się chloroplastów, *Post. Biol. Kom.*, **2**: 257-270, 1975.
- [249] WOŹNY A., NOWAK U., SZWEYKOWSKA A., Autoradiographic study of the cytokinin effect on protein and RNA syntheses in the protonema of *Ceratodon purpureus*, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **52**: 165-172, 1983.
- [250] WOŹNY A., SZWEYKOWSKA A., Effect of cytokinins and antibiotics on chloroplast development in cotyledons of *Cucumis sativus*, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **168**: 195-209, 1975.
- [251] YOKOYAMA M., NAITO K., SUZUKI H., Benzyladenine-enhanced cell proliferation and -suppressed greening in attached young bean leaves, *Plant, Cell Physiol.*, **22**: 623-627, 1981.
- [252] YOSHIDA K., TAKEGAMI T., Isolation of cytokinin binding proteins from tobacco leaves by bioaffinity chromatography and its partial characterization, *J. Biochem.*, **81**: 791-799, 1977.
- [253] ZACHAU H. G., DÜTTING D., FELDMAN H., Nucleotid-sequenzen zweier Seringspezifischer Transfer-ribonucleinsäuren, *Angewandte Chem.*, **78**: 392-393, 1966.
- [254] ZWAR J. A., Effects of cytokinins on the nucleic acid of tobacco pith, *J. Exp. Bot.*, **81**: 701-710, 1973.

Otrzymano: 3 stycznia 1984.

Przyjęto: 6 marca 1984.

Adres autora: ul. Stalingradzka 14, 61-713 Poznań.



## WIDEOMIKROSKOPIA — NOWA METODA OBSERWACJI I BADANIA RUCHÓW KOMÓRKOWYCH I TRANSPORTU WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO

VIDEOMICROSCOPY — A NEW TOOL FOR THE OBSERVATION AND STUDY  
OF THE CELLULAR AND INTRACELLULAR MOVEMENT AND TRANSPORT

Krzysztof ŁAZOWSKI

Pracownia Fizjologii Ruchów Komórkowych  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN

*Streszczenie.* W artykule przedstawiono rozwój i zastosowanie wideomikroskopii do badania zjawisk komórkowych i wewnątrzkomórkowych. Opisano podstawowe układy wideomikroskopu i przeanalizowano możliwości jego budowy opierając się na materiale krajowym. Wyszczególniono parametry przetworników optyczno-elektronowych najważniejsze z punktu widzenia konstrukcji wideomikroskopu.

*Summary.* The development and applications of the videomicroscopy systems to the study of various cellular and intracellular events are reviewed. The most important VMS are shown. The aspects of their experimental design which are most likely to be important to the constructors are pointed out.

### WYKAZ SKRÓTÓW

DIC — różniczkowy kontrast interferencyjny

HEM — metoda wysokiej ekstynkcji

KF — kontrast fazowy

POL — mikroskopia polaryzacyjna

POE — przetwornik optyczno-elektronowy

ZRO — zdolność rozdzielcza obiektywu

### WSTĘP

Biolog komórki, dla którego podstawowym narzędziem pracy jest mikroskop, często staje przed problemem zapisu i analizy obrazu o złej jakości i niewielkim kontraście. Jest to znana prawda, że mimo stosowania różnorodnych technik mikroskopowych, jak np. ciemnego pola,

światła spolaryzowanego (POL), kontrastu fazowego (KF), metody wysokiej ekstynkcji (HEM), różniczkowego kontrastu interferencyjnego (DIC), wiele informacji zawartych w otrzymanych obrazach jest nadal słabo czytelnych lub wręcz niedostrzegalnych dla obserwatora z powodu ograniczonej percepcji oka. Informacje te mogą być jednak w wielu przypadkach odtworzone za pomocą całego szeregu metod: od zwykłej fotografii do złożonych technik cyfrowych, w których wstępnym detektorem obrazu jest przetwornik optyczno-elektronowy (POE) kamery wideo (telewizyjnej) [48]. Do metod tych należy wideomikroskopia zdobywająca w ostatnich latach powszechne uznanie.

Dzięki regulacji, w szerokim zakresie, wielkości kontrastu i jasności tła otrzymanego wideoobrazu, można spostrzegać niezauważalne do tej pory, z uwagi na nikły kontrast, elementy i struktury komórek. Zastosowanie wysokoczułych POE lub sprzężonych z POE wzmacniaczy obrazu, zwiększających jasność badanych obiektów o kilka rzędów wielkości, umożliwiło detekcję, obserwację i zapis słabych bioluminescencji czy też przejściowych, mało wydajnych fluorescencji. Możliwość śledzenia zapisywanego wideoobrazu pozwala również na natychmiastową korekcję warunków zapisu.

Celem tego artykułu jest przedstawienie wideomikroskopii jako nowej techniki obserwacji i dokumentacji badań biologicznych, omówienie jej zastosowań i osiągniętych za jej pomocą wyników, a także zapoznanie czytelnika z typowymi układami wideomikroskopu.

## 1. ROZWÓJ WIDEOMIKROSKOPII

Jednym z pierwszych systemów wideomikroskopowych był układ użyty w 1951 r. przez Parparta [38] do badań ruchu brownowskiego i postępowego ziaren (o średnicy 0,2-0,4  $\mu\text{m}$ ) w cytoplazmie erytrocytów. Autor cytowanej pracy podkreślił istotny wzrost kontrastu obrazu otrzymanego z kamery wideo w stosunku do obrazu bezpośredniego (tzn. obrazu obserwowanego w okularze mikroskopu), wskazując także na wzrost czułości w zakresie ultrafioletu i światła widzialnego. W tym samym roku Flory [15] wykazał możliwość regulacji kontrastu i jasności obrazu w układzie kamery wideo połączonej z mikroskopem. Kontrast otrzymanych przez niego wideoobrazów był znacznie większy od kontrastu obrazu bezpośredniego. Umożliwiło to pracę przy większych powiększeniach i z większymi niż dotychczas aperturami, a tym samym osiągnięcie wyższej zdolności rozdzielczej.

Inną zaletą wideomikroskopii, na którą zwrócono już wówczas uwagę, było zastosowanie w kamerze wideo POE czułych w różnym zakresie spektralnym, od ultrafioletu do podczerwieni [15, 61].

Skonstruowano różne rodzaje przetworników optyczno-elektronowych dostosowanych do własności badanego obiektu i warunków obserwacji. Wprowadzono techniki wzmacniania obrazu oraz wysokoczułe POE [33, 41, 42], co umożliwiło obserwację i ciągłą rejestrację zjawisk w obiektach słabo oświetlonych lub słabo świecących [16, 35, 42, 44].

Wysokoczułe POE o małej bezwładności zastosowano do zapisywania poszczególnych faz zjawisk dynamicznych ze standardową rozdzielczością czasową zapisu 1/60 s, a przy zewnętrznym impulsie sterującym z rozdzielczością czasową rzędu mikrosekund.

Dużą zaletą wideomikroskopii jest również możliwość elektronicznej obróbki obrazu zapisanego na taśmie wideo w celu np.: redukcji szumów, regulacji jasności tła i kontrastu oraz ilościowych pomiarów.

Przez sprzężenie wideomikroskopu z komputerem otrzymano nowe sposoby podwyższania kontrastu i analizy obrazu, jak: redystrybucja stopni szarości, cieniowanie krawędziowe, pseudokolorowe kodowanie. Wprowadzenie komputera udostępniło także cały szereg metod bezpośredniej ilościowej obróbki danych.

Przytoczone możliwości wideomikroskopii i opisane w latach osiemdziesiątych [3, 4, 23, 24, 25] proste metody zwiększania kontrastu, czułości, zdolności rozdzielczej i szybkości rejestracji w układach optycznych dających mało światła (HEM, POL, DIC) stworzyły podstawy prawdziwej rewolucji w mikroskopii optycznej obiektów dynamicznych i zjawisk o ograniczonej wydajności kwantowej.

## 2. ZASTOSOWANIE PRZETWORNIKÓW OPTYCZNO-ELEKTRONOWYCH W WIDEOMIKROSKOPII

Rozpatrując przydatność różnych typów POE do obserwacji i otrzymywania danych ilościowych, należy zwrócić uwagę na następujące parametry przetworników: (1) czułość spektralną, (2) czułość kwantową i zakres dynamiczny, (3) stosunek prądu płytki sygnałowej do prądu ciemnego, (4) zdolność rozdzielczą, (5) bezwładność, (6) współczynnik przenoszenia kontrastu  $\gamma$ .

Powszechnie używane przetworniki widikonowe pozwalają na otrzymywanie obrazów w warunkach dobrego oświetlenia i podobnie jak stosowane w technice studyjnej plumbikony charakteryzują się dużą zdolnością rozdzielczą. Badając procesy dynamiczne wykorzystuje się plumbikony z uwagi na ich małą bezwładność i wysoki stosunek prądu płytki do prądu ciemnego.

Dzięki wprowadzeniu wzmacniaczy obrazu jako stopnia wstępnego (coraz częściej w postaci „płytki mikrokanałowej”) połączonych optyką włóknistą z POE osiągnięto wysoką czułość kwantową kamery wideo.

Obecnie występują tendencje do zastępowania POE o konstrukcjach opartych na lampie analizującej przez półprzewodnikowe przetworniki typu CCD<sup>1</sup>, które charakteryzują się niskim poziomem szumów, małą bezwładnością, szerokim zakresem spektralnym, liniowością odpowiedzi  $\gamma = 1$ ) [57].

Przy zastosowaniu przetwornika CCD, w układzie wzorowanym na AVEC-DIC<sup>2</sup>, Roos i Brady [47] wyznaczyli, z analizy ilościowej cyklu skurczu i rozkurczu, średnią długość sarkomeru komórki mięśniowej serca szczura ( $1,43 \pm 0,53 \mu\text{m}$ ) oraz przedstawili zależność długości sarkomeru od czasu.

### 3. PRZEGLĄD ZASTOSOWAŃ WIDEOMIKROSKOPII W BIOLOGII KOMÓRKI

Do pierwszych prac przedstawiających wyniki obserwacji biologicznych otrzymanych przy użyciu wideomikroskopii należą prace Parparta z lat 1951, 1964 [38, 39]. Za pomocą wysokoczułego widikonu zauważył on [39], że część kul żółtkowych odwirowanych jaj *Arbacia punctulata* uczestniczy w ruchu o właściwościach podobnych do ruchu saltacyjnego. Ponadto, na podstawie materiału dokumentacyjnego otrzymanego w układzie wideomikroskopu, stwierdził, że cytoplazmatyczne struktury włókniste mogą mieć wpływ na ruch cząstek.

W 1957 r. Williams [59] zbadał na drodze bezpośredniej obserwacji absorpcję komórkową w nadfiolecie za pomocą POE czułego w tym zakresie widma.

Układ pozwalający na jednoczesną obserwację i naświetlanie promieniowaniem UV wybranych części żywych komórek został przedstawiony w 1960 r. przez Montgomery'ego i wsp. [29].

Reynolds [42, 43], Morin i wsp. [30-32], a później Rich i wsp. [45] wykorzystali połączone z POE wzmacniacze obrazu do otrzymywania przestrzennego, czasowego i spektralnego rozkładu bioluminescencji i fluorescencji w *Noctiluca miliaris*, *Mnemiopsis leidyi*, *Gonyaulax polyhedra*, *Renilla reniformis* i innych. Stwierdzili oni, że wszystkie komórki o własnościach luminescencyjnych wykazują fluorescencję i na odwrót.

Zastosowanie wzmacniaczy obrazu jako stopnia wstępnego w kamerze wideo umożliwiło lepsze poznanie procesu przenikania pierwotniaków malarii do erytrocytów [13]. Przebieg zjawiska wymaga niskiego natężenia oświetlenia, a do zapisu niezbędna jest aparatura rejestrująca o rozdzielczości czasowej rzędu 1/10 s. Za pomocą zestawionego

<sup>1</sup> CCD — Charge Coupled Device.

<sup>2</sup> Omówienie układu AVEC-DIC w części 5.



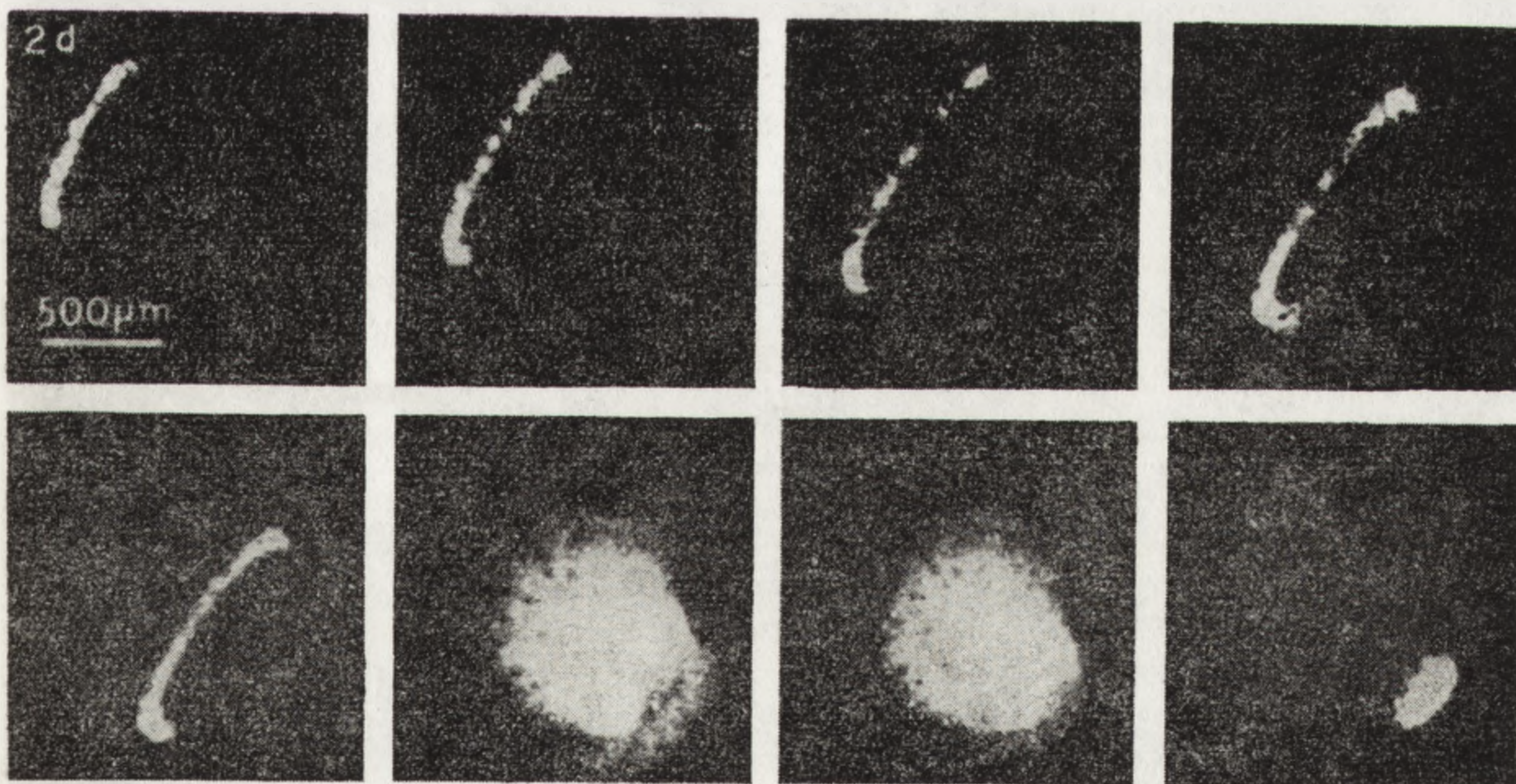
układu autorzy zaobserwowali szybko następujące deformacje erytrocytów.

Wiele istotnych informacji uzyskano stosując wapniowo aktywowaną akworinę [11] i kompleks lucyferyna-lucyferaza będący indikatorem stężenia ATP [12]. Posługując się akworiną Rose i wsp. [50] zaobserwowali punktowy a nie dyfuzyjny rozkład wstrzykniętych jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) w cytoplazmie komórek gruczołu śliniankowego muchy *Chironomus*. Zasugerowali oni sekwestrację wapnia w mitochondriach. Analizując przepuszczalność złączy międzykomórkowych w obecności zgromadzonych w ich sąsiedztwie jonów ( $\text{Ca}^{2+}$ ) potwierdzili oni istnienie kontrolowanego przez ( $\text{Ca}^{2+}$ ) komórkowego kanału informacyjnego [49].

Za pomocą wzmacniacza obrazu sprzęgniętego z plumbikonem Taylor i wsp. [53-55] zlokalizowali luminescencję akworiny wstrzykniętej do ameby *Chaos carolinensis* podczas lokomocji pierwotniaka, pinocytozy, reperacji błony komórkowej i kapingu powierzchniowych receptorów konkanawaliny A. Wyznaczyli oni również przestrzenne i czasowe fluktuacje ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

W podobnym układzie Gilkey [17] zaobserwował i zarejestrował przemieszczanie luminescencji akworiny z miejsca zapłodnienia do przeciwległego bieguna komórki jajowej *Oryzias latipes*, potwierdzając czasową i przestrzenną lokalizację wzrostu stężeń jonów wapnia (ryc. 1).

Zastosowanie wysokoczułych POE do badań rozkładu znaczonej fluorescencyjnie białek żywych komórek pozwoliło na ciągłą i długotrwałą obserwację zjawisk wewnątrzkomórkowych przy niskim natężeniu światła pobudzającego. Willingham i wsp. [60] zbadali pobieranie



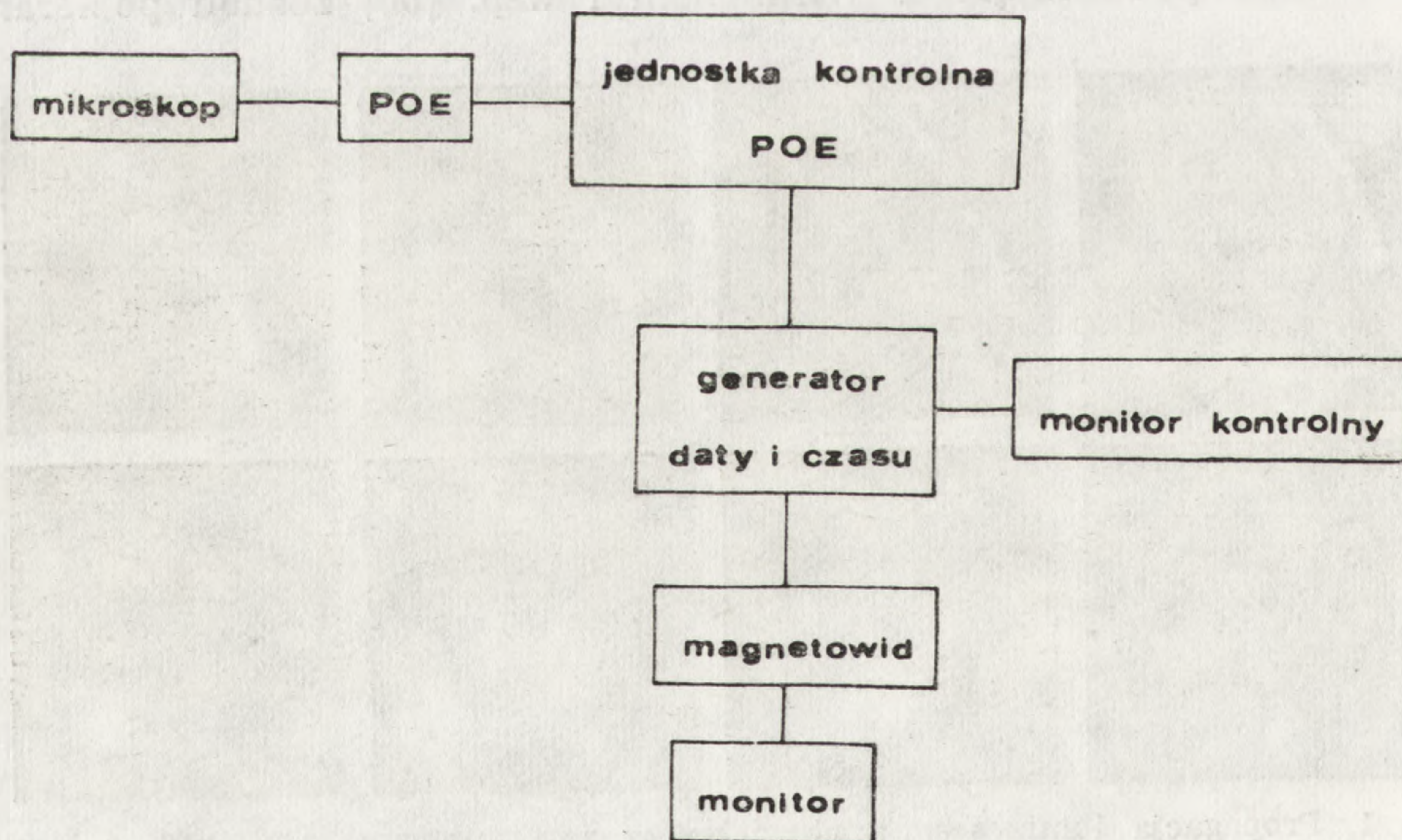
Ryc. 1. Propagacja luminescencji akworiny w zapłodnionym jaju *Oryzias latipes*. Kolejne fotografie robione w odstępach 10 s. Trzy ostatnie fotografie otrzymano przy zewnętrznym oświetleniu jaja [17]

i transport znaczonej fluorescencyjnie konkanawaliny A i  $\alpha_2$ -makroglobuliny za pomocą wysokoczułej kamery SIT. W eksperymencie trwającym ponad 24 godziny autorzy obserwowali pęcherzyki endocytarne zawierające znaczone białka oraz powstawanie i ruch saltacyjny lizosomów. Rozkład fluorescencyjnie znaczonej aktyny w żywych, poruszających się amebach *C. carolinensis* i *A. proteus* został wyznaczony przez Taylora i wsp. [56] i Stockema i wsp. [52]. Ci ostatni określili również rozkład miozyny w *Amoeba proteus* metodą immunofluorescencyjną.

#### 4. UKŁAD WIDEOMIKROSKOPU

Typowy system wideomikroskopu przedstawia ryc. 2. Ważnym elementem w konstrukcji układu wideomikroskopu jest sprzężenie optyczne mikroskop—kamera zapewniające właściwe zogniskowanie mikroskopu. W przypadku struktur o wymiarach rzędu zdolności rozdzielczej obiektywu mikroskopowego (ZRO) należy tak dobrać powiększenie układu wideomikroskopu, aby ograniczenie jego zdolności rozdzielczej wynikało z ZRO, a nie ze zdolności rozdzielczej POE. Zagadnienie to zostało szczegółowo omówione w monografii M. Pluty [40].

Wybór POE zależy od typu i warunków procesu badanego oraz od metody pomiarów ilościowych. Przy wyborze jednostki kontrolnej kamery należy zwrócić uwagę na możliwość bezpośredniej regulacji natę-

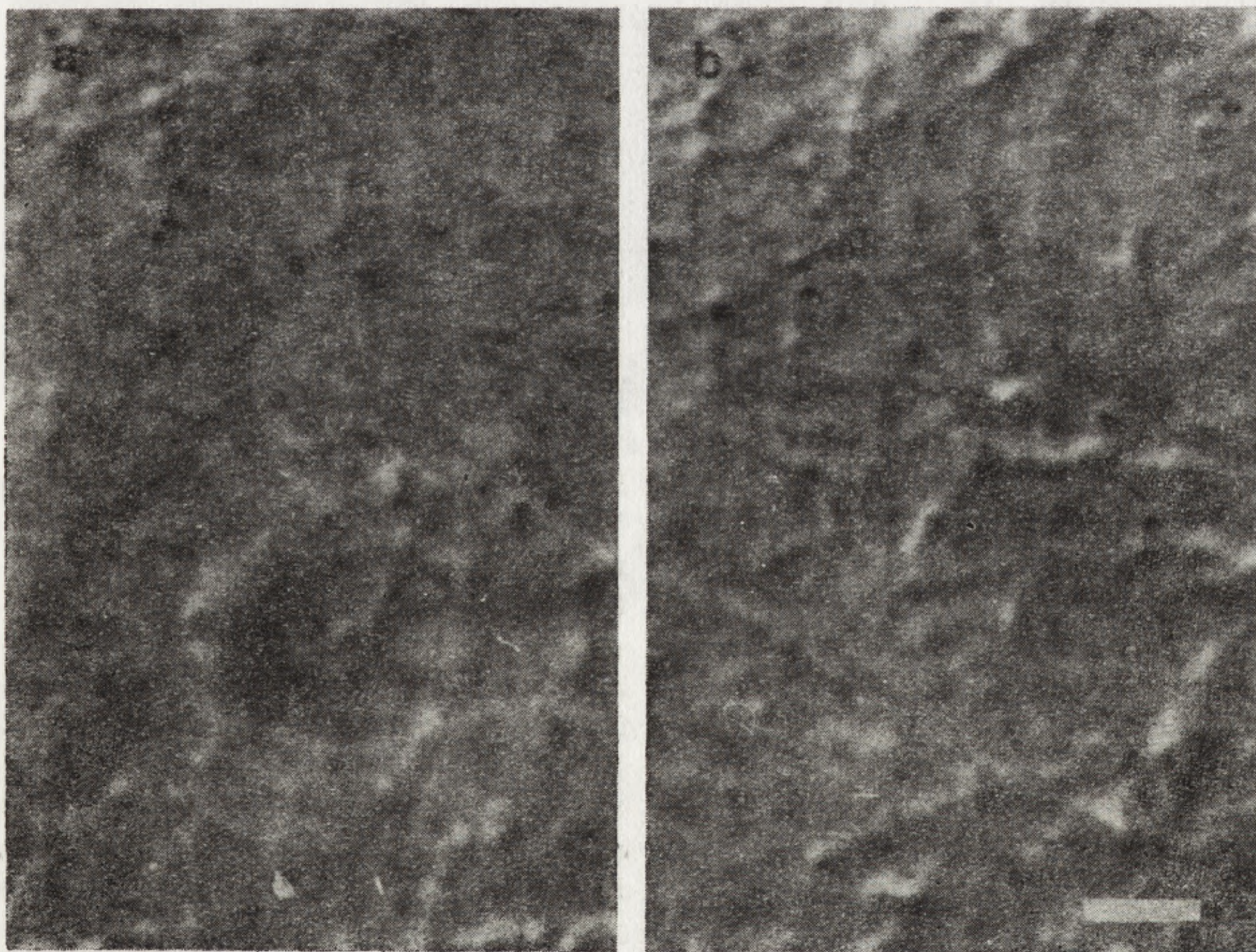


Ryc. 2. Schemat blokowy układu wideomikroskopu

żenia tła i kontrastu obrazu uwidocznionego przez kamerę wideo. Przykładowo, polska kamera TPK16 (prod. WZT) nie spełnia tego warunku, bardziej przydatnym w konstrukcji wideomikroskopu jest tor kamero-  
wy TP-37 (WZT) lub wprowadzana do produkcji kamera K-12 (WZT).  
Tor kamero-  
wy TP-37 (WZT) charakteryzuje się małym zniekształce-  
niem obrazu i dużą zdolnością rozdzielczą, a także umożliwia kontrolę  
ważniejszych parametrów pracy, jak np.: poziomu czerni, amplitud i li-  
niowości odchylenia poziomego i pionowego, ogniskowania.

Występujące w odwzorowaniu mikroskopowym obrazy różnego ro-  
dzaju zanieczyszczeń, niejednorodności i odbić na elementach optycz-  
nych oraz wprowadzone układem elektronicznym szumy mogą być  
uśredniane i zmniejszone przez dołączenie komputerowej przystawki pa-  
mięciowej [2] (ryc. 3).

Bardziej złożony układ wideomikroskopu został wykorzystany do  
jednoczesnego śledzenia zachowania się żywych komórek oraz wewnątrz-  
komórkowego transportu fluorescencyjnie znaczonych białek. Inoué [25],  
stosując technikę dwukolorowego kodowania, połączył w czasie rzeczy-

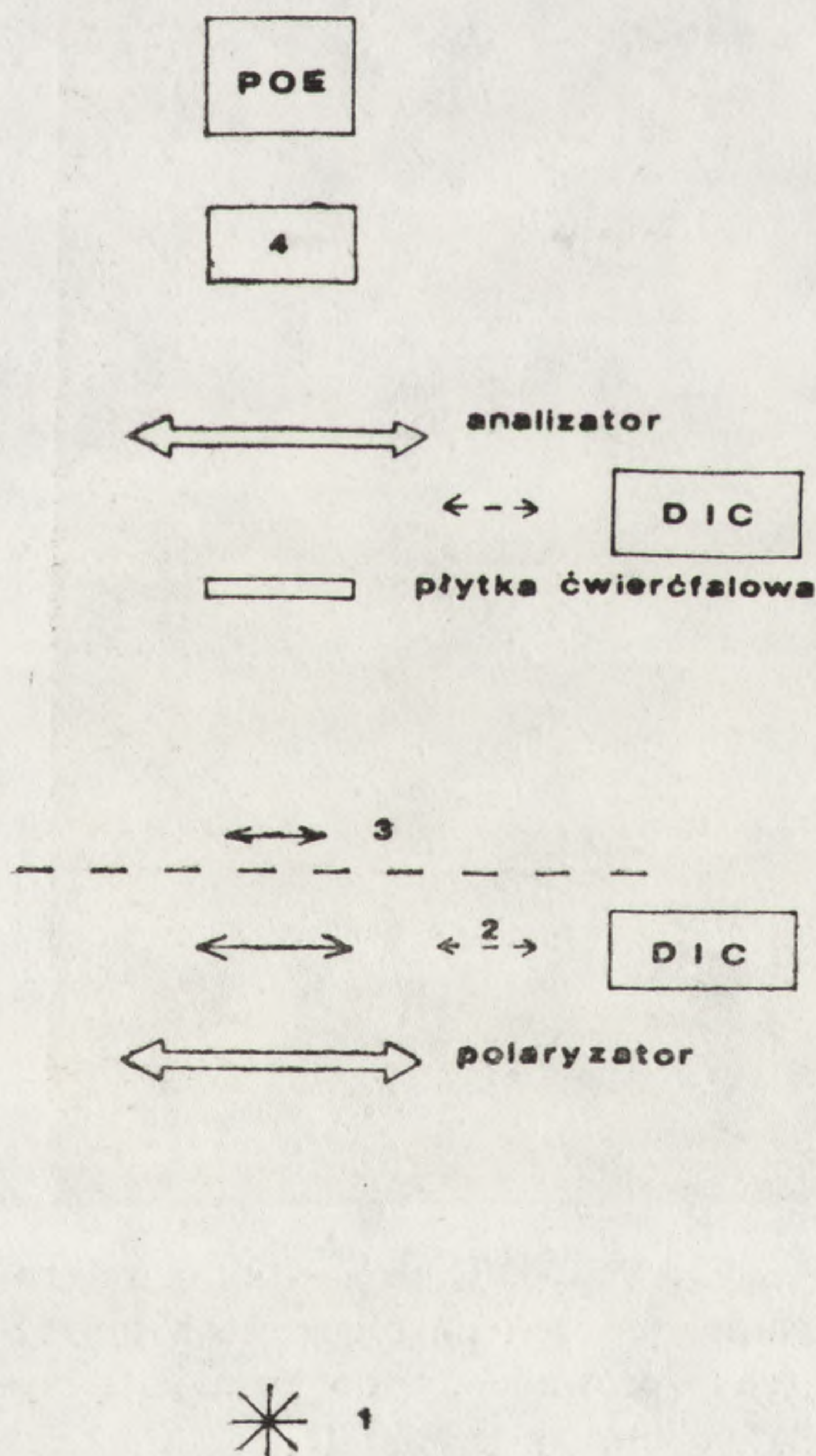


Ryc. 3. Wideoobrazy uzyskane za pomocą metody AVEC-DIC; *a* — obraz mikro-  
tubul z nałożonym na niego obrazem odbić i zanieczyszczeń na elementach optycz-  
nych układu, *b* — obraz odbić i zanieczyszczeń wprowadzony do pamięci przy-  
stawki komputerowej został odjęty od obrazu próbki [2]

wistym dwa obrazy tego samego obiektu uzyskane z dwóch kamer, na pojedynczym kolorowym monitorze. Słaba fluorescencja kodowania jednym kolorem nałożona na obraz próbki z POL lub DIC w drugim kolorze mogła być bezpośrednio powiązana z dwójłomnością lub różnicą dróg optycznych spowodowaną strukturami poruszającego się obiektu. W innym układzie, wykorzystując technikę komputerową i DIC, Paolini i wsp. [37] otrzymali trójwymiarowe obrazy leukocytów.

##### 5. WZROST KONTRASTU, ZDOLNOŚCI ROZDZIELCZEJ I ROZPOZNAWCZEJ W UKŁADACH WIDEOMIKROSKOPU

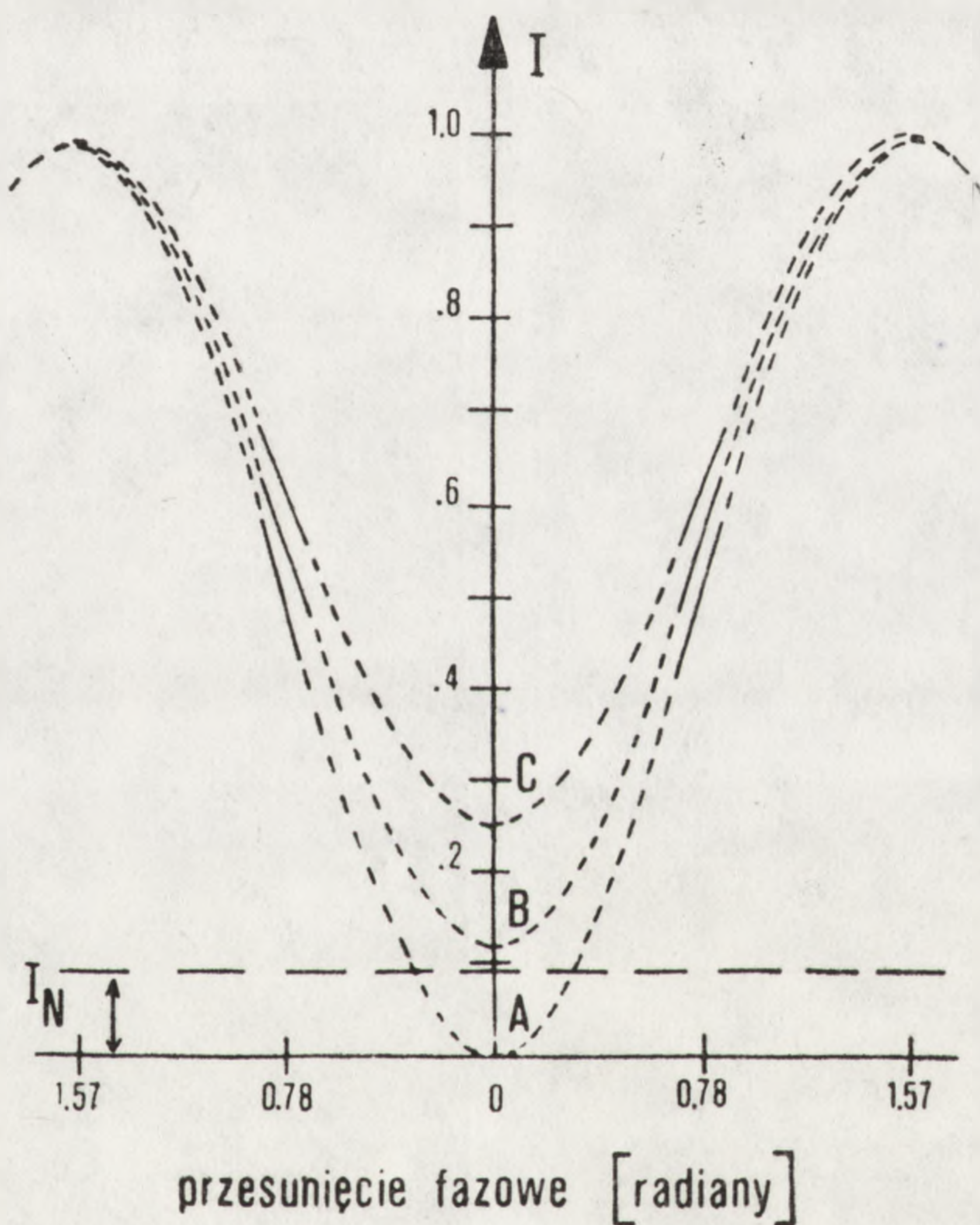
Już ponad trzydzieści lat temu zwrócono uwagę na przydatność metody wideo do otrzymywania wyraźnych, kontrastowych obrazów żywych struktur biologicznych [15, 38]. Parpart [39], badając za pomocą wideomikroskopu ruch cząstek o średnicy  $1,3 \mu\text{m}$  w cytoplazmie jaj *Arbacia punctulata*, zauważył, że kontrast wideoobrazu uzyskanego w jasnym polu mikroskopu jest porównywalny z kontrastem obrazu uzyskanego przy użyciu techniki kontrastu fazowego, a co więcej pozbawiony jest charakterystycznego dla KF halo.



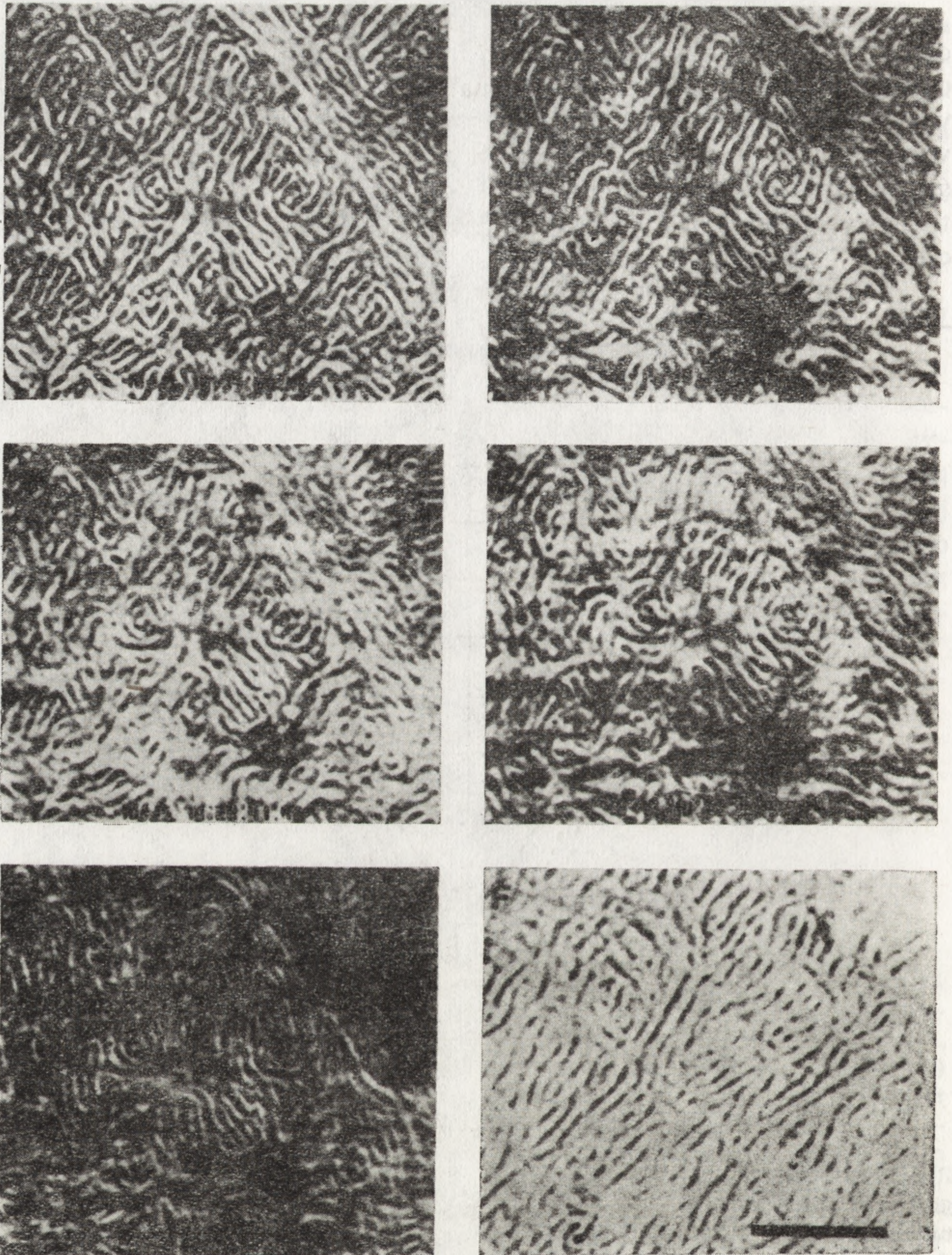
Ryc. 4. Schemat układu AVEC-POL, -DIC. Mikroskop Zeiss Axiomat ze skorygowanym wewnątrznie obiektywem (3)  $100\times$ , NA 1,3 planapochromat i kondensorem (2) aplanatyczno-achromatycznym. Polaryzator i analizator skrzyżowane, płytka ćwierćfalowa, dla długości fali oświetlającego światła  $\lambda = 546 \text{ nm}$  (zielona linia rtęci), ustawiona równolegle wolną osią do kierunku transmisji polaryzatora. Obrotowy analizator pracuje wtedy w układzie kompensatora de Senarmont i pozwala bezpośrednio mierzyć spowodowane dwójłomnością przesunięcie fazowe w zakresie od 0 do  $\lambda/2$  [20]. 1 — źródło światła HBO 50, 4 — sprzężenie optyczne mikroskop-kamera wideo

Dalszy istotny postęp w metodach wzmacniania kontrastu obrazów obiektów fazowych, obserwowanych mikroskopowo, jest związany z pracami S. Inoué [23-25] i R. D. Allena [1, 3, 4]. Stwierdzili oni, że odpowiedni dobór i ustawienie konwencjonalnych elementów optycznych we współpracujących z POE systemach mikroskopowych wykorzystujących światło spolaryzowane (POL, DIC) pozwala na otrzymanie wysokokontrastowych obrazów oraz na osiągnięcie maksymalnej zdolności rozdzielczej.

Allen i wsp. [3, 4], w nazwanych przez siebie AVEC-POL, AVEC-DIC, AVEC-DBI (AVEC — Allen Video Enhanced Contrast-) meto-

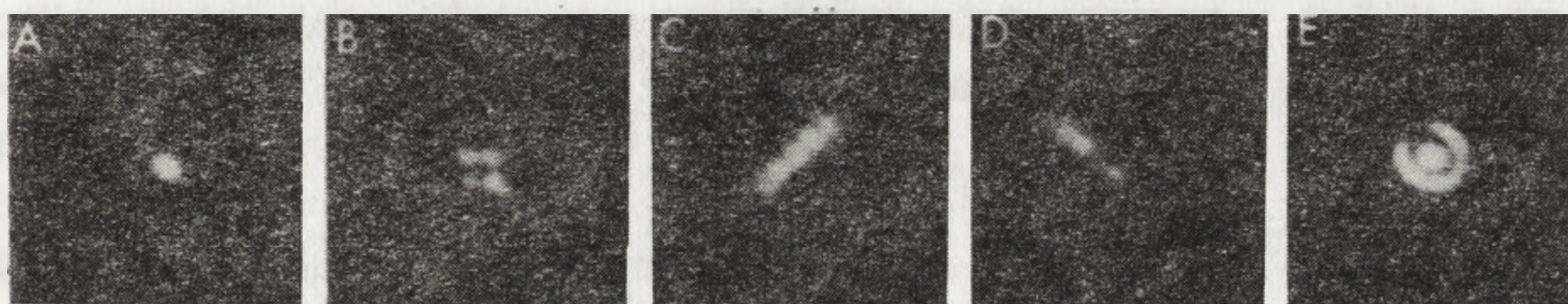


Ryc. 5. Zależność natężenia przechodzącego światła  $I$  w funkcji przesunięcia fazowego wprowadzonego za pomocą kompensatora de Senarmont dla różnych współczynników ekstynkcji  $F$  ( $F = I_{\parallel} / I_{\perp}$ ,  $\parallel$  — polaryzatory równoległe,  $\perp$  — polaryzatory skrzyżowane), (A)  $F = \infty$ , (B)  $F = 8$ , (C)  $F = 4$ . Kontrast wizualny i fotograficzny zmienia się silnie ze zmianą  $F$  (aż do całkowitego zaniku, natomiast kontrast wideoobrazów, zależny od nachylenia krzywej  $I$  w punkcie pracy kompensatora  $\pm \lambda/4$  ( $\pm 0,78$  rad.), linia ciągła, zmienia się nieznacznie.  $I_N$  — poziom szumów optycznych spowodowanych rozpraszaniem światła na ziarnistościach obserwowanych struktur, wielokrotnie uniemożliwiający obserwacje w HEM (przesunięcie fazowe 0 rad.) nie wpływa na jakość obrazów otrzymywanych w metodzie AVEC [3]

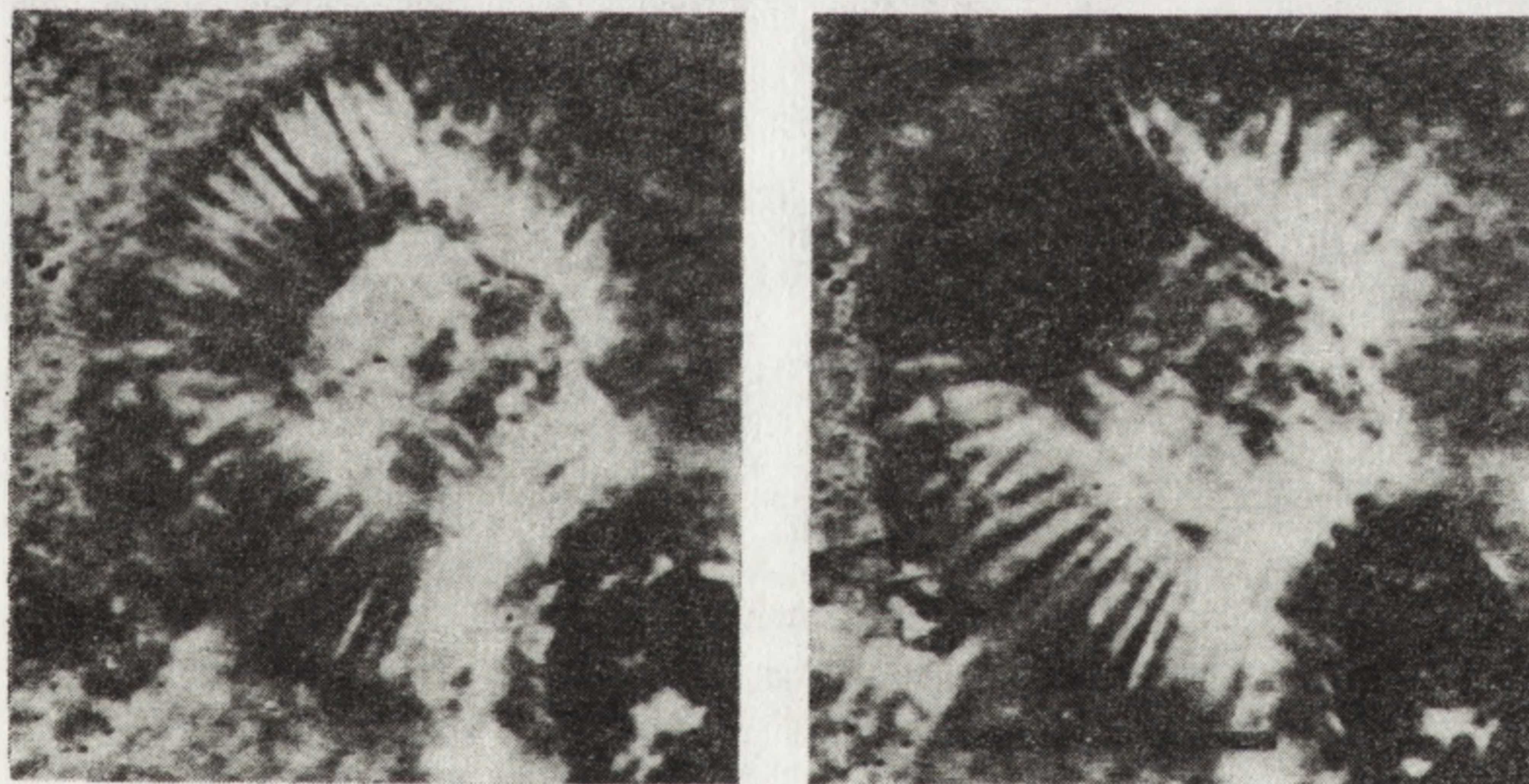


Ryc. 6. Wideoobrazy ludzkiego nabłonka z ust otrzymane za pomocą AVEC-POL dla różnych przesunięć fazowych; (A)  $-\lambda/9$ , (B)  $+\lambda/9$ , (C)  $-\lambda/4$ , (D)  $+\lambda/4$ , (E)  $-\lambda/4$  polaryzator obrócono o  $20^\circ$  obniżając współczynnik ekstynkcji  $F$  poniżej 10. W wideoobrazach od (A) do (E) zwiększano stopniowo poziom czerni redukując tym samym wzrost jasności obrazów powodowany wzrastającym przesunięciem fazowym. (F) Mikrofotografia uzyskana przy przesunięciu fazowym  $\lambda/100$ . Kreska  $5 \mu\text{m}$  [3]

dach, wykorzystał konwencjonalne elementy optyczne (mikroskop Zeiss Axiomat) i liniową kamerę wideo  $\gamma = 1$  z szerokozakresową regulacją natężenia tła i kontrastu (ryc. 4). Badając zmianę kontrastu wideoobrazu w funkcji obrotu analizatora pracującego w układzie kompensatora de Senarmont stwierdził on, że dla obrotu analizatora o kąt  $\pm (20-45^\circ)$  względem położenia ekstynkcji (odpowiada to wprowadzeniu przesunięcia fazowego  $\pm (\lambda/9-\lambda/4)$  do liniowo spolaryzowanej wiązki światła przechodzącej przez kompensator) otrzymany obraz optyczny, niewidoczny z powodu dużej ilości światła pasożytniczego (ang. stray light), jest optymalny do detekcji kamerą wideo, dostarczając wysokokontrastowych, czytelnych wideoobrazów (ryc. 6). Ustawienie kompensatora w zakresie



Ryc. 7. Wideoobrazy dyfrakcji Airiego na 30  $\mu\text{m}$  aperturze. Obiektyw 100  $\times$ ; 1,3 NA planapochromat. (A) światło niespolaryzowane, (B)-(E) światło spolaryzowane, różne przesunięcia fazowe: (B) 0, (C)  $-\lambda/100$ , (D)  $+\lambda/100$ , (E)  $-\lambda/4$ ; (B), (C), (D) — anomalna dyfrakcja Airiego [3]



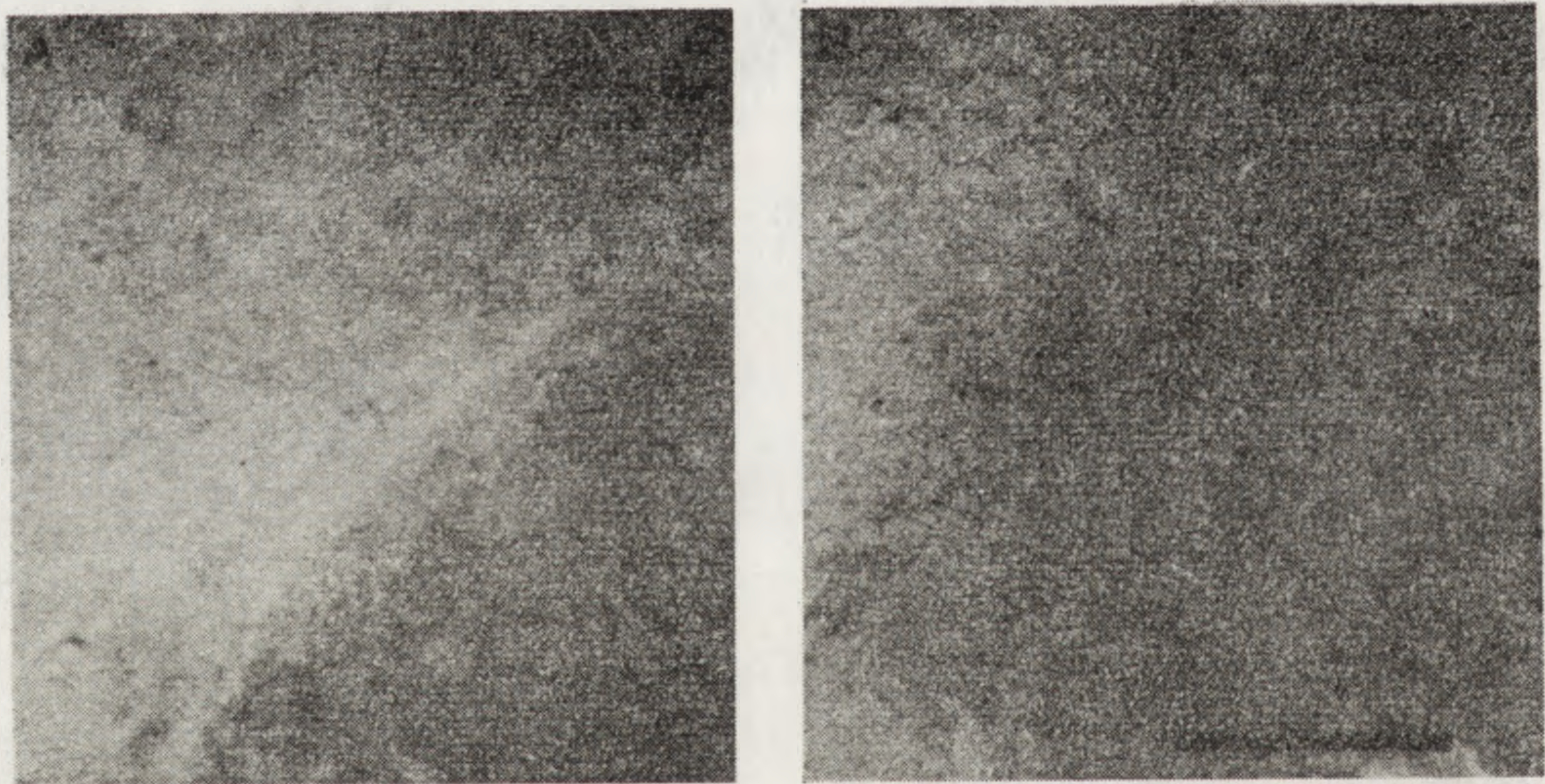
Ryc. 8. Wideoobrazy nabłonka jelitowego 5-dniowego kurczęcia; (A)  $-\lambda/4$ , (B)  $+\lambda/4$ . Kreska 5  $\mu\text{m}$  [3]

$\pm (\lambda/9-\lambda/4)$  całkowicie redukuje anomalną dyfrakcję Airiego (ryc. 7), obserwowaną w mikroskopach polaryzacyjnych dla dużych apertur obiektywów (dotychczas do jej usunięcia stosowano drogie i trudne w produkcji rektyfikatory polaryzacji [27]).

Stosując układy AVEC-POL i AVEC-DIC Allen i wsp. [3, 4] różnili leżące obok siebie mikrokosmki nabłonka jelitowego o długości

2  $\mu\text{m}$  i średnicy 0,1  $\mu\text{m}$  (ryc. 8), wskazując na możliwość przekroczenia konwencjonalnej granicy zdolności rozdzielczej obiektywu mikroskopowego przy długości fali 546 nm. Rozpoznali także (ryc. 9) leżące na jednorodnym tle mikrotubule o średnicy 25 nm całkowicie niedostrzegalne przy obserwacji obrazu bezpośredniego. O uwidocznieniu i ciągłej obserwacji elementów o wymiarach od 50 nm do 100 nm, w układzie mikroskopowym opartym na metodzie wysokiej ekstynkcji (HEM) współpracującym z wysokoczułym POE, doniósł też Inoué [23, 24]. Świadczy to, że technika wideo pozwala na pełniejsze wykorzystanie zdolności rozdzielczej i rozpoznawczej mikroskopu [7, 24, 26].

Słaba zależność kontrastu i jakości obrazu od natężenia światła parasożytniczego (kontrast obrazu zależy od pochodnej natężenia światła w punkcie pracy kompensatora (ryc. 5) czyni metodę AVEC szczególnie przydatną przy obserwacji obiektów zawierających dużą ilość cząstek rozpraszających światło jak np.: ameby, jaja jeżowców. Jednocześnie umożliwia ona zwiększenie zdolności rozdzielczej przez oświetlenie obiektów krótszymi, silniej rozpraszanymi falami z zakresu błękitu i fioletu.



Ryc. 9. Wideoobrazy wiązki mikrotubul, (A)  $-\lambda/9$ , (B)  $+\lambda/9$ .  
Kreska 5  $\mu\text{m}$  [3]

Użycie POE z współczynnikiem przenoszenia kontrastu  $\gamma = 1$  umożliwia wyznaczenie, w układzie AVEC-POL, przesunięcia fazowego spowodowanego dwójłomnością obiektu z bezpośredniego pomiaru różnicy natężenia tła i natężenia światła przechodzącego przez obiekt [3, 28].

Metoda AVEC pozwala również na obserwację i zapis ruchu submikroskopowych cząstek, wiązek mikrotubul, a nawet poszczególnych mikrotubul [5, 6, 8, 9, 21] ze standardową rozdzielczością czasową 1/60 s. Oznacza to ponad tysiącrotnie większą prędkość zapisu wideo w sto-



sunku do rejestracji przy użyciu wysokiej klasy materiałów fotograficznych, dla których czasy naświetlania, w tych samych warunkach świetlnych, są rzędu 20 s.

#### ZAKOŃCZENIE

Prostota i łatwość zapisu, rozdzielczość czasowa, możliwość współpracy z generatorami daty i czasu, możliwość jednoczesnej z zapisem obserwacji zarejestrowanego obrazu to zalety, które spowodowały, że technika wideo jest coraz częściej stosowaną metodą dokumentacji obserwacji mikroskopowych [1, 14, 19, 34, 36, 51]. Istotna jest też ponad stokrotnie niższa cena dokumentacji wideo w porównaniu z fotograficzną.

Sprzężenie wideomikroskopu z komputerem nie tylko niesłychanie uprościło różnego rodzaju pomiary i analizy ilościowe [10, 18, 46], ale również dostarczyło nowych metod wzmacniania kontrastu i obróbki wideoobrazu [7, 22, 37, 45, 47, 58] ujawniając dotychczas niezauważalne elementy i struktury.

#### LITERATURA

- [1] ALLEN R. D., ALLEN N. S., Videomicroscopy in the study of Protoplasmic Streaming and Cell Movement, *Protoplasma*, **109**: 209-216, 1981.
- [2] ALLEN R. D., ALLEN N. S., Video enhanced microscopy with a computer frame memory, *J. Microscopy*, **129**: 3-17, 1983.
- [3] ALLEN R. D., ALLEN N. S., TRAVIS J. L., YILMAZ H., Video Enhanced Contrast Polarization (AVEC-POL) Microscopy: a new method applied to the detection of birefringence in the motile reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*, *Cell Motility*, **1**: 275-289, 1981.
- [4] ALLEN R. D., ALLEN N. S., TRAVIS J. L., Video Enhanced Contrast, Differential Interference Contrast AVEC-DIC Microscopy: a new method capable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*, *Cell Motility*, **1**: 291-302, 1981.
- [5] ALLEN R. D., METUZALS S. J., TASAKI I., BRADY S. T., GILBRET S. P., Fast axonal transport in the squid giant axon, *Science*, **218**: 1127-1129, 1982.
- [6] ALLEN R. D., TRAVIS J. L., HAYDEN J., ALLEN N. S., BREUER A. C., LEVIS L. J., Cytoplasmic transport: moving ultrastructural elements common to many cell types revealed by video-enhanced microscopy, *Cold Spring Harbor Symposia*, **46**: 85-87, 1982.
- [7] BERNS M., WALTER R., Laser microirradiation and computer video optical microscopy, [w] *Cell Analysis*, red. N. Catsimopoulos, Plenum Press, New York 1982, 33-54.
- [8] BRADY S. T., LASEK R. J., ALLEN R. D., Fast axonal transport in extruded cytoplasm from squid giant axon, *Science*, **218**: 1129-1131 1982.

- [9] BREUER A. C., ALLEN R. D., LEWIS L. J., Rapid transport in neurites of „submicroscopic” structures, *Neurology*, **31**: 118a, 1981.
- [10] BREUER A. C., CHRISTIAN C. W., HENKART M., NALSON P. G., Computer analysis of organelle translocation in primary neuronal cultures and continuous cell lines, *J. Cell Biol.*, **65**: 562, 1975.
- [11] CASWELL A. H., Methods of measuring intracellular calcium, *Int. Rev. Cytol.*, **56**: 145-181, 1979.
- [12] CORMIER M., WAMPLER J., HORI K., Bioluminescence: chemical aspects, *Prog. Chem. Org. Natur. Prod.*, **30**: 1-54, 1973.
- [13] DVORAK J. A., MILLNER L. H., WHITEHOUSE W. C., SHIROISHI T., Invasion of erythrocytes by Malaria Merozoites, *Science*, **187**: 748-750, 1975.
- [14] EDDS K. T., CHAMBERS C., ALLEN R. D., Coelomocyte motility: an enhanced view, *Cell Motility*, **3**: 113-122, 1983.
- [15] FLORY L. E., The television microscopy, *Cold Spring Harbor Symp.*, **16**: 505-509, 1951.
- [16] GAWLITTA W., STOCKEM W., WEHLAND J., WEBER K., Pinocytosis and Locomotion of *Amoebae*, *Cell Tiss. Res.*, **213**: 9-20, 1980.
- [17] GILKEY J. C., JAFFE L. F., RIDGEWAY E., REYNOLDS G. T., A free calcium wave traverses the activating egg of the madaka *Oryzias latipes*, *J. Cell Biol.*, **76**: 448-466, 1978.
- [18] HÄDER D. P., COLOMBETTI G., LENCI F., OUAGLIA M., Phototaxis in Flagellates *Euglena gracilis* and *Ochromonas danica*, **130**: 78-82, 1981.
- [19] HÄDER D. P., Coupling of photomovement and photosynthesis in Desmids, *Cell Motility*, **2**: 73-82, 1982.
- [20] HARTSHORNE N. H., STUARE A., Crystals and Polarising Microscope, 4 wyd., Edward Arnold Ltd., London 1970, 1-614.
- [21] HAYDEN J. H., ALLEN R. D., GOLDMAN R. D., Visualization of microtubule and associated particle saltation in keratocytes of *Rana pipiens*, *J. Cell Biol.*, **95**: 317a, 1982.
- [22] HOLMQUIST J., ANTONSSON D., BENGTSSON E., DANIELSSON P. E., ERIKSSON O., HEDBLUM T., MARTENSSON A., NORDIN B., OLSSON T., STENKVIST B., TULIPS, *Anal. Quant. Cytol.*, **3**: 182-194, 1981.
- [23] INOUÉ S., New dimension in polarized light video microscopy, *J. Cell Biol.*, **87**: 241a, 1980.
- [24] INOUÉ S., Video Image Processing, *J. Cell Biol.*, **89**: 346-355, 1981.
- [25] INOUÉ S., Simultaneous video display of fluorescence and polarized light or DIC microscope images in real time, *J. Cell Biol.*, **95**: 461a, 1982.
- [26] INOUÉ S., COHEN D., ELLIS G., High resolution stereo video microscopy, *Biol. Bull.*, **161**: 306, 1981.
- [27] INOUÉ S.; HYDE W. L., Studies of depolarization of light on microscope lens surfaces, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**: 831-838, 1957.
- [28] KAMIYA N., ALLEN R. D., Cyclic birefringence changes in *Physarum plasmodium*, *Biol. Bull.*, **161**: 306, 1981.
- [29] MONTGOMERY P., HUNDLEY L. L., The use of television and scanning techniques for UV irradiation studies of living cells, *IRE Trans. Med. Electron.*, **ME-7**, **3**: 135-138, 1960.
- [30] MORIN J. G., REYNOLDS G. T., Fluorescent and time distribution of photon emission of bioluminescent photocycles in *Obelia genicula*, *Biol. Bull.*, **137**: 410, 1969.

- [31] MORIN J. G., REYNOLDS G. T., Luminescence and related fluorescence in coelenterates, *Biol. Bull.*, **139**: 431, 1970.
- [32] MORIN J. G., REYNOLDS G. T., The cellular origin of bioluminescence in the colonial hydroid *Obelia*, *Biol. Bull.*, **147**: 397-410, 1974.
- [33] MORTON G. A., RUEDY J. E., KRIEGER B. L., The brightness intensifier, *RCA Review*, **9**: 419-432, 1948.
- [34] NELSON G. A., ROBERTS T. M., WARD S., *Caenorhabditis elegans* spermatozoan locomotion: ameboid movement with almost no actin, *J. Cell Biol.*, **92**: 121-131, 1981.
- [35] O'KANE D. J., PALEVITZ B. A., Video microscopy for low-light objects, *J. Cell Biol.*, **83**: 304a, 1979.
- [36] PALEVITZ B. A., O'KANE D. J., The vacuole system in stomatal cells of *Allium*, *Protoplasma*, **109**: 23-56, 1981.
- [37] PAOLLINI P., SWANSON J., WILLIAMS W., WALLACE J., Image analysis of sarcomeres in isolated cardiac and skeletal muscle fibers, *J. Cell Biol.*, **95**: 464a, 1982.
- [38] PARPART A. K., Televised microscopy in biological research, *Science*, **113**: 483-484, 1951.
- [39] PARPART A. K., Echinoderm granule motion in the egg of *Arbacia punctulata*, [w] *Primitive motile systems*, red. R. D. Allen, N. Kamiya, Academic Press, New York, London 1964, 471-485.
- [40] PLUTA M., *Mikroskopia optyczna*, PWN, Warszawa 1982, 1-970.
- [41] REYNOLDS G. T., Present states of scintillation chambers, *IRE Trans. Nucl. Sci.*, **NS-7**: 115-120, 1960.
- [42] REYNOLDS G. T., Image intensification applied to microscope system, [w] *Advances in optical and electron microscopy* red. R. Barer, V. Cosslet, Academic Press, New York 1968, 1-40.
- [43] REYNOLDS G. T., BOTOS P., Image intensification and magnetic tape recording system for microscopic observation of bioluminescence and fluorescence, *Biol. Bull.*, **139**: 432, 1970.
- [44] REYNOLDS G. T., TAYLOR D. L., Image intensification applied to light microscopy, *Bio Science*, **30**: 586-592, 1980.
- [45] RICH E. S., WAMPLER J. E., A flexible, computer-controlled video microscope capable of quantitative spatial, temporal and spectral measurement, *Clin. Chem.*, **27**: 1558-1568, 1981.
- [46] ROOS K. P., BASKIN R. J., On-line recording of diffraction pattern changes from single muscle fibers subjected to quick stretch and release, *Computers Programs in Biomed.*, **13**: 33-42, 1981.
- [47] ROOS K. P., BRADY A. J., Individual sarcomere length determination from isolated cardiac cells using high-resolution optical microscopy and digital image processing, *Biophys. J.*, **40**: 233-244, 1982.
- [48] ROSE A., *Vision human and electronic*, Plenum Press, New York 1973, 1-197.
- [49] ROSE B., LOEWENSTEIN W. R., Permeability of cell junction depends on local cytoplasmic calcium activity, *Nature*, **254**: 250, 1975.
- [50] ROSE B., LOEWENSTEIN W. R., Calcium ion distribution in cytoplasm visualised by aequorin: diffusion in cytosol by energized sequestering, *Science*, **190**: 1204-1206, 1975.
- [51] SCHATTEN G., Sperm incorporation, the pronuclear migrations and their relation to the establishment of the 1st embryonic axis: Time lapse video

- microscopy of the movements during fertilization of the sea urchin *Lytechinus variegatus*, *Dev. Biol.*, **86**, 2: 426-431, 1981.
- [52] STOCKEM W., NAIB-MAJANI W., WOHLFARTH-BOTTERMAN K. E., OSBORN M., WEBER K., Pinocytosis and Locomotion of *Amoebae*, 19, *Europ. J. Cell Biol.*, **29**: 171-178, 1983.
- [53] TAYLOR D. L., ALLEN R. D., REYNOLDS G. T., Detection of free calcium ions in amoebae by aequorin luminescence, *Biol. Bull.*, **149**: 448, 1975.
- [54] TAYLOR D. L., BLINKS J. R., REYNOLDS G. T., Spontaneous aequorin luminescence, *Biol. Bull.*, **155**: 469, 1978.
- [55] TAYLOR D. L., WANG Y. L., HEIPLE J., Distribution of fluorescently labeled actin in living amoebae, *J. Cell Biol.*, **86**: 590-598, 1980.
- [56] TAYLOR D. L., BLINKS J. R., REYNOLDS G. T., Aequorin luminescence during ameboid movement, endocytosis and capping, *J. Cell Biol.*, **86**: 599-607, 1980.
- [57] WALCZYK J., *Podstawy systemów telewizji użytkowej*, WKiŁ, Warszawa 1982, 1-190.
- [58] WALTER R. J., BERNS M. W., Computer-enhanced video microscopy, Digitally processed microscope images can be produced in real-time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 6927-6931, 1981.
- [59] WILLIAMS G. Z., Direct observation of cellular absorption by UV television microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, **5**: 246-253, 1957.
- [60] WILLINGHAM M. C., PASTAN I., The visualisation of fluorescent proteins in living cells by Video Intensification Microscopy-VIM, *Cell*, **13**: 501-507, 1978.
- [61] ZWORYKIN V. R., FLORY L. E., Television as an educational and scientific tool, *Science*, **113**: 483, 1951.

*Nadestano: 29 sierpnia 1983.*

*Przyjęto: 23 marca 1984.*

*Adres autora: ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.*

## CHROMOSOMY PŁCIOWE CZŁOWIEKA. WYBÓR INFORMACJI. CZĘŚĆ I — CHROMOSOM X

### SEX CHROMOSOMES OF MAN. SELECTION OF INFORMATION. PART I — CHROMOSOME X

Bogdan KAŁUŻEWSKI

Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Endokrynologii AM w Łodzi  
Department of Medical Genetics, Institute of Endocrinology,  
Medical Academy of Łódź

*Streszczenie.* Do cech różniących allocykliczny chromosom płciowy X od autosomów między innymi należą: zdolność do heterochromatynizacji, allocykliczna replikacja DNA oraz nieaktywność genetyczna. Szybki postęp, jaki odnotowano w ostatnich latach w doskonaleniu metod cytologicznych, cytogenetycznych oraz biochemicznych, pozwolił na dokładniejsze i mniej arbitralne opisanie cech szczególnych chromosomu X. Wykryto geny oraz regiony unikające inaktywacji, skonstruowano mapę cytogenetyczną chromosomu X, uzyskano kolekcję segmentów DNA tego chromosomu. Wykorzystano szansę laboratoryjnej reaktywacji allocyklicznego chromosomu X, dla badania ekspresji genów autosomalnych w przypadkach translokacji autosomy/X, co stwarza nową jakość w mapowaniu genomu człowieka.

*Summary.* The allocyclic chromosome X can be differentiated from the autosomes upon its heterochromatinization, allocyclic DNA replication and genetic inactivity. The progress of the last years in improving of the cytological, cytogenetical and biochemical methods lead to more precise and less arbitrary description of the X chromosome's specific features. Genes and regions escaping inactivation were localized and the cytogenetical map was constructed. The collection of DNA segments of this chromosome was obtained also. The „in vitro” reactivation of the allocyclic X chromosome gave the chance of the autosomal gene expression investigations in cases of autosomes/X translocations, what established the new quality in the mapping process of the human genome.

#### WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

CBG — C-bands by barium hydroxide using Giemsa (metoda prążków C z zastosowaniem Ba(OH)<sub>2</sub> i barwnika Giemsy)

GTG — G-bands by trypsin using Giemsa (metoda prążków G z zastosowaniem trypsyny)

- RBA — R-bands by BudR using acridine orange (metoda prążków R z zastosowaniem BudR i barwnika oranżu akrydynowego)
- RBG — R-bands by BudR using Giemsa (metoda prążków R z zastosowaniem BudR i barwnika Giemsy)
- MTX-BHG — technika umożliwiająca badanie kinetyki replikacji DNA chromosomów w synchronicznie proliferującej populacji limfocytów, Methotrexate-BrdU-Hoechst-Giemsa
- PCC-SCD — premature condensed chromosomes (przedwcześnie skondensowane chromosomy)
- SCD — sister chromatid differential staining (zróżnicowane barwienie siostrzanych chromatyd)
- SCE — sister chromatid exchange (wymiana siostrzanych chromatyd)
- SCR — sister chromatid reunion (łączenie siostrzanych chromatyd)
- q — ramię długie chromosomu
- p —; q — — znak minus po symbolu ramienia oznacza jego skrócenie, odwrotne znaczenie posiada znak plus
- cen — centromer
- ter — terminal (koniec chromosomu)
- dic — chromosom dwucentromeryczny
- psu dic — chromosom dwucentromeryczny, w którym jeden z centromerów uległ inaktywacji
- dup — duplikacja
- rep — reciprocal (wzajemny)
- del — delecja
- idic — izochromosom dwucentromeryczny
- i — izochromosom
- t — translokacja
- s — satelita
- strzałka → — do... do...
- (:) — miejsce złamania
- (: :) — miejsce złamania i połączenia chromosomu
- / — znak rozdzielający w zapisie kariotypu dwie linie komórkowe

Powszechne poczucie przynależności płciowej jest tak oczywiste, że często nie skłania do głębszej refleksji. Warto jednak pamiętać, że w starych przekazach rabinackich został wyrażony pogląd o hermafrodytyzmie Adama. Moment kreowania Adama przytaczany jest dwukrotnie: w Ks. Gen. 1 : 27 : „I stworzył Bóg człowieka na wyobrażenie swoje, na wyobrażenie Boże stworzył go; mężczyznę i białogłową stworzył ich” oraz w Ks. Gen. 2 : 21 : „Przypuścił tedy Pan Bóg twarde sen na Adama; a gdy zasnął, wyjął jedno żebro z niego,... I zbudował Pan Bóg z żebra, które wyjął z Adama, białogłową i przywiódł ją do Adama”. Wynikająca stąd pozorną sprzeczność może być wyjaśniona przez przetłumaczenie słowa hebrajskiego „zela” jako „żebro”, w rzeczywistości jednak należałoby słowo to tłumaczyć jako „bok”. Tak więc kreacja

Ewy wymagała nie tylko wyjęcia żebra Adama, ale również boku jego ciała [75].

Również współcześnie problem identyfikacji płci nie jest łatwy i jednoznacznie określony w praktyce zawodowej lekarza ginekologa, endokrynologa, psychiatry. Lekarz oceniając płęć powinien brać pod uwagę szereg kryteriów, a wśród nich na ważnym miejscu płęć chromosomalną oraz płęć chromatyny X i Y [30].

#### WYBÓR INFORMACJI O CHROMATYNIE X ORAZ CHROMOSOMIE X

Odkrycie chromatyny płciowej wyprzedziło niemal o ćwierć wieku opisy chromosomów płciowych. W roku 1937 Geitler zaobserwował dimorfizm płciowy grudek chromatyny przyjąderkowej [21, 22]. Prace te nie zostały zauważone. Dopiero w roku 1949 Barr i Bertram [5] w neuronach samicy kota opisali grudki chromatyny charakterystyczne dla płci żeńskiej. Odkrycie to zostało zauważone i przyniosło kolejne obserwacje [27, 38, 79], wykazujące, że jeden z dwóch chromosomów X kończy replikację DNA później niż autosomy oraz że liczba grudek chromatyny płciowej w diploidalnym jądrze komórkowym jest zgodna z liczbą chromosomów X późno replikujących DNA. Zależność ta opisywana jest regułą Harndena [33]:  $S = X - A/2$  (gdzie  $S$  jest liczbą spodziewanych grudek chromatyny X,  $X$  liczbą chromosomów X,  $A$  zaś liczbą zestawów chromosomów autosomalnych) bądź też według Browna i Chandry [7]:  $S = X - A^m$  (gdzie  $A^m$  jest liczbą zestawów chromosomów autosomalnych pochodzenia matczynego). Test chromatyny X znalazł szerokie zastosowanie w klinice zaburzeń cielesno-płciowych, ułatwiając wykrycie monosomii bądź polisomii X (por. [50]). Fakt, że heteropyknoza chromatyny przemawia za nieaktywnością genetyczną znany był od dawna [34], dlatego niemal jednocześnie Lyon [63], Russel [100], Beutler i wsp. [6], Morishima i wsp. [79] dokonują syntezy faktów przedstawiając hipotezy o nieaktywności jednego z dwóch chromosomów X. Ponieważ jednak M. Lyon pierwsza podała najpełniejsze uzasadnienie swego poglądu, hipoteza jej weszła do literatury światowej jako „hipoteza Lyon”.

Ważnym skutkiem genetycznej inaktywacji chromosomu X we wczesnym okresie rozwoju embrionalnego jest najczęściej zbliżony poziom produktów genów sprzężonych z chromosomem X u mężczyzn i u kobiet, pomimo obecności dwóch kopii genu u kobiety i jednej u mężczyzny. Inaktywacja ojcowskiego bądź matycznego chromosomu X ma charakter losowy, dotyczy wszystkich genów zlokalizowanych

w chromosomie X i jest procesem nieodwracalnym [64]. Te główne założenia oryginalnej wersji hipotezy były przez autorkę doskonalone w kolejnych pracach, by w ostatecznej wersji uzyskać szeroki wachlarz dowodów: 1. biochemicznych, 2. cytologicznych, 3. genetycznych.

#### MOLEKULARNE ASPEKTY HIPOTEZY LYON

Dogodnym modelem doświadczalnym pozwalającym potwierdzić inaktywację genów sprzężonych z chromosomem X (lyonizację) jest badanie jakościowe produktów genów heterozygotycznych nosicieli, np. hodowane fibroblasty skóry nosicieli elektroforetycznych wariantów A i B G-6-PD = oksydoreduktazy D-glukozy-6-fosforanu (EC.1.1.1.49) wykazują obecność dwóch typów prążków elektroforetycznych. Podobnie u nosicielki niedoboru enzymu HPRT = fosforybozylotransferaza IMP: pirofosforan (EC.2.4.2.8) prawidłowy klon komórkowy wbudowuje H<sup>3</sup>-hypoksantynę, podczas gdy zmutowany zdolności takiej nie posiada [65]. Wprowadzenie hybrydyzacji komórek ludzkich z komórkami gryzoni u nosicieli translokacji X/autosomy oraz zastosowanie eliminacji niepożądanego klonów przy użyciu selektywnych podłoży hodowlanych umożliwiło mapowanie chromosomu X znacznie wydajniejsze niż przy użyciu zasad genetyki mendelowskiej. Do roku 1982 podano przybliżone lokalizacje 42 loci genowych chromosomu X [107]. Znanych jest ponad 100 innych genów sprzężonych z chromosomem X (katalog McKusicka) [71], ale obecnie jest możliwa precyzyjna lokalizacja jedynie 16 genów [49], ze względu na niską częstość występowania genów sprzężonych w chromosomie X w populacji ludzkiej.

Lokalizacja locus genowego może być opisywana jako prowizoryczna (provisional assignment), tymczasowa (tentative assignment) bądź potwierdzona niezależnie przez dwóch lub więcej badaczy. Wymienione loci genowe należą do trzeciej grupy. W regionie terminalnym Xp zlokalizowane są następujące geny: XG = Xg<sup>a</sup> antygen grupy krwi (pter → p22.2) [17], STS = sulfataza sterolowa EC.3.1.6.2. (pter → p22.3) [120], HYB = gen regulator antygeny H-Y (pter → p22.3) [128]. Wszystkie wymienione geny zlokalizowane w ramieniu Xp unikają lyonizacji. Znany jest jeden locus genowy odpowiedzialny za dystrofię mięśni dziecięcą postępującą typu Duchenne'a A (DMD), zlokalizowany w prążku Xp21, który podlega lyonizacji [41]. Wszystkie dotychczas zlokalizowane loci genowe ramion długich chromosomu X podlegają lyonizacji. Są to, opisując od centromeru w kierunku Xqter, PGK = kinaza fosfoglicerynowa EC.2.7.2.3. (q13), GLA (alfaGAL) = galaktozydaza EC.3.2.1.22 (q21 → q24) PRPS = syntetaza fosforybozylo-pirofosforanowa EC.2.7.6.1. (q21 → q27), HPRT = fosforybozylotransferaza hipoksantynowa E.C.2.4.



2.8. (q26 → q28), G-6PD = oksydoreduktaza D-glukozy-6-fosforanu E.C. 1.1.1.49 (q28), CB = nierozróżnianie barw rzędu protanowego, HEM<sub>A</sub> = = hemofilia A [52, 107]. W ramieniu Xq lokalizuje się również gen SAX = antygen powierzchniowy oraz gen TATR = gen regulator aminotransferazy tyrozyny [71]. W prążku Xq27 lokalizuje się również specjalnego typu przewężenie wtórne chromosomu X „fragile site”, które można ujawnić hodując komórki na podłożu zubożonym w kwas foliowy i tymidynę [114]. Mężczyźni, nosiciele „fragile X”, mogą być zdrowi psychicznie, ale obarczeni są bardzo wysokim ryzykiem wystąpienia specjalnego typu upośledzenia umysłowego.

Nieomal od początku istnienia teorii inaktywacji chromosomu X formułowano hipotezy tłumaczące molekularne mechanizmy tego procesu. Najwcześniejszą hipotezę przedstawił Grumbach i wsp. [29]. Teoria ta zakładała istnienie episomalnego aktywatora, wbudowującego się do specyficznego receptora w chromosomie X, co miało prowadzić do aktywacji chromosomu X oraz jednoczesnej inaktywacji innych, niezwiązanych episomalnych czynników obecnych w komórce. Słabość tej hipotezy polega na tym, że istnienie episomów jest udokumentowane u bakterii, natomiast kwestionowane jest u roślin i zwierząt. Kolejna hipoteza zaproponowana przez Lyon [65] oraz Ohno [84] opiera się na specyficznym wiązaniu DNA z białkami niehistonowymi. Białka posiadałyby wybiórczą zdolność aktywacji pewnych regionów chromatyny, w tym również centrum inaktywacji chromosomu X. Zaletą tego modelu jest możliwość uogólnienia procesu i wyjaśnienia regulacji aktywności większości genów w procesie różnicowania. Słabość jej polega na tym, że cykl replikacyjny DNA wywoływałby częste kryzysy inaktywacji prowadzące do delyonizacji genów. Podczas replikacji bowiem, DNA zostaje odseparowany („swept off”) od niehistonowych białek chromosomalnych [92]. Teoria Browna i Chandry [7] zakłada, że w procesie ewolucji centrum decyzyjne inaktywacji zmieniło lokalizację. U torbaczy jest ono zlokalizowane w chromosomie X ojcowskim i ten chromosom ulega inaktywacji (nie podporządkowując się losowości procesu), u ssaków łożyskowych centrum decyzyjne zostało przeniesione na autosomy i jest matczyne pochodzenia. Stąd autorzy sugerują, że liczba aktywnych chromosomów X odpowiada liczbie autosomalnych zestawów chromosomów pochodzenia matczyne. Hipoteza ta lepiej tłumaczy liczbę późno replikujących chromosomów X w przypadkach triploidii 69,XXY i 69,XXX [42, 125] niż reguła Harndena [33]. Badania Jacobs i wsp. [42] tylko pośrednio podtrzymują powyższy pogląd wykazując, że ojcowskie pochodzenie chromosomu X w przypadkach triploidii nie ma wpływu na wzór replikacji chromosomu X oraz inaktywację tego chromosomu.

Jeżeli jednak wartość hipotezy naukowej można oceniać na podstawie stymulującego wpływu na rozwój badań eksperymentalnych, to za wybitną należy uznać teorię Riggs'a [92]. Tłumaczy ona inaktywację chromosomu X procesem metylacji DNA. Autor przypisuje procesowi metylacji funkcję regulacyjną, która może prowadzić do selektywnej inaktywacji chromosomu X. Ta szczególna właściwość procesu jest możliwa dzięki: 1. wysokiej specyficzności rozpoznawania sekwencji DNA, 2. powolnej metylacji cząstek DNA niezmetylowanych, 3. szybkiej metylacji cząstek, które uległy metylacji w jednej nici DNA. Proponowany model, zdaniem autora, zapewnia: 1. stałość inaktywacji chromosomu X ssaków wyższych, 2. „ojcowski” typ inaktywacji u torbaczy, 3. „zrównoważoną” inaktywację chromosomu X w aneuploidii i poliploidii, co ma być związane z proporcjonalną liczbą autosomalnych genów sterujących metylazą DNA (w tym miejscu można dostrzec słabość hipotezy, bo nie tłumaczy ona „nieproporcjonalnej” inaktywacji chromosomu X w przypadkach triploidii), 4. proces metylacji zapewnia odwracalność inaktywacji w trakcie oogenezy, spermatogenezy oraz szybkich cykli replikacyjnych DNA, które następują po zapłodnieniu. Proponowany model nie wyjaśnia kompletności inaktywacji oraz faktu przekazywania inaktywacji, np. w przypadkach translokacji X/autosomy. Po przyjęciu hipotezy o specyficznej metylacji DNA, jako mechanizmu regulującego inaktywację chromosomu X, należało się spodziewać, że reaktywacja genów chromosomu X pod wpływem analogu blokującego metylację będzie możliwa. Znane były fakty spontanicznej reaktywacji genu HPRT w hybrydach fibroblastów kobiety z komórkami mysimi [35, 45], jednak dopiero model doświadczalny zaproponowany przez Jones'a i wsp. [44] stworzył warunki dla kontrolowanej, wydajnej reaktywacji nieaktywnego chromosomu X. Autorzy uzyskali hybrydę: komórka mysia/fibroblast kobiety z jednym, prawidłowym, nieaktywnym chromosomem X. Po wprowadzeniu do medium hodowlanego 5-aza-2'-deoksytydyny, analogu 5-metylocytozyny, uzyskali indukcję ekspresji HPRT. Pełny efekt reekspresji HPRT pojawia się, gdy hodowane komórki przejdą dwa cykle komórkowe od chwili dodania 5-Aza-dCyd, co pozwala na wydajną demetylację specyficznych sekwencji DNA. Proces ten okazał się wydajniejszy w drugiej połowie fazy S, co sugeruje, że elementy kontrolujące supresję tego procesu replikują właśnie w tym okresie. Mohandas i wsp. [76] obok aktywacji genu HPRT uzyskali reekspresję genu G-6-PD oraz PGK. Jednak reaktywizacja dwóch ostatnich genów nie zawsze występowała w tych samych klonach komórkowych, w których dochodziło do reaktywacji genu HPRT. Na tej podstawie autor sądzi, że inaktywacja i reaktywacja heterochromatycznego chromosomu X realizuje się w niezależnie regulowanych segmentach chromo-

somalnych. Warto w tym miejscu przypomnieć, że wszystkie trzy wymienione geny zlokalizowane są w ramionach Xq. W kolejnym eksperymencie [77] wyizolowano hybrydę komórkową, która zawierała obok komplementu chromosomów mysich, translokację der (13) (13 pter → 13q12 :: Xp22 → pter). Jak wiadomo prążek 13q14 zawiera locus genowy dla esteraazy D (ESD). W przypadkach zrównoważonych translokacji X/autosomy, najczęściej prawidłowy X jest późno replikującym. W jednym z klonów autorzy uzyskali hybrydę komórkową, która obok normalnego aktywnego chromosomu X zawierała 13,0% komórek z der(X). Pasaż w medium zawierającym 8-azaguaninę wyeliminował komórki posiadające aktywny gen HPRT<sup>+</sup>, jednak odsetek komórek z der(X) był zbyt niski, aby produkt genu mógł być zbadany elektroforetycznie. Autorzy zreaktywowali loci genu HPRT stosując 5-aza-2'-deoksytydynę i pasażowali klon przez selektywne medium HAT. W efekcie uzyskali hybrydę zawierającą w każdej komórce klonu nieaktywny der(X). Porównując ekspresję genów ESD, G-6-PD, PGK oraz HPRT w uzyskanej hybrydzie zawierającej nieaktywny der(X) z hybrydą zawierającą aktywny der(X) jako kontrolę, autorzy, jak sędzę po raz pierwszy, uzyskali molekularny dowód inaktywacji autosomalnego fragmentu, który uległ translokacji na nieaktywny chromosom X. Wydaje się, że opracowana technologia otwiera drogę do efektywnego mapowania genomu człowieka.

Wykazano dalej, że proces reaktywacji genu HPRT jest swoisty gatunkowo [12]. Stało się to możliwe dzięki zastosowaniu dwóch heterozygotycznych subpopulacji DNA: HPRT<sup>+</sup> i HPRT<sup>-</sup> dla transformacji hodowanych fibroblastów mysich obarczonych deficytem HPRT. Okazało się, że komórki gryzonia nie posiadają sygnału uruchamiającego Lyonizację ludzkiego genu dla HPRT.

Jak już wspomniano, znane są technologie umożliwiające uzyskanie hybryd komórki gryzoni/fibroblasty ludzkie, które — dzięki selekcyonującym pasażom w podłożach HAT/8-azaguanina — pozwalają na „wzbogacenie” zhybrydyzowanego klonu w liczbę komórek zawierających aktywny bądź nieaktywny chromosom X. Jednocześnie niezwykle rozwój technik rekombinacji i klonowania DNA, który miał miejsce w ostatnim dziesięcioleciu, pozwolił na opracowanie kompletnej kolekcji segmentów DNA ludzkiego genomu [107]. Połączenie obu wymienionych technologii było jedną z dróg, które pozwoliły na lokalizację charakterystycznych segmentów DNA w poszczególnych chromosomach. W ludzkim chromosomie X zlokalizowano następujące segmenty: DXS1 — X/pter → q1, DXS2 — X/pter → q1; DXS3 — X/q1 → q21; DXS4 — X/q21 → q24; DXS5 — X/q21 → q24; DXS6 — X/q2 → qter/; DXS7 — ?; DXS8 — Xp; DXZ1 — X (q23 → q25) [108]. Przyjęty trzyliterowy kod

oznacza: D — DNA, druga litera oznacza numer chromosomu, S — unikalność sekwencji segmentu, Z — powtarzalność sekwencji segmentu.

Schmeckpeper i wsp. [103], klonując kolekcję ludzkiego DNA na  $\lambda$  wektorze Charon 4A, porównali metodą radioizotopowego skriningu homologię DNA rekombinantów hybryd komórkowych zawierających pojedynczy ludzki autosom, ludzki chromosom X z DNA gospodarza — komórki mysiej. Do dalszych badań wybrano rekombinanty o wysokiej homologii do DNA hybrydy. Wykazano dalej, że trzy rekombinanty były wysoce homologiczne z powtarzalnymi sekwencjami DNA chromosomu X, ale jednocześnie charakteryzowały się homologią z powtarzalnymi sekwencjami autosomów.

Wybór dotychczas przedstawionych informacji o molekularnych aspektach hipotezy Lyon, pozwala zauważyć:

1. Większość znanych loci genowych chromosomu X podlega lioni-zacji, jakkolwiek znane są trzy wyjątki.
2. Inaktywacja i eksperymentalna reaktywacja chromosomu X może przebiegać niezależnie, w różnych regionach chromosomu.
3. Brak jest dowodów na to, że chromosom X posiada szczególną, odmienną od autosomów konstrukcję powtarzalnych sekwencji DNA.

#### CYTOLOGICZNE CECHY INAKTYWACJI CHROMOSOMU X

Najłatwiej sprawdzalnym cytologicznym objawem inaktywacji jednego z dwóch chromosomów płciowych X jest heteropyknoza tego chromosomu dająca się obserwować w okresie międzypodziałowym komórki. Barr i Bertram obserwowali heterochromatyczne grudki w blisko 95,0% neuronów kotek. U mężczyzny z mozaikowym kariotypem 47,XXY/48,XXXY Kałużewski i wsp. [51] odnotowali niższe odsetki komórek chromatyno dodatnich (20,5%) w zwojach pnia współczulnego w porównaniu z odsetkiem komórek chromatyno dodatnich w nabłonku jamy ustnej (29,8%) oraz w naskórku (39,0%). Odsetki chromatyny płciowej (chromatyny X) w nabłonku jamy ustnej zdrowych kobiet różnią się w publikacjach pochodzących z różnych laboratoriów. Romer za prawidłowe przyjmuje wartości 20-60% [96]. Autor za normę przyjmuje wartości 15-30% [48]. Tak niskie wartości normy spowodowane są najprawdopodobniej konsekwentnym stosowaniem selekcji jąder komórkowych [38] oraz selekcją grudek chromatyny X [94].

Różnice międzygatunkowe oraz międzytkankowe w odsetku jąder chromatyno dodatnich zachęcały do poszukiwania zależności pomiędzy fazą cyklu życiowego komórki a stopniem heteropyknozy chromosomu X. Miles [73] stwierdził w hodowli komórek owodni żeńskich płodów

zależność odwrotnie proporcjonalną pomiędzy częstością chromatyny X a indeksem mitotycznym. Therkelsen i Petersen [16] stwierdzili występowanie chromatyny X z częstością 60% w logarytmicznej fazie wzrostu hodowli żeńskich fibroblastów i 100% w fazie postlogarytmicznej. Hösl i James [37] i James [43] obserwowali dimorfizm chromatyny X zależny od fazy cyklu życiowego komórki. Z drugiej jednak strony badania Comingsa [11], Klingera i wsp. [56] wskazują, że chromatyna X może replikować DNA w stanie pełnej spiralizacji oraz że odsetek komórek chromatyno dodatnich i chromatyno ujemnych nie zależy od cyklu życiowego komórki. Miles i O'Neil [74], posługując się techniką kontrastu fazowego i aparaturą do ciągłego filmowania hodowanych fibroblastów wykazali, że chromatyna X w stanie spiralizacji może być obecna w fazie G<sub>1</sub>, S oraz G<sub>2</sub>. Autorzy przeprowadzili również bezpośrednią obserwację podtrzymującą wcześniejsze sugestie, że chromatyna X reprezentuje tylko fragment chromosomu X.

Przytoczone, często sprzeczne, wyniki badań znalazły częściowe wyjaśnienie w pracy Backa [3]. Autor, posługując się autoradiograficzną techniką podwójnego piętnowania komórek tymidyną H<sup>3</sup> i C<sup>14</sup>, wykazał, że chromatyna X może być widoczna bezpośrednio po zakończeniu mitozy jako wyraz opóźnionej dekondensacji chromosomu X, natomiast w komórkach o dostatecznie długim cyklu życiowym może być obserwowana ponownie przed wejściem komórki w stadium podziału. Niezależnie od ujawnienia się chromatyny X przed i po stadium podziału, chromatyna X może być obserwowana również w fazie międzypodziałowej. Pierwszy typ heterochromatyny autor nazwał chromatyną płciową mitotyczną, zależną od cyklu życiowego komórki; drugi typ heterochromatyny — międzypodziałową, niezależną od cyklu życiowego. W cyklu życiowym każdej komórki występuje krótszy bądź dłuższy okres, w którym chromatyny X nie obserwuje się. Porównując dane z piśmiennictwa dotyczące delecji Xp i Xq oraz odnosząc je do własnych obserwacji „in vitro” w mikroskopie fazowo-kontrastowym, Back zauważył również, że najprawdopodobniej chromatynę X tworzą długie ramiona chromosomu X, natomiast ramiona Xp pozostają euchromatyczne podczas interfazy. Pogląd ten dodatkowo podtrzymywała obserwacja, że blisko 10% komórek piętnowanych pod koniec okresu S nie posiadało piętna izotopowego ponad ramionami Xp.

Obserwowano obniżenie odsetka chromatyny X pod wpływem kortykosterydów [66, 105], metylandrostendionu [97], antybiotyków [111]. W badaniach sekwencyjnych przeprowadzonych na 564 kobietach w różnych porach roku stwierdzono znaczny spadek chromatyny X w styczniu i lutym oraz podwyższenie w czerwcu i lipcu [95]. Wyraźne obniżenie odsetka chromatyny X obserwowano u kobiet w wieku starczym

[127]. Obserwowano ewolucję odsetka chromatyny X w cyklu menstruacyjnym zdrowych kobiet, korelując spadek z podwyższeniem poziomu G-6-PD [1]. Chakravarty i wsp. [9] potwierdzili ewolucję odsetka chromatyny X w cyklu menstruacyjnym, zaobserwowali ponadto obniżenie odsetka po doustnym podaniu środków antykoncepcyjnych oraz w ciąży. Sugerowano pozytywną zależność pomiędzy aktywacją chromosomu X, obniżeniem odsetka chromatyny X a zwiększeniem liczby receptorów estrogenowych w raku piersi u kobiet [110]. Jednak świadomość wieloletnich wysiłków wielu renomowanych zespołów badawczych oraz precyzyjne określenie eksperymentalnych warunków indukcji aktywacji chromosomu X stanowi zachętę do ostrożności w przyjmowaniu informacji o aktywacji chromosomu X w omówionych okolicznościach.

Nieobecność chromatyny X bądź wyraźne obniżenie odsetka w tkankach raka sutka zostało wielokrotnie potwierdzone [78, 90, 98, 115]. Jedyną znaczącą próbą porównania heteropyknozy chromatyny X ze wzorem replikacji chromosomów X w raku sutka są badania Camargi i Wanga [8]. Autorzy ci wykazali nieobecność chromatyny X w hodowanych komórkach raka sutka Elco oraz potwierdzili obecność dwóch wcześnie replikujących (genetycznie aktywnych) chromosomów X w tej niemal triploidalnej linii komórkowej (liczba modalna chromosomów 65). Autorzy tłumaczą to selekcją komórkową, która doprowadziła do wyeliminowania linii z późno replikującym chromosomem X na drodze non-disjunkcji oraz błędnej segregacji chromatydowej, bądź reduplikacji aktywnego chromosomu X. Możliwość podobnej selekcji została wyraźnie potwierdzona w badaniach nad replikacją chromosomów X w triploidii 69,XXY oraz 69,XXX [42]. Niejednoznaczne staje się wyjaśnienie zrównoważenia genetycznego komórki w przypadku 47,X,del(X) (q22), + + del(X) (q22) [122]. W nabytej aberracji wykrytej w szpiku chorego ze zwłóknieniem i mieloidalną metaplastją prawidłowy X wykazywał późną replikację, a dwa nieprawidłowe del(X) były wcześnie replikującymi. Badania nad replikacją DNA chromosomów płciowych X w komórce nowotworowej są w początkowej fazie i nie mogą upoważniać do zbyt szerokich uogólnień, jednak wydaje się interesujące, że diploidalna komórka obarczona dwoma chromosomami del(X) (q22) jest zdolna do kolejnych podziałów komórkowych, a hipotetyczne centrum inaktywacji zlokalizowane w regionie Xq112 → Xq211 [69], będąc obecne i strukturalnie nienaruszone, nie jest w stanie doprowadzić do inaktywacji (późnej replikacji) jednego z dwóch nieprawidłowych chromosomów X.

Podsumowując informacje o heterochromatynizacji chromosomu X jako wyrazie inaktywacji genetycznej, można zauważyć:

1. Istnieją różnice międzygatunkowe, międzyosobnicze i międzytkankowe występowania chromatyny płciowej X.

2. Heterochromatyczny chromosom X w cyklu życiowym każdej komórki przechodzi stadium, w którym nie jest obserwowany jako chromatyna X. Wydaje się, że ramiona długie chromosomu X w większym stopniu zaangażowane są w formowanie chromatyny X niż ramiona Xp.

3. Szereg czynników środowiskowych oraz endogennych może mieć wpływ na zmiany odsetka chromatyny X. Dokładny mechanizm tego procesu czeka na swoje rozwiązanie.

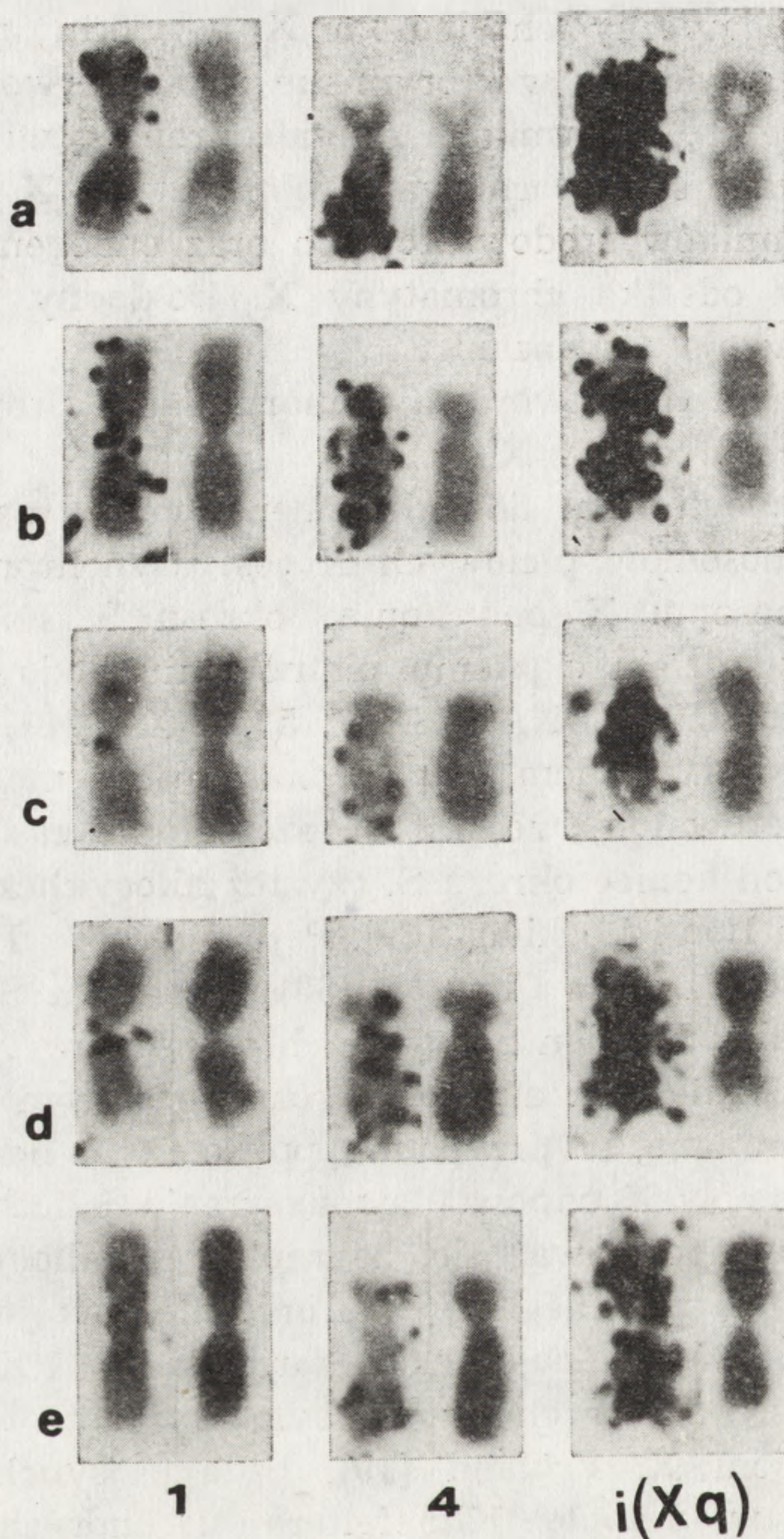
4. Transformacja nowotworowa komórki może prowadzić do zaburzeń inaktywacji chromosomu X.

Kolejnym cytologicznym dowodem genetycznej inaktywacji jednego z dwóch chromosomów płciowych X jest asynchroniczna replikacja DNA heterochromosomu X pod koniec okresu S. Fakt ten ustalono blisko 20 lat temu, dzięki ciągłemu piętnowaniu hodowanych komórek znakowanym prekursorem DNA [23, 27, 53, 54, 79, 81, 104]. Przez pewien czas otwarty był problem, czy chromosom ten można nazwać „gorącym X”, co sugerowałoby, że jest on szczególnie zasobny w radioaktywną tymidynę pod koniec okresu S, czy też allocykliczny. Problem ten rozwiązały badania Hsu i Lockhart [39], Petersena [87], Priest i wsp. [89], Comingsa [11], Ockey i de la Chapelle [83], Steffena i Stolzmann [112]. Badacze ci wykazali, że jeden z dwóch chromosomów X nie tylko późno kończy, ale i później niż autosomy rozpoczyna syntezę DNA.

Jak już wspomniano, w przypadku polisomii X liczba późno replikujących chromosomów X odpowiada maksymalnej liczbie grudek chromatyny. Należałoby spodziewać się, że replikacja allocyklicznych chromosomów X powinna przebiegać synchronicznie, tak jednak często nie dzieje się. Gianelli [25] u pacjentek z kariotypem 47,XXX obserwował około 5% komórek, w których można było wyróżnić tylko jeden allocykliczny chromosom X. Fröland [19], badając synchronię replikacji chromosomów X w zespole Klinefeltera u chorych z kariotypem 48,XXXY oraz 49,XXXXXY, wykazał asynchroniczną replikację w jednej komórce, dwóch w pierwszym i trzech w drugim przypadku allocyklicznych chromosomów X. Podobnych obserwacji dokonano u chorych z mozaikowością 48,XXXX/49,XXXXX [91] oraz u chorego z zespołem Klinefeltera 47,XXY/48,XXXY [51].

Wykazano, że ramiona izochromosomu Xq replikują DNA allocyklicznie i symetrycznie [2, 26, 80].

W przypadku delecji ramion krótkich chromosomu X [81] stwierdzono, że chromosom ten we wszystkich badanych płytkach metafazalnych późno replikował DNA. Podobnych obserwacji dokonano w przypadkach delecji ramion krótkich bądź długich chromosomu X [26]. Jedynie w nielicznych płytkach metafazalnych od dwóch chorych z delecją Xq — autor zaobserwował ponad ramionami Xp brak piętna bądź piętno w postaci kilku ziaren.



Ryc. 1. Przy użyciu techniki autoradiografii  $H^3$ -TdR zbadano kinetykę terminacji replikacji DNA izochromosomu X, chromosomu 1 i 4 w przypadku dysgonadizmu gonad 45,X/46,X,i(Xq). Uwagę zwraca w przybliżeniu symetryczne rozmieszczenie piętna izotopowego ponad ramionami izochromosomu. W płytce metafazalnej — c większość ziaren piętna izotopowego znajduje się w okolicy proksymalnej, w płytkach — d i e raczej w regionie terminalnym izochromosomu X. Patrz również ryciny 2, 4, 5 i 6

Chromosom X w formie pierścienia najczęściej replikuje DNA późno [10, 62, 99]. Jednak intensywność piętna ponad allocyklicznym chromosomem X w formie pierścienia jest różna. Zdarza się, że chromosom ten kończy syntezę DNA wraz z autosomami [10, 113]; w konsekwencji autorzy sformułowali hipotezę, że proces heterochromatyzacji allocyklicznego chromosomu X koordynowany jest przez kilka centrów.



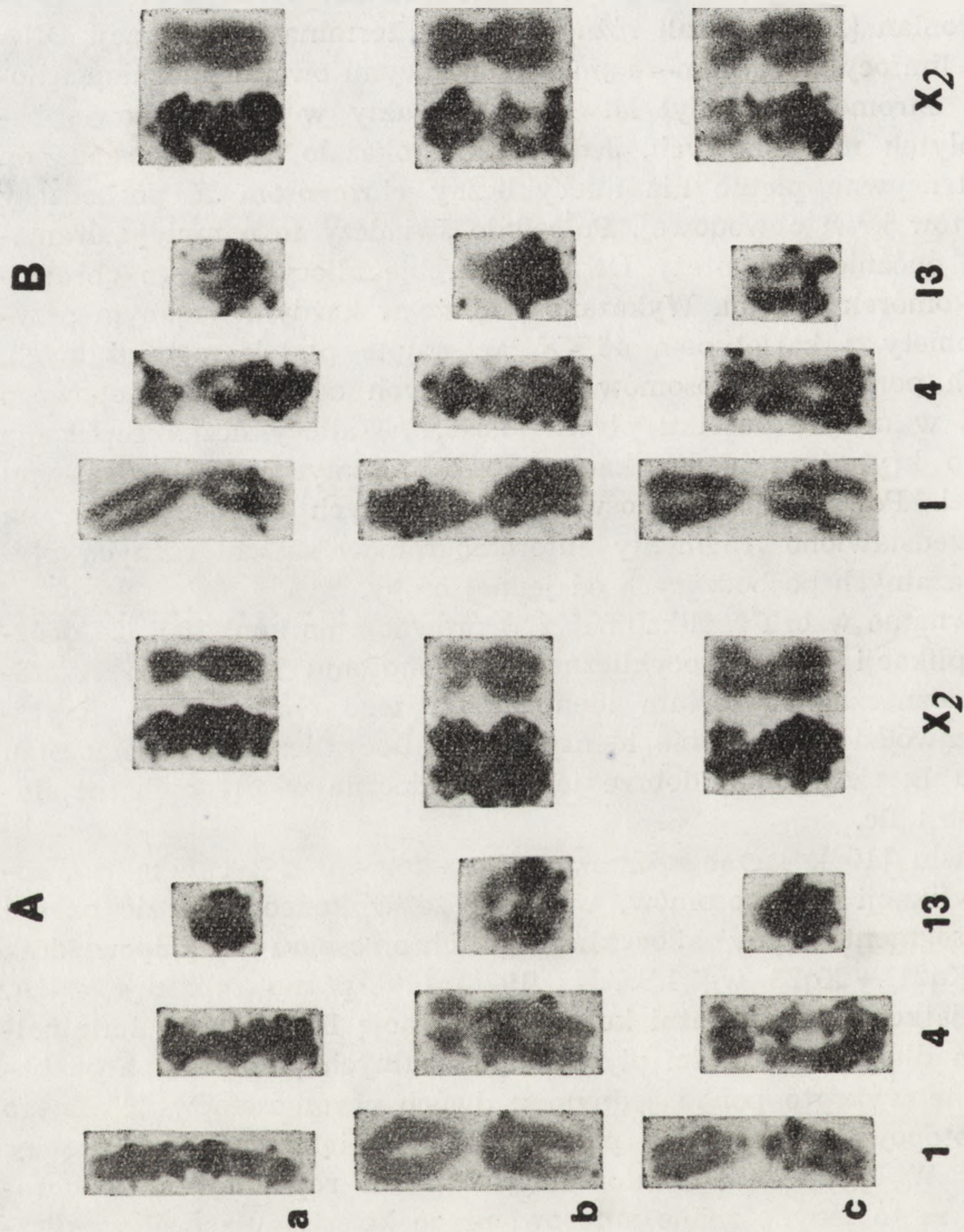
Utrata jednego bądź większej liczby centrów na skutek aberracji strukturalnej może zmienić wzór allocyklicznej replikacji (heterochromatyzacji) [113].

Na różnice w replikacji DNA chromosomów pochodzących z różnych tkanek zwrócili uwagę Slezinger i Prokofieva-Belgovskaya [109]. German i Aronian [24] wykazali różny przebieg terminacji replikacji DNA pomiędzy limfocytami i komórkami nabłonkowymi owodni ludzkiej. Allocykliczny chromosom X był łatwo wykrywalny w około połowie badanych płytek nabłonkowych. Jednocześnie okazało się, że posiada on mniej intensywne piętno niż allocykliczny chromosom X pochodzący z limfocytów krwi obwodowej. Pośrednio świadczy to o mniej „dramatycznym” opóźnieniu syntezy DNA w obrębie allocyklicznego chromosomu X komórek owodni. Wykazano [46], że w każdym badanym przypadku kobiety z kariotypem 46,XX, w grupie płytek metafazalnych, w których ponad 15 autosomów było wolnych od piętna izotopowego (grupa I), w małym odsetku płytek (4,5-6,4%) allocykliczna replikacja DNA jako kryterium identyfikacji heterochromatycznego chromosomu X zawodzi. Powracając do doświadczeń własnych sprzed 10 lat, na ryc. 2 przedstawiono fragmenty autoradiogramów sześciu różnych płytek metafazalnych pochodzących od jednej osoby.

Porównanie wzoru replikacji A z B prowadzi do konkluzji, że opóźnienie replikacji DNA allocyklicznego chromosomu X szeregu A stanowi jednoznaczne kryterium identyfikacji tego chromosomu. Kryterium to zawodzi przy próbie identyfikacji allocyklicznego chromosomu X szeregu B; szczególnie dobrze jest to widoczne w płytkach metafazalnych Bb i Bc.

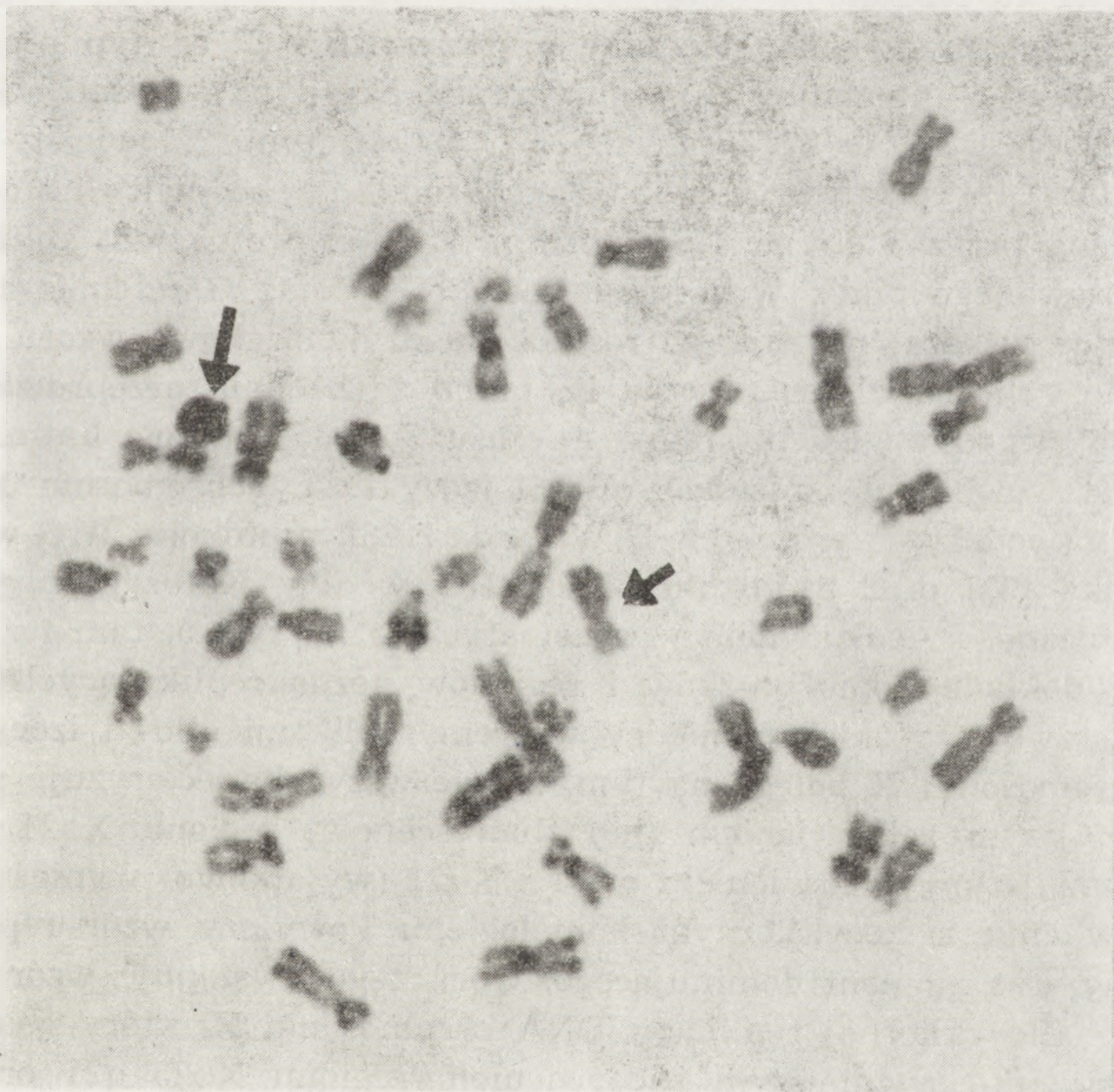
Shiraishi [106], łącząc technikę autoradiografii z techniką prążkową identyfikacji chromosomów, wykazał, że w końcowej fazie okresu S tylko segment dalszy allocyklicznego chromosomu X (odpowiednik regionu Xq21 → Xq23 wg I.S.C.N., 1978) [40] późną replikuje DNA. Tylko wyjątkowo jako ostatni kończył replikację DNA region terminalny ramion długich. W części płytek metafazalnych (4 płytki na 56 badanych) nie wykryto ponad jednym z dwóch chromosomów X silnego piętna izotopowego, mimo że płytki te były piętnowane pod koniec okresu S. W epoce badań autoradiograficznych replikacji DNA chromosomów są to jedyne znane autorowi prace kwestionujące allocykliczną replikację DNA chromosomu X jako bezwzględne kryterium identyfikacji tego chromosomu.

Przełomowym momentem w badaniach nad replikacją DNA chromosomów płciowych było wprowadzenie techniki wykorzystującej właściwości 5-bromodezoksyurydyny (BrdU). BrdU, jako analog tymidyny, stosowana była do ujawniania przewężeń wtórnych chromosomów [85].



Ryc. 2. Przy użyciu techniki autoradiografii  $H^3$ -TdR porównano kinetykę terminacji replikacji DNA, allocyklicznego chromosomem  $X_2$ ) stanowi jednoznaczne kryterium identyfikacji heterochromosomu X. W szeregu B prezentowanych fragmentów somu X oraz chromosomów 1, 4 i 13. W szeregu A allocykliczność replikacji (wyraźnie większe piętno izotopowe ponad chromosomem  $X_2$ ) stanowi jednoznaczne kryterium identyfikacji heterochromosomu X. W szeregu B prezentowanych fragmentów somu X oraz chromosomów 1, 4 i 13. W szeregu A allocykliczność replikacji (wyraźnie większe piętno izotopowe ponad chromosomem  $X_2$ ) stanowi jednoznaczne kryterium identyfikacji heterochromosomu X. Szczegóły w tekście

Zakharov [132, 133] wykazał, że związek ten posiada właściwość despiralizacji specyficznych regionów chromatyny. Okazało się, że regionami szczególnie wrażliwymi na despiralizację są okolice wtórnych przewężeń oraz tych prążków G i Q, które dokonują replikacji DNA stosunkowo późno w fazie S. Baranovskaya i wsp. [4], wbudowując BrdU przez ostatnie 5-6 godzin krótkotrwałej hodowli limfocytów krwi obwodowej, ujawnili różnice we wzorze prążkowym (prążków R), które pozwoliły zidentyfikować allo- i izocykliczny chromosom X. Latt [57, 58] wykazał, że barwnik 33258 Hoechst, pochodna bisbenzimidazolu, kompleksując z łańcuchami polinukleotydów poli(dA-BrdU), słabiej fluoryzuje niż po skompleksowaniu z poli(dA-dT). W szeregu dobrze udokumentowanych prac [57-59] określono precyzyjne warunki, w jakich wygaszanie fluorescencji jest najwydajniejsze. Perry i Wolf [86] wyeliminowali mikroskop fluorescencyjny jako narzędzie do obserwacji chromosomów z wbudowanym BrdU, uzyskując trwałe preparaty barwione barwnikiem Giemsy. Od tego momentu szczegóły techniczne metody uległy



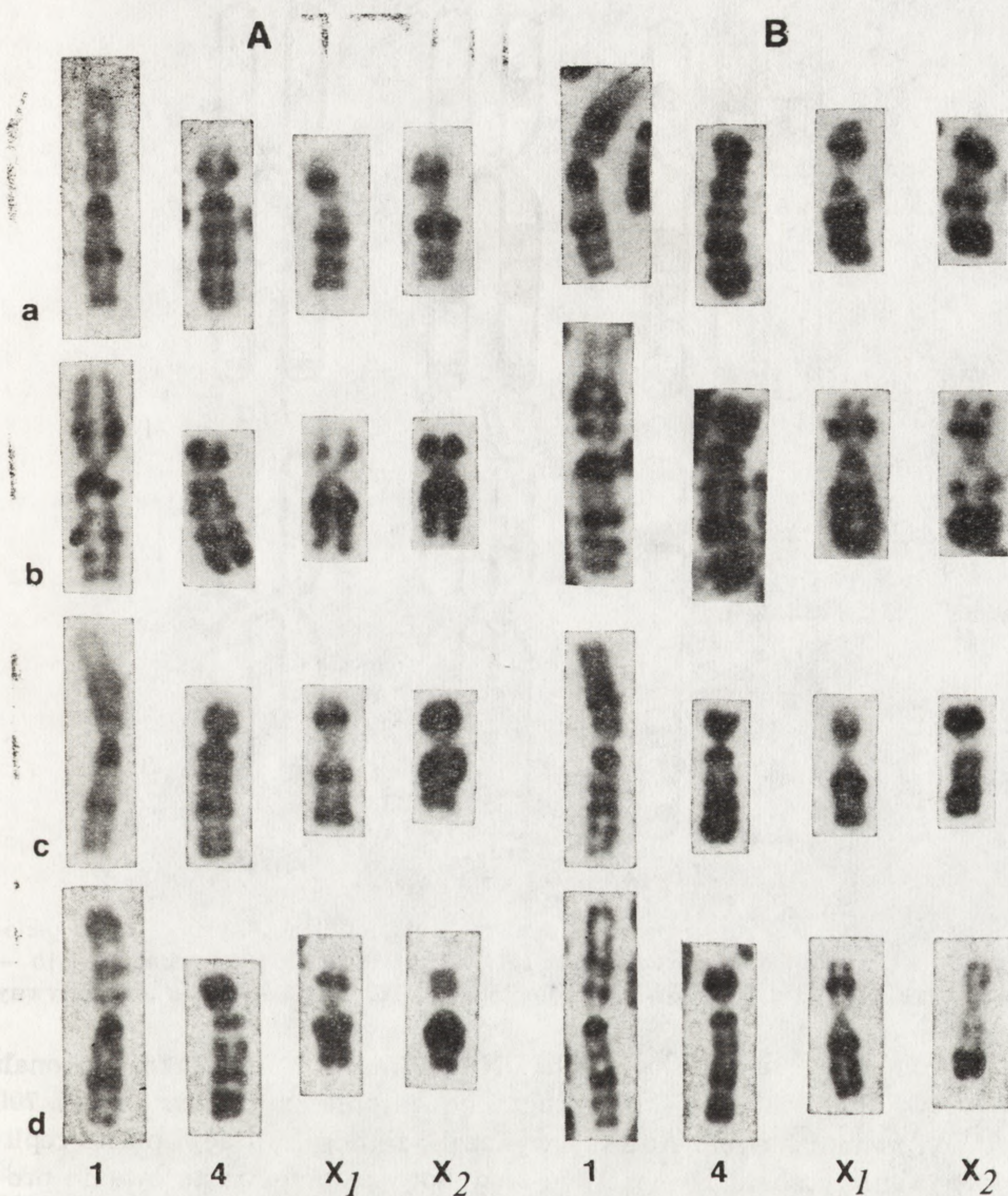
Ryc. 3. Efekt cytologiczny zróżnicowanego barwienia BHG. Dłuższa strzałka wskazuje allocykliczny chromosom X. Strzałka krótsza wskazuje izocykliczny chromosom X

licznym modyfikacjom, ale stale były oparte na schemacie: wbudowanie BrdU → barwienie (33258 Hoechst, oranż akrydyny, tionina itp.) → ekspozycja na światło bogate w promieniowanie UV → inkubacja w SCC → barwienie barwnikiem Giemsy. Willard i Latt [126] zmodyfikowali proces wbudowania BrdU, wprowadzając tzw. protokół T, polegający na wyeliminowaniu w odpowiednim momencie z podłoża hodowlanego BrdU i zastąpieniu przez egzogenną tymidynę. Udoskonalenie to miało zalety, bowiem znacznie redukowało niepożądaną dekondensację chromosomów, występującą przy stosowaniu protokołu B (prążki R).

Grzeschik i wsp. [31], posługując się opisaną techniką, opisali wzór replikacji DNA każdej pary ludzkiego kariotypu, uwzględniając chromosomy płciowe. Wykazano, że allocykliczny chromosom X może replikować DNA w dwojaki sposób. Niemal jednocześnie podobnych obserwacji w odniesieniu do chromosomów X dokonali Willard i Latt [126]. Kim [55], posługując się protokołem B (prążki R), opisał inicjację replikacji DNA chromosomów człowieka. Dutrillaux i wsp. [15], wykorzystując opisaną przez siebie technikę prążków RBA (R — typ prążków; B — BrdU; A — technika barwienia, oranż akrydyny), opisali sekwencję replikacji DNA w 277 prążkach R i Q kariotypu człowieka. Kałużewski [47, 49] połączył technikę synchronizacji hodowli limfocytów opracowaną przez Steffena i Stolzmann [112] z protokołem zbliżonym do zastosowanego przez Willarda i Latta [126] oraz Grzeschika i wsp. [31]. Autor wskazał na znaczne różnice międzykomórkowe wzoru replikacji allocyklicznego chromosomu X, mimo że badania przeprowadzono w jednolitej pod względem średniego czasu S + G<sub>2</sub> kohorcie limfocytów.

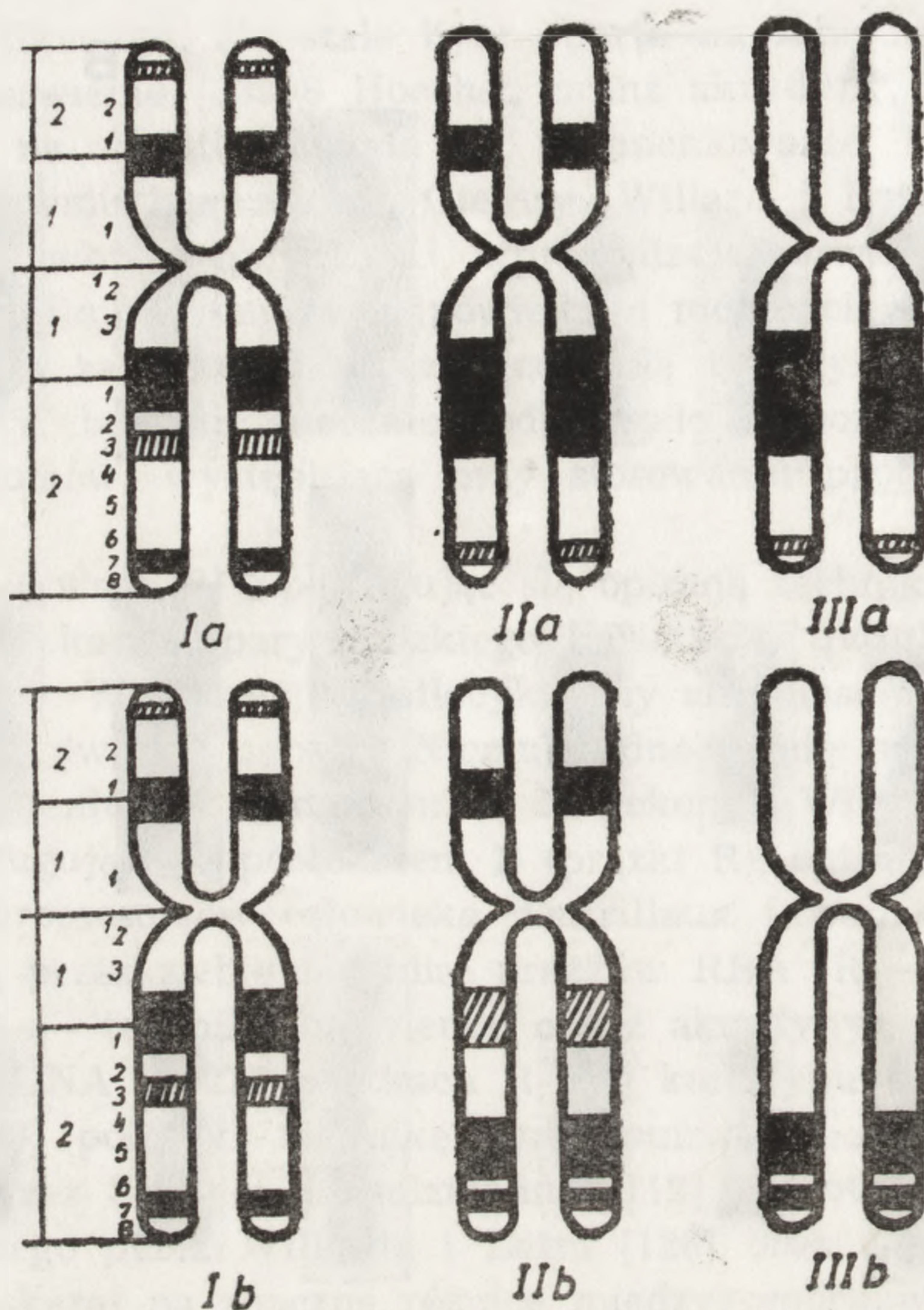
Podstawowe cechy różniące allo- i izocykliczny chromosom X opisywane na podstawie protokołu T. Willarda [126], protokołu BHG według Grzeschika [31] oraz protokołu MTX-BHG według Kałużewskiego [47, 49] są zbieżne. Przedstawiono je schematycznie na ryc. 5, tam też znajduje się dokładny opis prążków i regionów późno replikujących DNA.

Podstawowa różnica pomiędzy wzorem replikacji allo- i izocyklicznego chromosomu X polega na tym, że pierwszy charakteryzuje się intensywniejszym zabarwieniem (lub fluorescencją) regionu Xq21 Xq23, intensywniejszym zabarwieniem prążka Xq21 (wyjątkowo również Xp22) w porównaniu z izocyklicznym homologiem. Powyższy wzór replikacji określany jest mianem dominującego. Obok tego występuje wzór alternatywny allocyklicznej replikacji DNA chromosomu X, który charakteryzuje się intensywniejszym zabarwieniem regionu Xp25 q27 oraz intensywniejszym zabarwieniem prążka Xp21 (wyjątkowo również Xp22) w porównaniu z izocyklicznym homologiem. W odróżnieniu od powyższego, wzór replikacji izocyklicznego chromosomu X charakteryzuje się jednym wzorem replikacji, na który składają się trzy późno replikujące



Ryc. 4. Przy użyciu techniki MTX-BHG porównano terminację replikacji DNA chromosomów X, chromosomów 1 i 4. A — dominujący wzór terminacji replikacji DNA allocyklicznego chromosomu X. Patrz również rycina 2A. B — alternatywny wzór terminacji replikacji DNA allocyklicznego chromosomu X. Patrz również rycina 2B

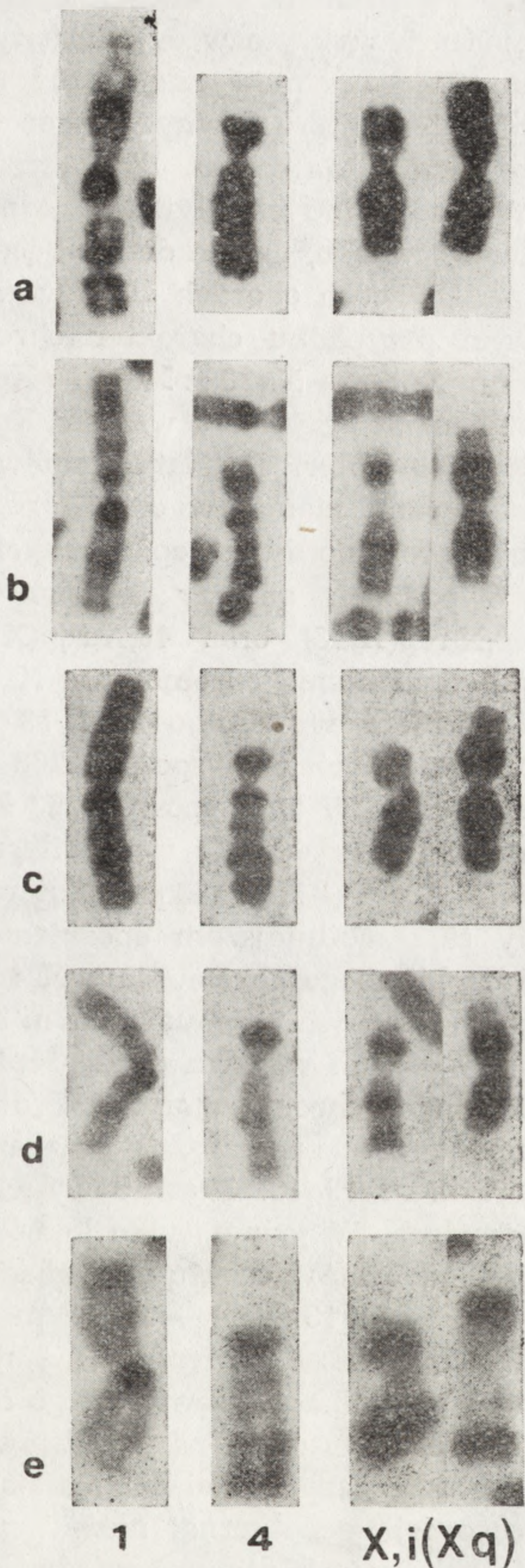
prążki wymienione w kolejności malejącej intensywności zabarwienia Xq21, Xp21, Xq27. Intensywność zabarwienia wymienionych prążków jest mniejsza niż analogicznych prążków allocyklicznego homologa. Wzór replikacji chromosomu X mężczyzny nie różni się od wzoru replikacji izocyklicznego chromosomu kobiety. Już w klasycznych pracach nad wpływem BrdU na chromatynę, odnotowano wybitniejszą despiraliza-



Ryc. 5. Schematy ilustrujące wzór terminacji replikacji DNA chromosomów płciowych X (według Willard, Chromosoma, 1977, 61: 61-73; zmodyfikowane). Ia i Ib — wzór izocykliczny, IIa i IIIa — wzór dominujący, IIb i IIIb — wzór alternatywny

cję regionów późno replikujących DNA. Willard i Latt [126] dokonali pomiarów długości allo- i izocyklicznego chromosomu X w ponad 700 płytkach metafazalnych. Autorzy wykazali, że despiralizacja późno replikującego chromosomu X może być zredukowana przez zastosowanie protokołu T (w odróżnieniu od protokołu B = prążki RBA wg Dutrillaux i wsp. [15] oraz przez stosowanie minimalnych dawek BrdU.

Kolejnym znaczącym wydarzeniem było zastosowanie techniki BrdU — 33258 Hoechst dla charakterystyki replikacji DNA w przypadkach polisomii oraz aberracji strukturalnych chromosomu X [58]. U chorej z kariotypem 47,XXX wśród 281 płytek metafazalnych w 6 komórkach autorzy zidentyfikowali alternatywny wzór replikacji obu allocyklicznych chromosomów X, a w 33 komórkach jeden allocykliczny chromosom X reprezentował dominujący, a drugi alternatywny wzór replikacji. U chorej z kariotypem 48,XXXX dominujący wzór replikacji występował w większości badanych komórek, jednak w 4 na 103 komórki



Ryc. 6. Przy użyciu techniki MTX-BHG poddano ocenie kinetykę replikacji DNA izochromosomu X oraz chromosomów 1 i 4. Uwagę zwraca asymetryczny wzór zabarwienia izochromosomu X w płytce metafazalnych — *c* i *d* oraz wzór symetryczny alternatywny w płytce metafazalnej — *e*

wykryto alternatywny wzór w jednym z trzech allocyklicznych chromosomów X. W 5 komórkach wszystkie trzy allocykliczne chromosomy X reprezentowały wzór alternatywny. Autorzy przebadali również trzy przypadki izochromosomu  $i(Xq)$ , w tym dwa przypadki mozaikowości:  $46,X,i(Xq)45,X$  oraz  $46,X,i(Xq)45,X/46,XX$ . W sumie oceniono

172 płytki metafazalne z nieprawidłowym chromosomem X. W 14 komórkach wykryto wzór alternatywny replikacji. Uwagę autorów zwrócił uderzająco symetryczny wzór replikacji ramion Xq. Tylko w jednej płytce z alternatywnym wzorem replikacji zaobserwowano asymetrię replikacji. Asymetria była związana z późną replikacją prążka Xq21. W dwóch innych płytkach jedno ramię replikowało według wzoru alternatywnego, drugie dominującego.

U dwóch chorych autorzy wykryli translokację 46,X,t(X;X). W jednym przypadku charakter chromosomalnej przebudowy opisano wzorem  $X_{pter} \rightarrow Xq_{23} :: Xq_{24} \rightarrow X_{pter}$  lub  $X_{pter} \rightarrow Xq_{24} :: Xq_{24} \rightarrow X_{pter}$ , w drugim przypadku wzorem  $X_{pter} \rightarrow Xq_{24} :: Xq_{25} \rightarrow X_{pter}$  lub  $Xq_{25} :: Xq_{25} \rightarrow X_{pter}$ . Jak łatwo zauważyć, w obu przypadkach został wyeliminowany niemal w całości region  $Xq_{25} \rightarrow Xq_{27}$ . U obu chorych nie obserwowano dwóch opisywanych wzorów replikacji. W kolejnych dwóch przypadkach autorzy wykryli zrównoważoną, wymienną translokację 46,X,rep(X;13) oraz 46,X,rep(X;19). W przypadku translokacji X-13 punkt złamania chromosomu X zlokalizowano pomiędzy prążkami Xq21 i Xq23, a w chromosomie 13 — pomiędzy prążkami 13q21 i 13q21. W 263 komórkach spośród 268 przebadanych, prawidłowy X był allocykliczny. W 78% spośród 263 komórek, obserwowano dominujący wzór replikacji, a w 22% wzór alternatywny. W przebudowanym chromosomie  $X_{pter} \rightarrow Xq :: 13q \rightarrow 13q_{ter}$ , prążki Xq21 i 13q31 charakteryzowały się wybitniejszym opóźnieniem replikacji niż odpowiednie regiony izocyklicznego chromosomu X i prawidłowego chromosomu 13. W komplementarnym przebudowanym chromosomie  $13_{pter} \rightarrow 13q :: Xq \rightarrow X_{pter}$  nie wykryto wpływu późno replikującego prążka 13q21 na dobudowany fragment chromosomu X. W drugim przypadku translokacji X-19 wymiana zaszła pomiędzy prążkami Xq23 i Xq25 chromosomu X, oraz prążkiem 19q13. Prawidłowy chromosom X był allocykliczny w 95% komórek. W jednej tylko komórce wykryto wzór alternatywny. W obu przebudowanych chromosomach  $X_{pter} \rightarrow Xq :: 19q_{13} \rightarrow 19q_{ter}$  oraz  $19_{ter} \rightarrow 19q_{13} :: Xq \rightarrow Xq_{ter}$  prążki Xq21 i 19q13 charakteryzowały się silniejszym zabarwieniem niż należałoby się spodziewać na podstawie wzoru replikacji prawidłowego chromosomu 19. To ostatnie spostrzeżenie pozwoliło autorom na przedstawienie poglądu, że efekt pozycji, pośredni bądź bezpośredni, zmieniający kinetykę replikacji, a tym samym ekspresję genetyczną, może grać rolę w wielu, jeżeli nie wszystkich, translokacjach również wtedy, gdy w aberracji nie uczestniczy konstytutywna bądź fakultatywna<sup>1</sup> heterochromatyna.

<sup>1</sup> Trafność terminu „fakultatywna heterochromatyna” jest kwestionowana przez wielu cytologów. W tym przypadku użyto tego terminu za wymienionymi autorami.



Już w okresie badań autoradiograficznych replikacji DNA chromosomów uzyskanych z komórek reprezentujących różne tkanki, zwrócono uwagę na charakterystyczną specyfikę tkankową wzorów replikacyjnych. Po wprowadzeniu techniki BrdU-33258 Hoechst-Giemsa, Willard [24] zbadał to zjawisko w komórkach owodniowych, w płodowych i osoby dojrzałej fibroblastach skóry oraz w płodowych i dojrzałych limfocytach krwi obwodowej. We wszystkich badanych tkankach izocykliczny chromosom X charakteryzował się bardzo podobnym wzorem replikacji. Allocykliczny chromosom X wykazywał jednak wyraźną specyfikę tkankową. Zarówno limfocyty płodowe, jak i osobnika dojrzałego charakteryzował dichotomiczny wzór replikacji allocyklicznego chromosomu X. Fibroblasty skóry oraz komórki owodniowe reprezentowały jednak wzór replikacji bardzo zbliżony do wzoru alternatywnego limfocytów. Największe różnice dotyczyły prążków Xq22, q23, i q24, które w limfocytach charakteryzowało opóźnienie inicjacji i terminacji replikacji DNA; w fibroblastach skóry prążki te replikowały DNA izocyklicznie. Dodatkową różnicę stanowiło zachowanie się prążka Xp22.2, który tylko wyjątkowo charakteryzował się późną replikacją DNA w płytkach metafazalnych uzyskanych z limfocytów. W komórkach owodni i fibroblastach skóry prążek Xp22.2 niemal zawsze charakteryzował się późną terminacją replikacji DNA. Podobny jak w fibroblastach i komórkach owodniowych wzór replikacji DNA chromosomów X odnotowano w komórkach potworniaka jajnika [70].

W przypadku izodicentrycznego chromosomu X, idic(X) (pter → → q23 : : q23 → pter) [20] opisano asymetryczny wzór replikacji DNA w 22 płytkach metafazalnych wśród przebadanych ogółem 64. Wykazano, że replikacja DNA rozpoczyna się wcześniej po stronie pojedynczego, aktywnego centromeru. Po drugiej stronie, gdzie centromer uległ inaktywacji, replikacja rozpoczyna się później. Fakt ten, zdaniem autorów, dokumentuje wpływ aberracji strukturalnej centromeru na kinetykę replikacji DNA izodicentrycznego chromosomu X.

Opisano homologię replikacji DNA prążków Xp22.3 → Xp22.13 allocyklicznego chromosomu X z prążkami Yp11.2 → Yp11.32 [102] oraz wczesną inicjację i terminację replikacji wymienionych regionów. Podobnie wczesną kinetykę replikacji DNA opisano w regionie Xq13.1, który mógłby odpowiadać hipotetycznemu centrum inaktywacji chromosomu X opisywanego poprzednio [69, 117].

Techniki wykorzystujące właściwość BrdU, polegającą na despiralizacji chromatyny, znacznie zwiększyły liczbę informacji o mechanizmie replikacji DNA chromosomów organizmów wyższych. Lau i Arrighi [60, 61] opracowali technikę PCC-SCD, która umożliwiła zdefiniowanie i zmierzenie jednostki replikacji — chromosomalnego replikonu. Rozmiary

chromosomalnego replikonu w trakcie trwania fazy S wahają się od 0,2 do 1,2  $\mu\text{m}$  i są bardzo zbliżone do replikonów euchromatyny i heterochromatyny. Replikony chromosomalne zawierają rodziny replikonów DNA. Wykazano dalej, że euchromatyna i heterochromatyna ssaków ma odmienną sekwencję dekondensacji, replikacji i ponownej kondensacji w przebiegu fazy S cyklu życiowego komórki. Autorzy dostarczyli danych, pozwalających sądzić, że replikacja DNA chromosomów ssaków odbywa się w obrębie rodzin chromosomalnych replikonów, wzdłuż chromosomu.

Inicjację replikacji można opisać jako „wybuch” tego procesu ponad różnymi regionami chromosomu [32]. Impuls ten uruchamia replikację DNA w sąsiadujących rodzinach chromosomalnych replikonów w zbliżonych sekwencjach czasowych. Rodziny replikonów pojedynczych chromosomów, dające się rozróżnić w mikroskopie świetlnym jako prążki lub subprążki wcześniej lub później replikujące DNA, liczą 25-100 replikonów [16]. Badania hybrydów komórkowych gryzoni pozwoliły wykazać znaczną autonomię replikacji indywidualnych chromosomów i określonych subregionów [67]. Fakt, że określone prążki i regiony allocyklicznego chromosomu X charakteryzują się heterogennością międzykankową i międzykomórkową kinetyki replikacji DNA pozwala sądzić, że proces ten sterowany jest z wielu dyskretnych centrów rozmieszczonych wzdłuż chromosomu X [126].

Podsumowując informacje o kinetyce replikacji DNA chromosomu X człowieka, można zauważyć:

1. Technika autoradiografii  $\text{H}^3$ -TdR oraz technika BHG i jej metodyczne odmiany pozwoliły potwierdzić istnienie znaczących różnic międzykankowych i międzykomórkowych wzoru i kinetyki replikacji DNA heterochromatycznego chromosomu X.

2. Zdefiniowano jednostkę replikacji, chromosomalny replikon, wskazując na autonomię procesu replikacji DNA w poszczególnych chromosomach oraz chromosomalnych regionach.

3. Uzyskane dane pozwoliły lepiej udokumentować hipotezę o wieloogniskowej kontroli replikacji DNA allocyklicznego chromosomu X.

4. Dostarczono dowodów cytologicznych przemawiających za istnieniem trzech regionów chromosomu X unikających inaktywacji.

#### GENETYCZNE ASPEKTY HIPOTEZY LYON

Myśl przewodnia hipotezy Lyon znajduje bogate potwierdzenie w praktyce cytogenetycznej. Niekwestionowany związek pomiędzy allocykliczną replikacją DNA jednego z chromosomów X, kondensacją chromosomów X oraz nieaktywnością genetyczną tego chromosomu stał się

punktem wyjścia dla następującego poglądu: „centrum kondensacji chromatyny  $X =$  centrum inaktywacji  $X$ , jest zlokalizowane w proksymalnym regionie  $Xq$ . Jeżeli chromosom posiada dwa takie centra (np. na skutek translokacji  $X-X$ ), odsetek komórek posiadających podwójne grudki chromatyny  $X$  oraz odległość między nimi zależna jest od odległości pomiędzy centrami inaktywacji chromosomu  $X$ ” [119]. Hipotezę tę doskonalono znajdując nowe dowody cytologiczne i genetyczne dla jej podtrzymania [101, 117, 118]. Zakwestionowano trafność opisów izochromosomu  $Xp$  [18, 121] twierdząc, że w rzeczywistości były to przypadki delecji ( $Xq-$ ), a symetryczny układ prążków  $Xp$  i  $Xq$  sugerował rozpoznanie izochromosomu [69]. O tym, że taka możliwość jest prawdopodobna, świadczy dobrze udokumentowany opis dwóch przypadków delecji  $Xq-$ , bardzo podobnych do izochromosomu  $i(Xp)$ , przedstawiony przez Chappella i Schrödera [13] oraz przypadek 1 przedstawiony przez Mattei i wsp. [69]. Uważa się, że izochromosom ramion krótkich chromosomu  $X$  nie istnieje, bowiem komórka dziedzicząca taką aberrację jest letalna na skutek braku mechanizmu inaktywującego i w konsekwencji niezrównoważenia produktów genów. Fakt ten, zdaniem Therman i wsp. [117] oraz Mattei i wsp. [69], przemawia za istnieniem tylko jednego centrum inaktywacji, zlokalizowanego w subregionie ograniczonym prążkami  $Xq11-2$  i  $Xq211$  [69]. Kolejnym cytologicznym dowodem przytaczanym przez Therman i Patau [118] oraz Mattei i wsp. [69], przemawiającym za istnieniem tylko jednego centrum inaktywacji chromosomu  $X$ , jest analiza porównawcza punktów złamań chromosomu  $X$  w przypadku delecji ( $Xp-$ ) i ( $Xq-$ ). W pierwszym przypadku znane są opisy chorych, gdzie delecja objęła całe ramiona  $Xp$ ; w wypadku delecji ( $Xq-$ ) nie znane są dotychczas opisy chorych z całkowitą delecją ramion długich chromosomu  $X$ . Podobnie w przypadkach izochromosomu dwucentromerycznego  $idic(Xp-)$  opisano chorych z całkowitą utratą ramion  $Xp$ , natomiast w przypadku  $idic(Xq-)$  opis najdramatyczniej zredukowanego regionu ramion  $Xq$  można przedstawić zapisem  $pter \rightarrow cen \rightarrow q211 :: q211 \rightarrow cen \rightarrow pter$  [69]. Przedmiotem szczególnego zainteresowania autorów hipotezy o „centrum inaktywacji” są przypadki niezrównoważonych translokacji  $X/autosomy$  [68, 117]. Dokonano przeglądu literatury dotyczącej ośmiu przypadków translokacji  $X/autosomy$  z punktem złamania na ramieniu krótkim ( $Xp11$ ) [68]. Wśród członków rodzin wykryto 15 niezrównoważonych i 20 zrównoważonych translokacji. W 15 przypadkach niezrównoważonych translokacji  $X/autosomy$ , w których autosom powinien być strukturalnie związany z ramionami krótkimi  $Xp$ , chromosom  $X$  nie został wykryty. W tych wszystkich przypadkach chromosom  $X$  pochodny pierwotnej aberracji  $der(X)$  uległ inaktywacji. W 6 przypadkach niezrównoważonych translokacji  $X/autosomy$ , z punk-

tem złamania chromosomu X w ramionach długich, sześciu członków rodzin było nosicielami zrównoważonych, sześciu natomiast niezrównoważonych translokacji X/autosomy. W tych ostatnich pochodna autosomalna chromosomu zawierająca ramiona długie chromosomu Y uległa inaktywacji we wszystkich przypadkach. Konkludując, autorzy twierdzą, że w przypadkach translokacji X/autosomy dochodzi do selektywnej transmisji translokowanych chromosomów. Mechanizm selekcji preferuje transmisję pochodnych chromosomalnych zawierających nienaruszony region  $Xq11-2 \rightarrow Xq211$ . Region ten zawierając centrum inaktywacji, heterochromatynizacji oraz inicjacji allocyklicznej replikacji DNA zabezpieczając genetyczne zrównoważenie komórki.

Obok regionu zawierającego centrum inaktywacji (region „c”) [117, 118], opisano w ramionach krótkich (Xp) region „b” (cen  $\rightarrow$  Xp21) permanentnie aktywny. Wymienieni autorzy powołują się na fakt, że region ten został opisany przez Mikkelsen [72] oraz Willarda i Latta [126] jako wcześnie replikujący DNA. Region „b” występuje w stanie monosomicznym u chorych z kariotypem  $45,X,del(Xq)$  oraz  $i(Xq)$ ; w przypadkach translokacji  $t(X;X)$  oraz polisomii X region ten występuje w zwiększonej liczbie. W obu przypadkach ma być współodpowiedzialny za stan kliniczny chorych.

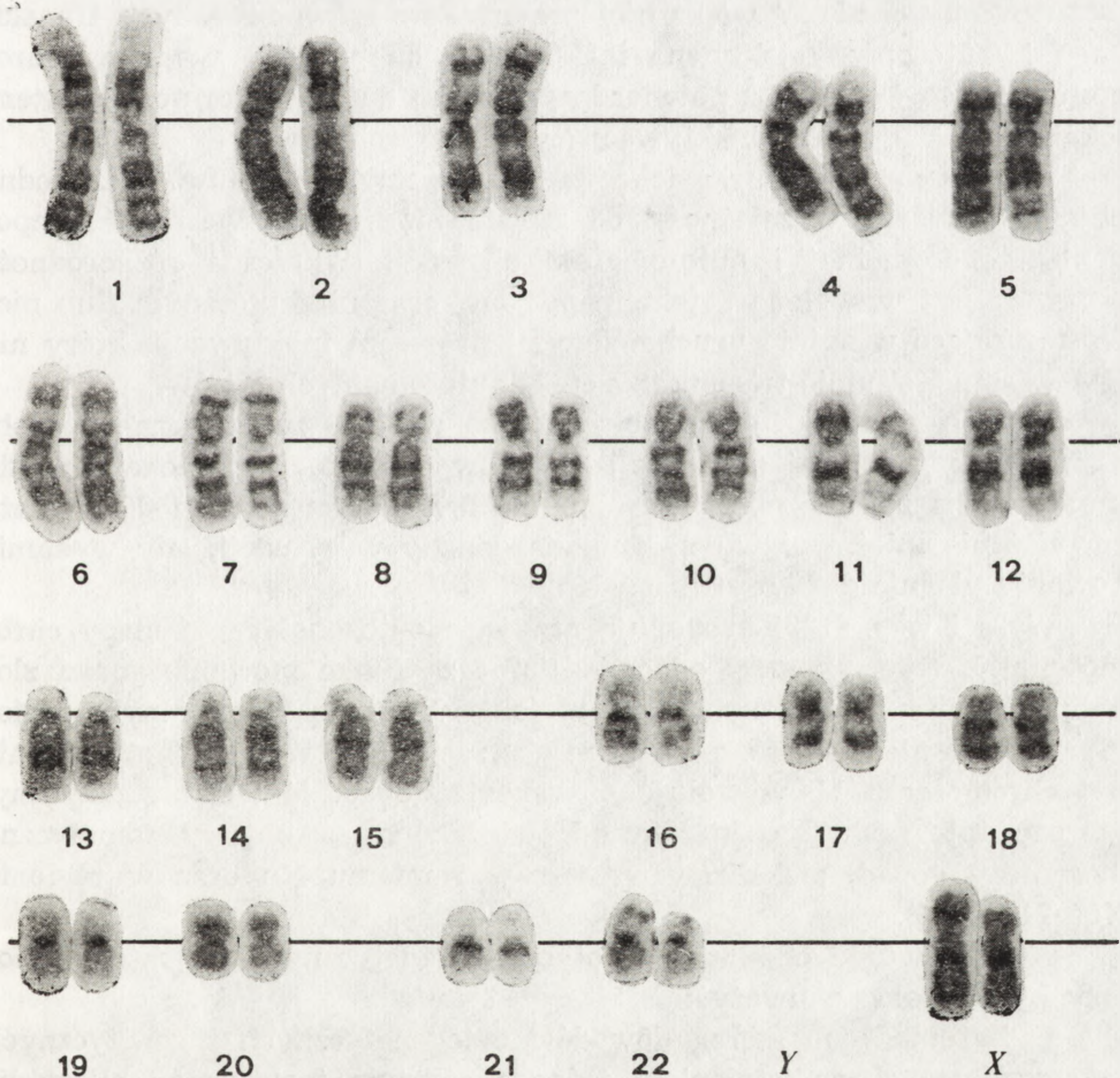
Poglądy lokalizujące centrum inaktywacji chromosomu X w regionie proksymalnym ramion Xq wzbudziły duże zainteresowanie oraz znalazły potwierdzenie w szeregu opisach aberracji strukturalnych chromosomu X, uwzględniających kinetykę replikacji nieprawidłowego chromosomu: Yu i wsp. [130] —  $45,X/46,X,dic(X)$  (q23); Varella-Garcia i wsp. [123] —  $46,X,dir\ dup(X)$  (pter  $\rightarrow$  q27 :: q21  $\rightarrow$  qter); Mutchinik i wsp. [82] —  $idic(X)$  (p22.3 :: p22.3); Yu i wsp. [131] —  $46,X,dic(X)$  (qter  $\rightarrow$  p22 :: p22  $\rightarrow$  qter); Petit i wsp. [88] —  $45,X/46,X,idic(X)$  (q211); Robertson i wsp. [93] —  $46,X,dic(X)$  (pter  $\rightarrow$  qter :: qter  $\rightarrow$  pter)

Aberracje strukturalne chromosomu X budzą duże zainteresowanie nie tylko jako dogodny obiekt śledzenia podstawowych mechanizmów genetycznych. Gwałtowny rozwój diagnostyki prenatalnej wymaga trafnych i możliwie jednoznacznych odpowiedzi, jakie skutki kliniczne może wywołać konkretna aberracja strukturalna heterochromosomu X. Większości znanych opisów aberracji strukturalnych chromosomu X towarzyszy linia mozaikowa  $45,X$ , co poważnie ogranicza możliwości interpretacji objawów klinicznych. Wady tej nie posiadają przypadki nie-mozaikowe. Dokonano ostatnio przeglądu 149 podobnych przypadków [129]; na tę liczbę składa się 36 przypadków delecji Xp-, 29 delecji Xq-, 3 przypadki interstycjalnej delecji Xp- lub Xq-, 44 przypadki zrównoważonych translokacji X/autosomy, 25 niezrównoważonych translokacji X/autosomy, 12 przypadków translokacji X-X oraz Xp- lub Xq-izodicytryków. Z analizy wyłączono przypadki izochromosomu (Xq),

bowiem ta częsta aberracja strukturalna chromosomu X nie jest najczęściej dokładnie opracowana od strony klinicznej.

Dyskretne delecje Xp najczęściej charakteryzują się somatycznymi objawami zespołu Turnera, przy zachowanej funkcji gonad. Delecje bardzo rozległe, sięgające do prążka Xp11, w większości przypadków wywołują kompletne objawy kliniczne zespołu Turnera, włączając w to dysgenezję gonad. Opisano interstycjalną delecję 46,X,del(X) (pter → p22 :: p11 → qter) u matki oraz dwóch spośród pięciu córek [36] (ryc. 7). Delecja wywołała niższy wzrost nosicielek aberracji w porównaniu ze zdrowymi, żeńskimi członkami rodziny, bez uchwytnych innych objawów klinicznych.

Delecje Xq sięgające prążka Xq21 wywołują dysgenezję gonad oraz w połowie przypadków somatyczne objawy zespołu Turnera. Delecje



Ryc. 7. Technika prążków GTG badania chromosomów. Przypadek interstycjalnej delecji 46,X,del(X) (pter → p22 :: p11 → qter)

sięgające prążka Xq22 najczęściej wywołują czystą dysgenezję gonad (w tych przypadkach w odróżnieniu od delecji sięgających wyżej, można obserwować często wtórny brak miesiączki). Autorzy przytaczają ciekawy przypadek opisany przez de La Chapella i wsp. [14], interstycjalnej delecji Xq13-q26. Porównanie obrazu klinicznego z typem aberracji chromosomalnej pozwala sądzić, że geny odpowiedzialne za funkcję gonad zlokalizowane są proksymalnie w stosunku do prążka Xq13 oraz terminalnie w stosunku do prążka Xq26. Somatyczne objawy zespołu Turnera mają być natomiast zależne od genów zlokalizowanych w regionie ograniczonym wymienionymi prążkami.

Objawy kliniczne 44 przypadków zrównoważonych translokacji X/autosomy nie stoją w sprzeczności z hipotezą Sarto i Therman [101] identyfikujących „strefę krytyczną” chromosomu X. Integralność strefy, obejmującej region Xq13 → Xq26, ma być niezbędna dla prawidłowej funkcji gonad. W większości przypadków zrównoważonych translokacji X/autosomy, selektywna inaktywacja obejmuje prawidłowy chromosom X, co jeszcze raz potwierdza, zdaniem autorów, trafność hipotezy lokalizującej „centrum inaktywacji” w ramionach Xq.

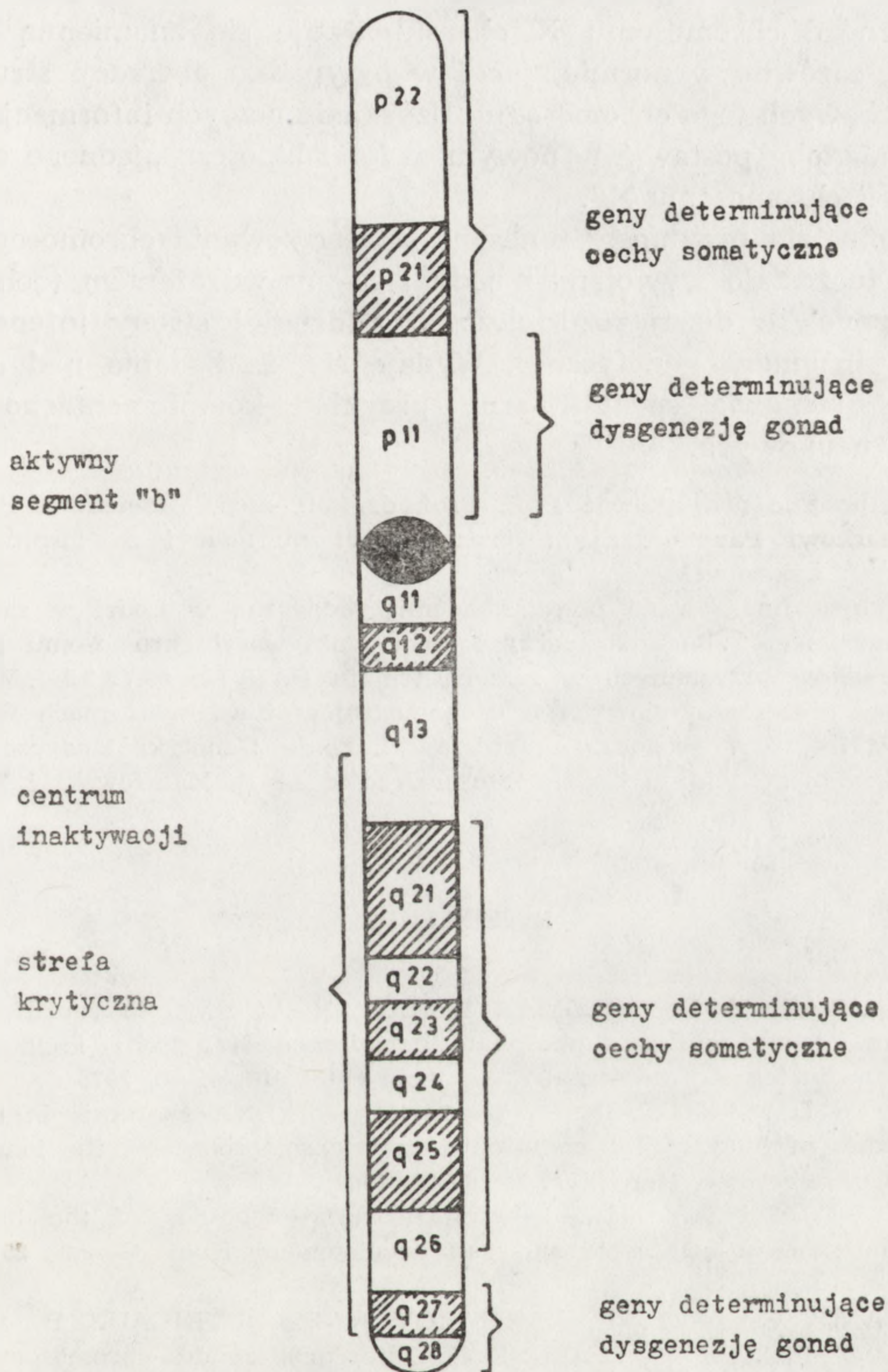
Niezrównoważone translokacje X/autosomy wywołują różnorodne objawy kliniczne w zależności od zrównoważenia genetycznego komponenty gonosomalnej i autosomalnej aberracji. Kliniczna różnorodność objawów jest wywołana „efektem pozycji” oraz nieskutecznym (lub niewystarczająco wcześnie uruchomionym) procesem inaktywacji, który nie jest w stanie stłumić trisomiczny efekt autosomalnych genów.

Translokacje X-X są odpowiedzialne za objawy kliniczne zespołu Turnera bądź czystej dysgenezji gonad w zależności od zlokalizowania punktów złączeń w ramionach Xp bądź Xq. Translokacja X-X może również nie mieć wpływu na funkcję gonady w sytuacji, gdy wyeliminowaniu ulegnie dystalny region Xp.

Wyss i wsp. [129] proponują przyjęcie cytogenetycznej mapy chromosomu X (ryc. 8): geny odpowiedzialne za funkcjonowanie gonad zlokalizowane są w proksymalnym regionie Xp oraz terminalnym regionie Xq, ich nieobecność, na skutek aberracji liczbowej bądź strukturalnej chromosomu X, wywołuje dysgenezję gonad. Materiał genetyczny, którego integralność czyni się odpowiedzialną za objawy somatyczne dysgenezji gonad, zlokalizowany jest w ramieniu Xp oraz w regionie Xq(q21 → q26).

Podsumowując obserwacje dotyczące genetycznych aspektów hipotezy Lyon, można zauważyć:

1. Zgromadzono szereg dowodów cytogenetycznych i genetycznych przemawiających za istnieniem jednego centrum inaktywacji allocyklicznego chromosomu X.



Ryc. 8. Cytogenetyczna mapa chromosomu X (według Wyss i wsp., *Clinical Genetics*, 1982, **21**: 145-159). Postulowana lokalizacja genów chromosomów X, których nieobecność czyni się odpowiedzialną za somatyczne oraz gonadalne objawy dysgenezji gonad

2. Aberracje strukturalne i liczbowe chromosomu X pociągają za sobą określone skutki kliniczne. Stało się możliwe przedstawienie cytogenetycznej „mapy” allocyklicznego chromosomu X.

3. Istnieją przesłanki przemawiające za tym, że replikacja DNA

allocyklicznego chromosomu X charakteryzuje się znamioną heterogennością, zarówno w normie, jak i w przypadku aberracji strukturalnych i liczbowych tego chromosomu. Uzyskanie nowych informacji w tym zakresie mogłoby postawić w nowym świetle hipotezę „jednego centrum inaktywacji chromosomu X”.

Ostatnie lata przyniosły renesans zainteresowania chromosomem X. Zjawisko to zostało wywołane z jednej strony wdrożeniem technik cytogenetycznych o dużej rozdzielczości, z drugiej strony intensywnym rozwojem inżynierii genetycznej. Wydaje się, że badania nad chromosomem X stanowią spektakularny przykład komplementarności obu dyscyplin naukowych.

Autor pragnie podziękować Prof. Prof. dr hab. med. Tadeuszowi Pawlikowskiemu, Markowi Pawlikowskiemu oraz Janowi Steffenowi za inspirację oraz wiele cennych wskazówek.

Praca była finansowana przez Akademię Medyczną w Łodzi w ramach tematu bezumownego: „Badania nad procesem inaktywacji chromosomu płciowego X” oraz środków przyznanych w ramach tematu PAN No 09.7.3.2.3. „Molekularne podstawy procesów życiowych u drobnoustrojów i w organizmach wyższych”.

Ryciny 1-4, 6, 7 pochodzą ze zbiorów Zakładu Genetyki Medycznej Instytutu Endokrynologii AM w Łodzi, autorami zdjęć są B. Kałużewski i Z. Pokorska.

#### LITERATURA

- [1] ASHKENAZI Y. E., GOLDMAN B., DOTAN A., Rhythmic variation of sex chromatin and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in human oral mucosa during the menstrual cycle, *Acta cytol.*, **19**: 62-66, 1975.
- [2] ATKINS L., SANTESSON B., The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human cells containing an isochromosome for the long arm of an X chromosome, *Hereditas*, **51**: 67-73, 1964.
- [3] BACK F., Euchromatic and heterochromatic behavior of the human X<sub>2</sub> chromosome in cell cycle and cell development, *Hum. Genet.*, **25**: 315-329, 1974.
- [4] BARANOVSKAYA L. T., ZAKHAROV A. F., DUTRILAUD B., CARPENTIER S., PRIEUR M., LEJEUNE J., Differentiation des chromosomes X par les methodes de despiralisation au 5-bromodeoxyuridine (BUDR) et de denaturation thermique menagee, *Ann. Genet.*, **15**: 271-274, 1972.
- [5] BARR M. L., BERTRAM E. G., A morphological distinction between neurones of the male and female and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis, *Nature*, **1963**: 676-677, 1949.
- [6] BEUTLER E., YEH M., FAIRBANKS V. F., The normal human female as a mosaic of X chromosome activity: studies using the gene g-6-pd deficiency as a marker, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **48**: 9-16, 1962.
- [7] BROWN S. W., CHANDRA H. S., Inactivation system of the mammalian X chromosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 195-199, 1973.
- [8] CAMARGO M., WANG N., Cytogenetic evidence for the absence in an



- inactivated X chromosome in a human female (XX) breast carcinoma cell line, *Hum. Genet.*, **55**: 81-85, 1980.
- [9] CHAKRAVARTY A., PURANDARE H., MEHTA L., CHAKRAVARTY B. P., Effect of synthetic and natural sex steroids on X-chromatin, *Indian J. Med. Res.*, **68**: 785-789, 1978.
- [10] COHEN M. M., SANDBERG A. A., TAKAGI N., MACGILLIVRAY M. H., Autoradiographic investigations of centric fragments and rings in patients with stigmata of gonadal dysgenesis, *Cytogenetics*, **6**: 254-267, 1967.
- [11] COMINGS D. E., The duration of replication of the inactive X chromosome in humans based on the persistence of the heterochromatic sex chromatin body during DNA synthesis, *Cytogenetics*, **6**: 20-37, 1967.
- [12] DE JONGE A. J. R., ABRAHAMS P. J., WESTERVELD A., BOOTSMA D., Expression of human hprt gene on the inactive X chromosome after DNA-mediated gene transfer, *Nature*, **295**: 624-626, 1982.
- [13] DE LA CHAPELLE A., SCHRÖDER J., Reappraisal of a 46, X, i (Xp) karyotype as 46, X, del (Xq), *Hereditas*, **80**: 137-140, 1975.
- [14] DE LA CHAPELLE A., SCHRÖDER J., HAAHTELA T., ARO P., Deletion mapping of the human X chromosome, *Hereditas*, **80**: 113-120, 1975.
- [15] DUTRILLAUX B., COUTURIER J., RICHER C. L., VIEGAS-PEGUIGNOT E., Sequence of DNA replication in 277 R- and Q-bands of human chromosomes using a BrdU treatment, *Chromosoma*, **58**: 51-61, 1976.
- [16] EVANS H. J., Molecular architecture of human chromosomes, *Br. Med. Bull.*, **29**: 196-202, 1973.
- [17] FIALKOW P. J., X-chromosome inactivation and the Xg locus, *Am. J. Hum. Genet.*, **22**: 460-463, 1970.
- [18] FITZGERALD P. H., DONALD R. A., Isochromosome for the short arm of X: a human mosaic 45, X/46, XXpi, *Clin. Genet.*, **7**: 148-154, 1975.
- [19] FRØLAND A., International asynchrony in late replicating X chromosomes, *Nature*, **213**: 512-513, 1967.
- [20] FRYNS J. P., PETIT P., KLECZKOWSKA A., van der BERGHE H., Replication and inactivation of an isodicentric X: presence of an inactive centromere influences the replication patterns, *Clin. Genet.*, **24**: 180-183, 1983.
- [21] GEITLER L., Das Heterochromatin der Geschlechtschromosomen bei Heteropteren, *Chromosoma*, **1**: 197/1939, cyt. za Moore K. L., Sex chromatin in various animals, [w] *The Sex Chromatin*, red. K. L. Moore, W. B. Saunders Comp., Philadelphia, London 1966, 16-58.
- [22] — Die Analyse des Kernbaus und der Kernteilung der Wasserläufer *Gerris lateralis* und *Gerris lacustris* (Hemiptera Heteroptera) und die Somadifferenzierung, *Z. Zellforsch.*, **26**: 641/1937, cyt. za Moore K. L., Sex chromatin in various animals, [w] *The Sex Chromatin*, red. K. L. Moore, W. B. Saunders Comp., Philadelphia, London 1966, 16-58.
- [23] GERMAN J., The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human blood cells, *J. Cell. Biol.*, **20**: 37-55, 1964.
- [24] GERMAN J., ARONIAN D., Autoradiographic studies of human chromosomes. VI. Comparison of the End-of-S patterns in lymphocytes and amniotic epithelial cells, *Chromosoma*, **35**: 99-110, 1971.
- [25] GIANNELI F., The pattern of X-chromosome deoxyribonucleic acid synthesis in two women with abnormal sex-chromosome complements, *Lancet*, **1**: 863-865, 1963.

- [26] — Human Chromosomes DNA Synthesis, wyd. S. Karger, Basel, Munchen, New York, 26, 1970.
- [27] GILBERT C. W., MULDAL S., LAJTHA L. G., ROWLEY J., Time sequence of human chromosome duplication, *Nature*, **195**: 869-873, 1962.
- [28] GRUMBACH M. M., MORISHIMA A., Sex chromatin and the sex chromosomes; On the origin of sex chromatin from a single X chromosome, *Acta cytol.*, **6**: 46-60, 1962.
- [29] GRUMBACH M. M., MORISHIMA A., TAYLOR J. H., Human sex chromosome abnormalities in relation to DNA replication and heterochromatinization, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **49**: 581-589, 1963.
- [30] GRUMBACH M. M., VAN WYK J. J., Disorders of sex differentiation. [w] *Textbook of Endocrinology*, wyd. R. H. Williams, W. B. Saunders Comp., 1974, 423-497.
- [31] GRZESCHIK K. H., KIM My. A., JOHANNSMANN R., Late replicating bands of human chromosomes demonstrated by fluorochrome and Giemsa staining, *Humangenetik*, **29**: 41-59, 1975.
- [32] HAND R., Regulation of DNA replication on subchromosomal units of mammalian cells, *J. Cell Biol.*, **64**: 89-97, 1975.
- [33] HARNDEN D. G., Nuclear sex in triploid XXY human cells, *Lancet*, **2**: 488, 1961.
- [34] HEITZ E., Die Herkunft der Chromosomenzentren, *Planta*, **18**: 571-635, 1933.
- [35] HELLKUHL B., GRZESCHIK K. H., Partial reactivation of a human inactive X-chromosome in human somatic cell hybrids, *Cytogenet. Cell. Genet.*, **22**: 527-530, 1978.
- [36] HERVA R., KAŁUŻEWSKI B., De la CHAPELLE A., Inherited interstitial del (Xp) with minimal clinical consequence: with a note on the location of genes controlling phenotypic features, *Am. J. Med. Genet.*, **3**: 43-58, 1979.
- [37] HÖSLI P., Shape and position of the sex chromatin in living human cells, *Acta anat.*, **55**: 370-392, 1963.
- [38] HSU L. Y. F., KLINGER H. P., WEIS J., Influence of nuclear selection criteria on sex chromatin frequency in oral mucosa cells of newborn females, *Cytogenetics*, **6**: 371-382, 1967.
- [39] HSU T. C., LOCKHART L. H., The beginning and the terminal stages of DNA synthesis of human cells with a XXXXY constitution, *Hereditas*, **52**: 320-324, 1964.
- [40] ISCN (1978), An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1978), *Birth Defects: Original Article Series*, vol. XIV, No 8 (The National Foundation, New York 1978), [również w] *Cytogenet. Cell Genet.*, **21**: 309-404, 1978.
- [41] JACOBS P. A., HUNT P. A., MAYER M., BART R. D., Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosome translocation: further evidence that the DMD locus at Xp21, *Am. J. Hum. Genet.*, **33**: 513-518, 1981.
- [42] JACOBS P. A., MATSUYAMA A. M., BUCHANAN I. M., WILSON C., Late replicating X chromosomes in human triploidy, *Am. J. Hum. Genet.*, **31**: 446-457, 1979.
- [43] JAMES J., Intermitotic transformation of the Barr body in cultured cells of the human female, *Z. Zellforsch.*, **64**: 178-188, 1964.
- [44] JONES P. A., TAYLOR S. M., SHAPIRO L. J., Cell cycle-specific reactivation of an inactive X-chromosome locus by 5-azadeoxycytidine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 1215-1219, 1982.

- [45] KAHAN B., DeMARS R., Autonomous gene expression on the human inactive X chromosome, *Somatic Cell Genet.*, **6**: 309-323, 1980.
- [46] KAŁUŻEWSKI B., Analysis of the correlation between percentages of chromatin-positive cells and percentages of 46, XX, 47, XXY and 48, XXXY cells with asynchronous DNA replication in X chromosomes at the beginning and end of phase S, *Ann. Med. Sect. Pol. Acad. Sci.*, **19**: 29-55, 1974.
- [47] — BrdU-33258 Hoechst-Giemsa analysis of DNA replication in synchronized lymphocyte cultures; Identification of human X chromosomes, [w] *Abstract Book Helsinki Chromosome Conference*, 1977, 35.
- [48] — Aberracje chromosomowe w chorobach cielesno-płciowych, [w] *Endokrynologia Kliniczna dla studentów medycyny*, wyd. Akademia Medyczna w Łodzi, 1982, 180-194.
- [49] — BrdU-Hoechst-Giemsa analysis of DNA replication in synchronized lymphocytes cultures. Study of human X and Y chromosomes, *Chromosoma*, **85**: 553-569, 1982.
- [50] KAŁUŻEWSKI B., JAKUBOWSKI L., MORUZGAŁA T., Value of X- and Y-body tests, *Can. Med. Ass. J.*, **116**: 1342-1343, 1977.
- [51] KAŁUŻEWSKI B., JEŻEWSKA-MUSIAŁ M., MORUZGAŁA T., Cytogenetic analysis in Klinefelter syndrome with 47, XXY/48, XXXY karyotype, *Pol Endocrinol.*, **28**: 214-229, 1972.
- [52] KEATS B., Genetic mapping: X chromosome, *Hum. Genet.*, **64**: 28-32, 1983.
- [53] KIKUCHI Y., SANDBERG A. A., Chronology and pattern of human chromosome replication. I. Blood leucocytes of normal subjects, *J. Nat. Cancer Inst.*, **32**: 1109-1143, 1964.
- [54] — Chronology and pattern of human chromosome replication. II. Autoradiographic behaviour of various Y and X chromosomes, *J. Nat. Cancer Inst.*, **34**: 795-813, 1965.
- [55] KIM My. A., JOHANSMANN R., GRZESCHIK K. H., Giemsa staining of the sites replicating DNA early in human lymphocyte chromosomes., *Cytogenet. Cell Genet.*, **15**: 363-371, 1975.
- [56] KLINGER H. P., SCHWARZACHER H. G., WEISS J., DNA content and size of sex chromatin positive female nuclei during cell cycle, *Cytogenetics*, **6**: 1-19, 1967.
- [57] LATT S. A., Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 3395-3399, 1973.
- [58] — Microfluorometric analysis of deoxyribonucleic acid replication kinetics and sister chromatid exchanges in human chromosomes, *J. Histochem. Cytochem.*, **22**: 478-491, 1974.
- [59] LATT S. A., WILLARD H. F., GERALD P. S., BrdU-33258 Hoechst analysis of DNA replication in human lymphocytes with supernumerary or structurally abnormal X chromosomes, *Chromosoma*, **57**: 135-153, 1976.
- [60] LAU Y. F., ARRIGHI F. E., Studies of mammalian chromosome replication. I. BrdU-induced differential staining patterns in interphase and metaphase chromosomes, *Cytogenet. Cell Genet.*, **27**: 176-183, 1980.
- [61] — Studies of mammalian chromosomes replication. II. Evidence for the existence of defined chromosome replicating units, *Chromosoma*, **83**: 721-741, 1981.
- [62] LINDSTEN J., TILINGER K. G., Self-perpetuating ring chromosome in gonadal dysgenesis, *Lancet*, **1**: 593-594, 1962.

- [63] LYON M. F., Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.), *Nature*, **190**: 372-373, 1961.
- [64] — Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome, *Am. J. Hum. Genet.*, **14**: 135-148, 1962.
- [65] — X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals, *Biol. Rev.*, **47**: 1-35, 1972.
- [66] MAJ S., GADOMSKI J., Chromatyna płciowa u kobiet leczonych kortykosteroidami, *Endokr. Pol.*, **21**: 579-583, 1970.
- [67] MARIN G., COLLETTA G., Patterns of late chromosomal DNA replication in unbalanced Chinese hamster-mouse somatic cell hybrids, *Expt. Cell Res.*, **89**: 368-376, 1974.
- [68] MATTEI M. G., MATTEI J. F., AYME S., GIRAUD F., X-autosome translocations: cytogenetic characteristics and their consequence, *Hum. Genet.*, **61**: 295-309, 1982.
- [69] MATTEI M. G., MATTEI J. F., VIDAL I., GIRAUD F., Structural anomalies of the X chromosome and inactivation center, *Hum. Genet.*, **56**: 401-408, 1981.
- [70] McCAW B. K., LATT S. A., X-chromosome replication in parthenogenic benign ovarian teratomas, *Hum. Genet.*, **38**: 253-264, 1977.
- [71] McKUSICK V. A., Mendelian inheritance in man. Catalog of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes. [w] J. Hopkins University Press, Baltimore and London 1978.
- [72] MIKKELSEN M., Identification of active and inactive X chromosomes by BrdU incorporation and fluorochrome staining, [w] *Chromosomes Today*, red. P. L. Pearson, K. R. Lewis, New York: John Wiley and Sons, 1976, **5**: 409-414.
- [73] MILES C. P., Morphology and functional relations of sex chromatin in cultured amnion cells, *Exptl. Cell Res.*, **20**: 324-337, 1960.
- [74] MILES C. P., O'NEIL F., Time-lapse studies of mitosis and sex chromatin in human fibroblasts, *Acta Cytologica*, **14**: 468-478, 1970.
- [75] MITTWOCH U., Whistling maids and crowing hens-hermaphroditism in folklore and biology, [w] *Perspectives in Biology and Medicine*, 1981, 595-606.
- [76] MOHANDAS T., SPARKES R. S., SHAPIRO L. J., Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation, *Science*, **211**: 393-396, 1981.
- [77] — Genetic evidence for the inactivation of a human autosomal locus attached to an inactive X chromosome, *Am. J. Hum. Genet.*, **34**: 811-817, 1982.
- [78] MOORE M., BARR M., The sex chromatin in human malignant tissues, *Br. J. Cancer*, **11**: 384-390, 1957.
- [79] MORISHIMA A., GRUMBACH M. M., TAYLOR J. H., Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**: 756-763, 1962.
- [80] MULDAL S., GILBERT C. W., LAJTHA L. G., LINDSTEN J., ROWLEY J., FRACCARO M., Tritiated thymidine incorporation in an isochromosome for the long arm of the X chromosome in man. *Lancet*, **1**: 861, 1963.
- [81] MULDAL S., LAJTHA L. G., GILBERT C. W., Time-sequence of human chromosome duplication, [w] *Current Research in Leukemia*. F. G. J. Hayhoe, Cambr. Univ. Press, 1965, 89.
- [82] MUTCHNIK O., CASAS L., RUZ L., LISKER R., LOZANO O., Symmetri-

- cal replication patterns and sex chromatin bodies formation of an idic(X) (p22.3::p22.3) chromosome, *Hum. Genet.*, **57**: 261-264, 1981.
- [83] OCKEY C., De la CHAPELLE A., Autoradiographic reappraisal of an XXXXY male as a probable XXXXY with a 4/11 translocation, *Cytogenetics*, **6**: 178-192, 1967.
- [84] OHNO S., Ancient linkage groups and frozen accidents, *Nature*, **244**: 259-262, 1973.
- [85] PALMER C. G., 5-bromodeoxyuridine-induced constrictions in human chromosomes, *Canad. J. Genet. Cytol.*, **12**: 816-830, 1970.
- [86] PERRY P., WOLF S., New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature*, **251**: 156-158, 1974.
- [87] PETERSEN A. J., DNA synthesis and chromosomal asynchrony induced parasynchronous DNA synthesis in human leucocyte cultures and chromosomal asynchrony in the early S phase, *J. Cell. Biol.*, **23**: 651-654, 1964.
- [88] PETIT P., FRYNS J. P., KOUMANS J., Van den BERG H., X-chromosomes attached by their long arm: case report and replication kinetics of the rearranged X-chromosome, *Clin. Genet.*, **21**: 384-387, 1982.
- [89] PRIEST J. H., HEADY J. E., PRIEST R. E., Synchronization of human diploid cells by fluorodeoxyuridine. The first ten minutes of synthesis in female cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **38**: 61-72, 1967.
- [90] RAJESWARI S., GHOSH S. N., SHAH P. N., BORAH V. J., Barr body frequency in the human breast cancer tissue. A prospective study on its prognostic value and its correlation with specific oestradiol receptor, *Eur. J. Cancer*, **13**: 99-102, 1977.
- [91] RICCI N., DALLAPICCOLA B., VENTIMIGLIA B., TIEPOLO L., FRACCARO M., 48,XXXX/49, XXXXX mosaic: asynchronies among the late-replicating X chromosomes, *Cytogenetics*, **7**: 249-259, 1968.
- [92] RIGGS A. D., X inactivation, differentiation, and DNA methylation, *Cytogenet. Cell Genet.*, **14**: 9-25, 1975.
- [93] ROBERTSON J., FAED M. J. E., LAMONT M. A., CROWDER A. M., Isodicentric X chromosome in a moderately tall patient with gonadal dysgenesis: lack of effect of functional centromere on inactivation pattern. *J. Med. Genet.*, **19**: 463-465, 1982.
- [94] ROMER T. E., Badania nad subiektywizmem oceny ciała Barra, *Endokr. Pol.*, **20**: 576-583, 1969.
- [95] — Pora roku i temperatura powietrza a odsetek chromatyny płciowej, *Endokr. Pol.*, **21**: 219-229, 1970.
- [96] — Zagadnienie chromatyny płciowej, *Endokr. Pol.*, **21**: 47-63, 1970.
- [97] — Odsetek chromatyny płciowej w trakcie leczenia Metylandrostendiolema, *Endokr. Pol.*, **21**: 231-238, 1970.
- [98] ROSEN P. P., SAVINO A., MENEDEZ-BOTET C., URBAN J. A., MIKE V., SCHWARTZ M. K., MELAMED M. R., Barr body distribution and estrogen receptor protein in mammary carcinoma, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **7**: 491-499, 1977.
- [99] ROWLEY J., MULDAL S., LINDSTEN J., GILBERT C. W., H<sup>3</sup>-thymidine uptake by a ring X chromosome in a human female, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**: 779-786, 1964.
- [100] RUSSELL L. B., The genetics of mammalian sex chromosomes, *Science*, **133**: 1795-1803, 1961.
- [101] SARTO G. E., THERMAN E., Replication and inactivation of a dicentric

- X formed by telomeric fusion, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **136**: 904-911, 1980.
- [102] SCHEMPP W., MEER B., Cytologic evidence for three human X-chromosomal segments escaping inactivation, *Hum. Genet.*, **63**: 171-174, 1983.
- [103] SCHECKPEPER B. J., WILLARD H. F., SMITH K. D., Isolation and characterization of cloned human DNA fragments carrying reiterated sequences common to both autosomes and the X chromosome, *Nucleic Acid Res.*, **9**: 1853-1872, 1981.
- [104] SCHMID W., DNA replication patterns of human chromosomes, *Cytogenetics*, **2**: 175-193, 1963.
- [105] SHETTY K. T., SHARMA N. L., WAHAL K. M., Sex chromatin in prednisone treated children, *Brit. Med. J.*, **84-86**, 1966.
- [106] SHIRAIISHI Y., Differential reactivity in mammalian chromosomes. I. Relation between spacial segments and late-labeling patterns of DNA synthesis in human X-chromosomes, *Chromosoma*, **36**: 211-217, 1972.
- [107] SHOWS T. B., SAKAGUCHI A. Y., NAYLOR S. L., Mapping the human genome cloned genes, DNA polymorphisms, and inherited disease, *Advances in Human Genet.*, **12**: 341-451, 1982.
- [108] SKOLNICK M. H., FRANCKE U., Report of the committee on human gene mapping by recombinant DNA techniques, *Cytogenet. Cell Genet.*, **32**: 194-204, 1982.
- [109] SLEZINGER S. I., PROKOFIEWA-BELGOWSKAYA A. A., Replications of human chromosomes in primary cultures of embryonic fibroblasts. I. Interchromosomal asynchrony of DNA replication, *Cytogenetics*, **7**, 337-346, 1968.
- [110] SMETHURST M., BISHUN N. P., WILLIAMS D. C., Relationship between X chromosome activation, Barr body frequency and oestrogen receptor status in human breast cancer: a hypothesis, *Oncology*, **37**: 30-32, 1980.
- [111] SOHVAL A. R., CASSELMAN W. G. B., Alteration in size of nuclear sex-chromatin mass (Barr body) induced by antibiotics, *Lancet*, **2**: 1386-1388, 1961.
- [112] STEFFEN J. A., STOLZMANN W. M., Studies on in vitro lymphocyte proliferation in cultures synchronized by the inhibition of DNA synthesis. I. Variability of S plus G2 periods of first generation cells, *Expt. Cell Res.*, **56**: 453-460, 1969.
- [113] STEFFEN J., WARENIK A., DNA replication patterns of structurally altered X chromosomes in three cases of Turner's syndrome with 45,X/46,XXqi; 45,X/56,XXr and 45,X/46,XXq-? karyotypes, *Genet. Pol.*, **10**: 294-302, 1969.
- [114] SUTHERLAND G. R., Heritable fragile sites on human chromosomes. I. Factors affecting expression in lymphocyte culture, *Am. J. Hum. Genet.*, **31**: 125-135, 1979.
- [115] TAVARES A. S., Sex chromatin in tumor cells, *Acta Cytol.*, **6**: 90-94, 1962.
- [116] THERKELSEN A. J., PETERSEN G. B., Frequency of sex-chromatin-positive cells in the logarithmic and postlogarithmic growth phases of human cells in tissue culture, *Expt. Cell Res.*, **28**: 588-590, 1962.
- [117] THERMAN E., DENNISTON C., SARTO G. E., ULBER M., X chromosome constitution and the human female phenotype, *Hum. Genet.*, **54**: 133-143, 1980.
- [118] THERMAN E., PÄTAU K., Abnormal X chromosomes in man: origin, behaviour and effects, *Humangenetik*, **25**: 1-16, 1974.
- [119] THERMAN E., SARTO G. E., PÄTAU K., Center for Barr body condensa-

- tion on the proximal part of the human Xq: a hypothesis, *Chromosoma*, **44**: 361-366, 1974.
- [120] TIEPOLO L., ZUFFARDI O., FRACCARO M., di NATALE D., GARGANTINI L., MÜLLER C. R., ROPERS H. H., Assignment by deletion mapping of the steroid sulfatase X-linked ichthyosis locus to Xp223, *Hum. Genet.*, **54**: 205-206, 1980.
- [121] Van den BERGE H., FRYNS J. P., X/X translocation in a patient with Turner's syndrome, *Hum. Genet.*, **20**: 377-380, 1973.
- [122] Van DYKE D. L., ABRAHAM J. P., MAEDA K., WEISS L., POEL M., Multiple active X chromosomes in myelofibrosis with myeloid metaplasia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **3**: 137-144, 1981.
- [123] VARELLA-GARCIA M., TAJARA E. H., GAGLIARDI A. R. T., Structural aberration of the X chromosome in a patient with gonadal dysgenesis. An approach to karyotype-phenotype correlation, *J. Med. Genet.*, **18**: 228-231, 1981.
- [124] WILLARD H. F., Tissue-specific heterogeneity in DNA replication patterns of human X chromosomes, *Chromosoma*, **61**: 61-73, 1977.
- [125] WILLARD H. F., BREG W. R., Human X chromosomes: synchrony of DNA replication in diploid and triploid fibroblasts with multiple active or inactive X chromosomes, *Somatic Cell Genet.*, **6**: 187-198, 1980.
- [126] WILLARD H. F., LATT S. A., Analysis of deoxyribonucleic acid replication in human X chromosomes by fluorescence microscopy, *Am. J. Hum. Genet.*, **28**: 213-227, 1976.
- [127] WIŚNIEWSKA-ROSZKOWSKA K., Wpływ starzenia się na obraz chromatyny płciowej, *Folia Med. Lodz.*, **4**: 63-103, 1967.
- [128] WOLF U., FRACCARO M., MAYEROVÁ A., HECHT T., MARASCHIO P., HAMEISTER H., A gene controlling H-Y antigen on the X chromosome. Tentative assignment by deletion mapping to Xp223, *Hum. Genet.*, **54**, 149-154, 1980.
- [129] WYSS D., DeLOZIER C., DANIELL J., ENGEL E., Structural anomalies of the X chromosome: personal observation and review of nonmosaic cases, *Clin. Genet.*, **21**: 145-159, 1982.
- [130] YU Ch. W., CHEN H., MORRISON J., Kinetics of DNA replication in a dicentric X chromosome formed by long arm to long arm fusion, *Hum. Genet.*, **56**: 71-79, 1980.
- [131] YU C. W., PRIEST J. H., BYRD J. R., DNA replication sequence in a dicentric (functionally monocentric) X chromosome formed by the joining of two X chromosomes at region p22. *Am. J. Med. Genet.*, **11**: 305-317, 1982.
- [132] ZAKHAROV A. F., BARANOVSKAYA L. I., IBRAIMOV A. I., BENJUSCH V. A., DEMINTSEVA V. S., OBLAPENKO N. G., Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. II. 5-bromodeoxyuridine and 5-bromodeoxycytidine revealed differentiation in human chromosomes, *Chromosoma*, **44**: 343-359, 1974.
- [133] ZAKHAROV A. F., EGOLINA N. A., Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUdR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes, *Chromosoma*, **38**: 341-365, 1972.

Otrzymano: 13 marca 1984 r.

Przyjęto: 9 kwietnia 1984 r.

Adres autora: *Sterlinga* 3, 91-425 Łódź





## CHROMOSOMY PŁCIOWE CZŁOWIEKA. WYBÓR INFORMACJI. CZEŚĆ II — CHROMOSOM Y

SEX CHROMOSOMES OF MAN. SELECTION OF INFORMATION.  
PART II — CHROMOSOME Y

Bogdan KAŁUŻEWSKI

Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Endokrynologii AM w Łodzi  
Department of Medical Genetics, Institute of Endocrinology, Medical Academy  
of Łódź

*Streszczenie.* Chromosom Y należy do najmniejszych chromosomów w kariotypie człowieka i charakteryzuje się znamionym polimorfizmem regionu heterochromatycznego. Jedynie kilka genów lokalizuje się w chromosomie Y, z których gen lub geny determinujące męski kierunek różnicowania należą do najlepiej poznanych. Szybki postęp w doskonaleniu technik cytogenetycznych i biochemicznych umożliwił dokładniejsze poznanie struktury i funkcji euchromatyny Y oraz heterochromatyny Y. Analiza skutków klinicznych w przypadkach patologii chromosomu Y pozwoliła na bardziej precyzyjne przypisanie różnorodnych funkcji genów oraz specyficznych sekwencji DNA do poszczególnych subregionów tego chromosomu.

*Summary.* Chromosome Y is one of the smallest chromosomes of the human karyotype and it is characterized by the very variable polymorphism of the heterochromatic region. Just few genes are localized in this chromosome, among which the gene or genes determining the maleness are the mostly known. The progress in cytological and biochemical techniques enabled to recognize the structure and function of the Y euchromatin and heterochromatin. The analysis of the clinical consequences in cases of the Y chromosome pathology made it possible to describe different functions, genes and specific DNA sequence in the subregions of the chromosome.

### MORFOLOGICZNE CECHY CHROMOSOMU Y

Odkrycie chromatyny płciowej Y wiąże się powszechnie z nazwiskiem Pearsona i Bobrowa [78], jednak sugestie na temat istnienia komórkowego dimorfizmu płciowego wysuwano kilkadziesiąt lat wcześniej.

T. Caspersson (informacja osobista), jeszcze przed II wojną światową, mierząc fluorescencję wzbudzoną w jądrach komórkowych zanotował fakt, że — statystycznie oceniając — fluorescencja ponad komórkami osobników męskich jest silniejsza niż nad jądrami komórkowymi osobników żeńskich. Wynik ten jednak nie został opublikowany. Dopiero badania Zech [104], współpracownicy T. Casperssona, ujawniające fakt zwiększonego wychwytywania fluoryzujących pochodnych akrydyny przez terminalny region ramion długich chromosomu Y, stały się podstawą odkrycia przez Pearsona ciała Y. Chromatyna płciowa Y jest widoczna w jądrze spoczynkowym pod postacią okrągłej, fluoryzującej grudki. Test chromatyny płciowej Y stał się rutynowym badaniem klinicznym w zaburzeniach cielesno-płciowych [54, 80]. W normie, chromatyna płciowa Y występuje w 30-80% komórek mężczyzn oraz 0-8% komórek kobiet [52]. Ponieważ każdy prawidłowy chromosom Y posiada zdolność do jasnej fluorescencji, liczba grudek chromatyny Y jest równa liczbie chromosomów Y w kariotypie. Chromosom Y jest chromosomem małym, jego względna długość waha się od  $1,82 \pm 0,53$  do  $2,21 \pm 0,3$  [47]. Chromosom Y ssaków naczelnych różni się znacznie wielkością u poszczególnych gatunków, ale zwykle jest chromosomem bardzo małym, wyjątek stanowi chromosom Y małpy *Cercopithecus diana* [86]. Najmniejszy chromosom Y u ssaków naczelnych występuje u *Pan troglodytes*, uważany za protoplastę ewolucyjnego ssaków naczelnych. Porównując intensywność fluorescencji regionu terminalnego chromosomu Y, ludzki chromosom najbardziej podobny jest do chromosomu Y goryla, co świadczy, że cecha ta jest nowa w ewolucji naczelnych.

Uważa się, że 1,5-18% mężczyzn posiada chromosom Y odbiegający rozmiarami od przeciętnego [93]. Cohen i wsp. [20] podają, że Japończycy mają znamienne dłuższy chromosom Y, w porównaniu z Indianami, Murzynami, Żydami oraz Aryjczykami, przy czym Żydzi mają najmniejszy chromosom wśród wszystkich badanych grup narodowościowych. Istnieją doniesienia o etnicznych różnicach w długości chromosomu Y [68]. Z drugiej strony, zgodnie z holandrycznym typem dziedziczenia chromosomu Y w obrębie rodziny, chromosom ten charakteryzuje się stabilnością rozmiaru, co proponuje się wykorzystać w praktyce lekarskiej do potwierdzenia bądź wykluczenia ojcostwa w tych przypadkach, gdy zawiodą metody immunologiczne [28].

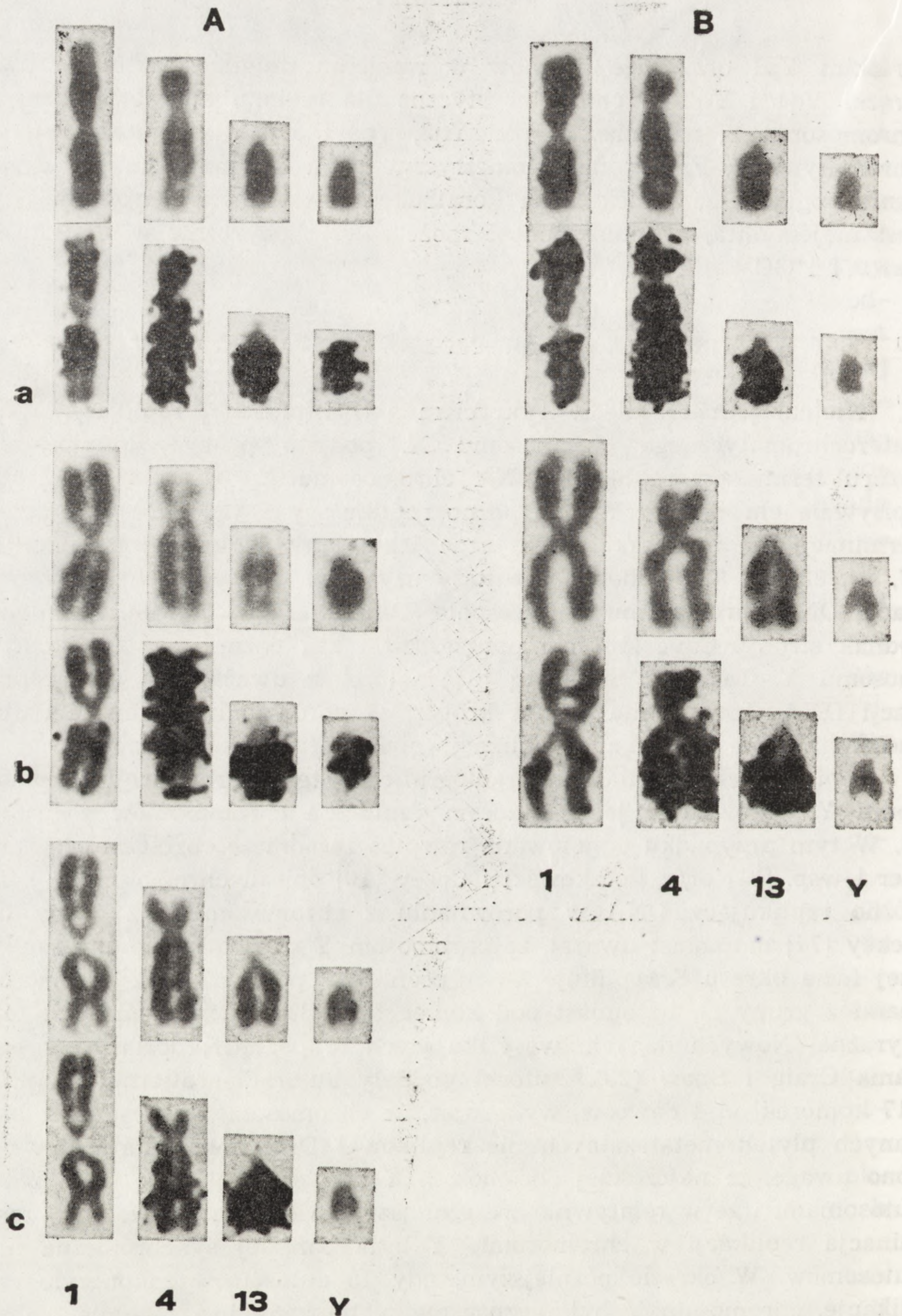
Zmienność wielkości chromosomu Y zależy głównie od polimorfizmu bloku heterochromatyny Y [8]. Manolov i wsp. [72] rozróżnili w bloku heterochromatyny Y dwa prążki Yq2 i Yq3, z których pierwszy charakteryzuje się silniejszą fluorescencją. Jalal i wsp. [50], barwiąc heterochromatynę Y techniką prążków Q i C oraz dokonując pomiarów densytometrycznych, zidentyfikowali jeden prążek w ramieniu

krótkim Yp1 oraz pięć prążków w ramieniu długim, z których dwa prążki Yq1 i Yq2 są charakterystyczne dla regionu euchromatycznego chromosomu Y, natomiast prążki Yq3, Yq4 i Yq5 dla regionu heterochromatyny Y. Zapisy densytometryczne pozwoliły autorom na wyrażenie poglądu, że molekularna konstrukcja bloku heterochromatyny Y jest niejednolita, a heterogenność może zależeć od różnic w zawartości par AT i GC.

#### KINETYKA REPLIKACJI DNA CHROMOSOMU Y

Niemal jednocześnie z wykryciem asynchronicznej replikacji DNA heterochromatycznego chromosomu X, podjęto próby zdefiniowania wzoru terminacji replikacji DNA chromosomu Y. Większość badaczy opisywała chromosom Y jako późno replikujący DNA, choć opóźnienie terminacji nie było tak dramatyczne jak w przypadku chromosomu X [7, 58, 83, 89, 92]. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach nad replikacją DNA chromosomu Y w zespole Klinefeltera [3, 30, 46]. Z drugiej jednak strony, Cave [18] nie potwierdził faktu późnej replikacji chromosomu Y. Takagi i Sandberg [95] natomiast uważali, że czas replikacji DNA chromosomu Y jest krótszy w porównaniu z innymi chromosomami, ale terminacja replikacji niekoniecznie jest późna.

Inni badacze oceniali autoradiograficzne tempo replikacji chromosomu Y, porównując je ze wzorem replikacji chromosomów z grupy G. W tym przypadku odnotowano również zasadnicze rozbieżności: Ferrer i wsp. [31] oraz Boczkowski i Casey [10] opisali chromosom Y jako późno replikujący DNA w porównaniu z chromosomami z grupy G, Ockey [77] natomiast uważał, że chromosom Y w relatywnie wcześniejszej fazie okresu S replikuje DNA później w porównaniu z chromosomami z grupy G, natomiast pod koniec fazy S różnica ta nie jest tak wyraźna. Nowych danych, weryfikujących te poglądy, dostarczyły badania Craig i Shaw [23]. Autorki poddały autoradiograficznej analizie 317 komórek od 4 dawców, wykazując, że chromosom Y w żadnej z badanych płytek metafazalnych nie replikował DNA jako ostatni. Zwrócono uwagę, że najczęściej chromosom Y kończył replikację wraz z 15 autosomami i że w relatywnie wcześniejszej fazie późnego okresu S terminacja replikacji w chromosomie Y była bardziej synchroniczna niż autosomów. W okresie późniejszym, gdy 15 autosomów zakończyło replikację, chromosom Y był nieznacznie piętnowany lub zupełnie wolny od piętna. Autorki zwróciły uwagę, że powyższy scenariusz replikacji można odnieść do większości komórek, ale obok tego istnieje wyraźna dychotomia replikacji chromosomu Y. W płytkach o bardzo zbliżonym piętnie ponad autosomami, innymi słowy, w podobnej fazie okresu S,



Ryc. 1. Przy użyciu techniki autoradiografii  $H^3$ -TdR badano kinetykę terminacji replikacji DNA chromosomu Y oraz chromosomów 1, 4 i 13. W trakcie porównywania wzoru kinetyki terminacji replikacji DNA płytek metafazalnych szeregu A z B, nasuwa się obserwacja, że chromosom Y może kończyć replikację DNA relatywnie późno lub wcześnie w porównaniu z chromosomami 1, 4 i 13

chromosom Y może być późno lub wcześniej replikujący. Niemal jednocześnie zjawisko dychotomicznej replikacji DNA chromosomu Y było opisane przez Kałużewskiego i wsp. [56]. Autorzy, dzięki zaadaptowaniu techniki synchronizacji hodowli limfocytów, opisanej przez Steffena i Stolzmann [91], mieli możliwość przebadania inicjacji replikacji DNA chromosomu Y na początku okresu S. Badając kariotyp mozaikowy 47,XXY/48,XXXY wykazano, że opóźnienie inicjacji replikacji heterochromosomu X i chromosomu Y dotyczyło tylko części komórek. Chromosom Y tylko w 30% komórek był wolny od piętna (przy wszystkich piętnowanych autosomach), co świadczy o asynchronicznej inicjacji replikacji tego chromosomu. Asynchroniczny start replikacji DNA chromosomu Y w części komórek może usprawiedliwiać asynchroniczną terminację replikacji. Zjawisko dychotomicznej terminacji replikacji DNA chromosomu Y pod koniec fazy S przedstawiono na ryc. 1.

Podsumowując dotychczasowe uwagi o morfologii i replikacji DNA chromosomu Y, można zauważyć:

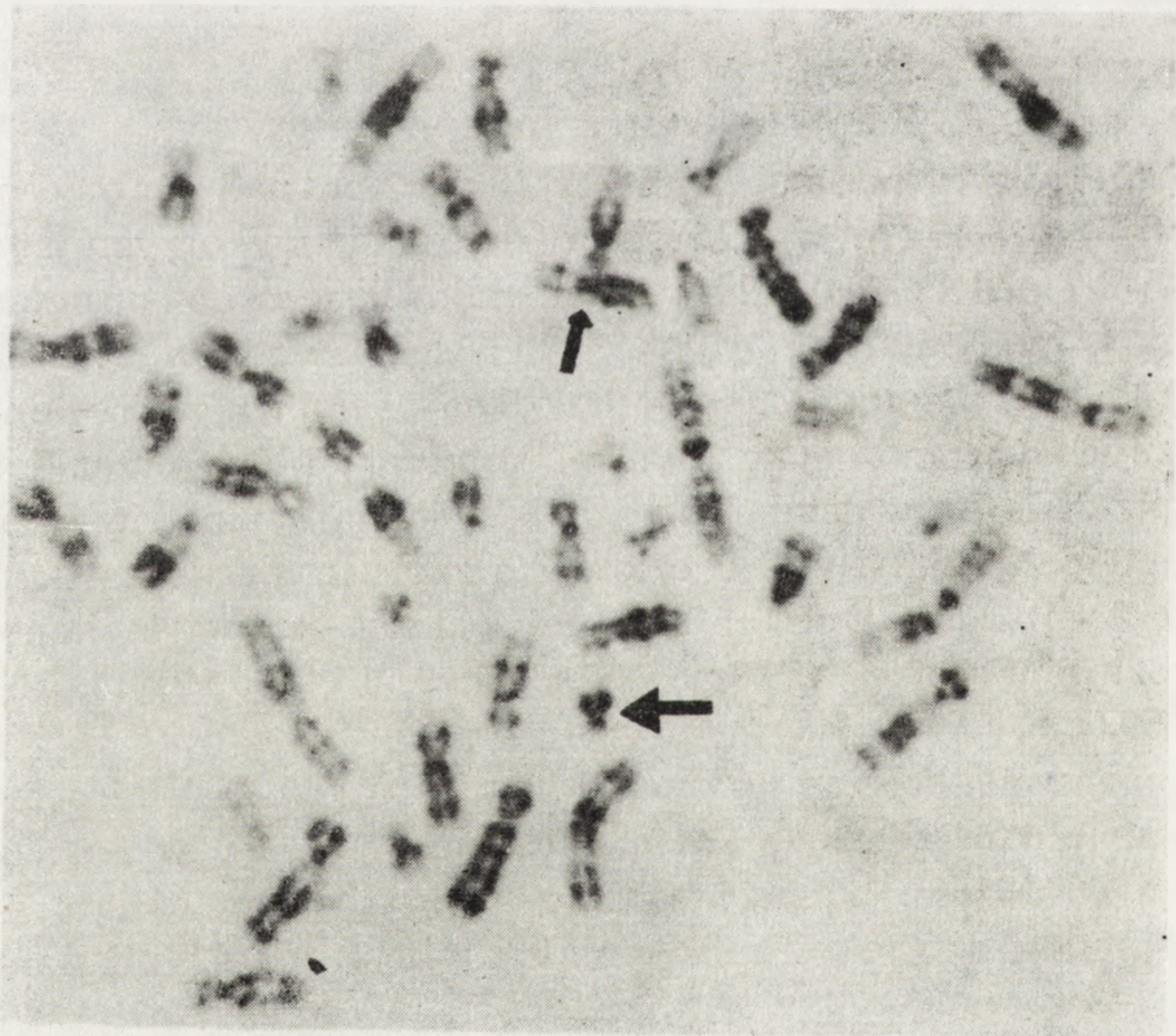
1. Cechą charakterystyczną chromosomu Y jest zmienność zależna głównie od polimorfizmu bloku heterochromatyny Y.
2. Inicjacja i terminacja replikacji DNA chromosomu Y przebiega dychotomicznie.

#### MOLEKULARNA STRUKTURA HETEROCHROMATYNY Y

Podobnie jak to miało miejsce w badaniach nad chromosomem X, wprowadzenie technik o wysokiej rozdzielczości, wykorzystujących właściwości 5-bromodezoksyurydyny, dokonało znacznego postępu w badaniach nad molekularną strukturą heterochromatyny Y. Lin i wsp. [65, 66] jako pierwsi zaobserwowali boczną asymetrię w regionach centromerycznych chromosomów mysich, komórek, które przez jeden cykl życiowy poddane były działaniu BrdU. Podobną asymetrię fluorescencji regionu heterochromatyny Y u człowieka zaobserwowali Latt i wsp. [63] i Angel i Jacobs [1]. Opisano również boczną asymetrię konstytutywnej heterochromatyny w chromosomach 1, 9, 15, 16, 17, 19, 20, 21 i 22 [1, 2, 36, 59, 63].

Występowanie bocznej asymetrii konstytutywnej heterochromatyny tłumaczy się asymetrycznym rozmieszczeniem par AT w poszczególnych łańcuchach DNA [66]. Łańcuch DNA z większą zawartością tyminy służy za szablon dla wbudowania mniejszej ilości BrdU niż łańcuch symetryczny. Proces fotolizy chromatydy zawierającej większość ilości BrdU, w trakcie protokołu barwienia FPG, jest bardziej wydajny niż odpowiedniego regionu chromatydy siostrzanej [41]. W płytkach metafazalnych uzyskanych z komórek hodowanych przez dwa cykle życiowe

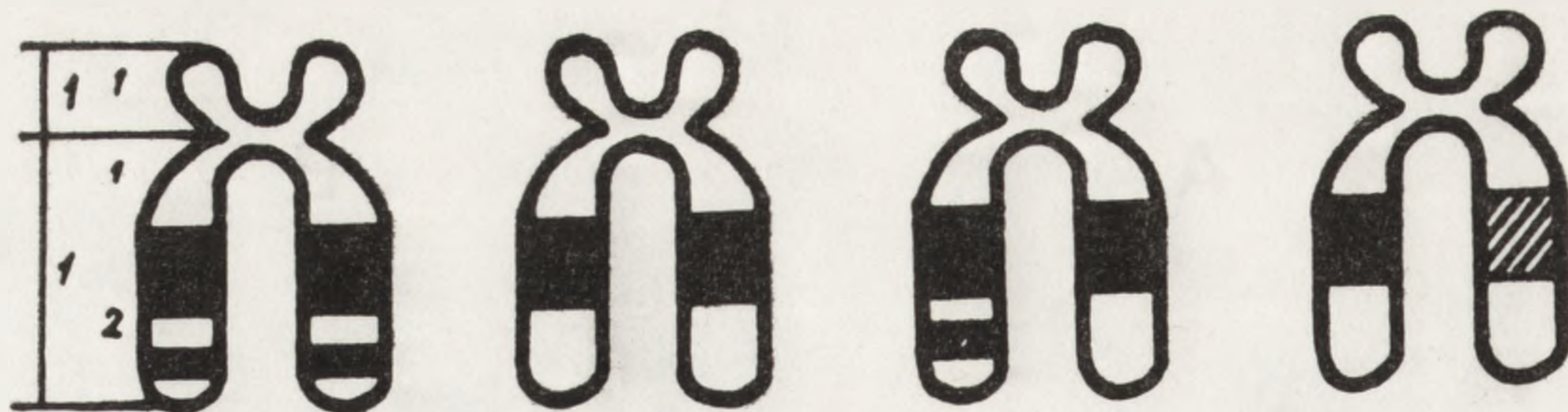
w obecności BrdU i poddanych barwieniu FPG, ujawniono trzy typy chromatydowego zróżnicowania [38]: typ I — z typowym zróżnicowaniem chromatyd (SCD), typ II — z symetrycznym, delikatnie zabarwionym terminalnym regionem heterochromatyny Y, typ III — z dwoma regionami SCD, przedzielonymi regionem zabarwienia symetrycznego. Autorzy sugerują, że oba regiony lateralnej asymetrii opisane w heterochromatynie Y zawierają odmienne rodzaje satelitarnego DNA. Rozwijając pierwotną hipotezę, Limon i wsp. [64] zaproponowali technikę barwienia ujawniającą w płytkach metafazalnych M1 dwa regiony lateralnej asymetrii. I region LA (lateral asymmetry) w regionie terminalnym Yq12 oraz II region LA w części proksymalnej heterochromatyny Y. Wykazano dalej, na podstawie badań wykorzystujących jednocześnie technikę QFQ i FPG, że region II LA zlokalizowany jest na granicy pomiędzy euchromatyną i heterochromatyną chromosomu Y. Wskazano również na użyteczność proponowanej modyfikacji techniki FPG dla lokalizowania punktów złamań w przypadkach aberracji strukturalnych chromosomu Y. Technika ta w przypadku chromosomu Y przewyższa rozdzielczością dotychczas stosowane klasyczne techniki prążkowe.



Ryc. 2. Efekt cytologiczny zróżnicowanego barwienia BHG. Dłuższa strzałka wskazuje chromosom Y, krótsza — izocykliczny chromosom X



Ryc. 3. Przy użyciu techniki MTX-BHG poddano ocenie kinetykę replikacji DNA chromosomu Y oraz chromosomów 1, 4 i 13. Uwagę zwraca dichotomiczny wzór terminacji replikacji chromosomu Y, A — wzór dominujący, B — wzór alternatywny. Charakterystyczna jest również asymetria terminacji replikacji DNA chromosomu Y widoczna w płytkach dA, aB, bB oraz cB



Ryc. 4. Schematy ilustrujące wzór terminacji replikacji DNA chromosomu Y. Charakterystyczna jest asymetria terminacji regionu terminalnego (odpowiednik I regionu LA) oraz regionu granicznego euchromatyny Y i heterochromatyny Y (odpowiednik II regionu LA)

Fakt występowania w chromosomie Y dwóch regionów LA, zaobserwowany przez Limona i wsp. [64], został potwierdzony podczas badań nad replikacją DNA [16, 52].

Schempp i Müller [82] w płytkach prometafazalnych zidentyfikowali 8 replikacyjnych subprążków, w tym dwa w ramieniu Yp, dwa w części euchromatycznej chromosomu Y oraz 4 prążki w bloku heterochromatyny Y. Terminalny region Yp charakteryzował się u wszystkich 8 badanych mężczyzn wczesną terminacją replikacji i — jak na to zwrócili uwagę Müller i Schempp [76] — replikował w zbliżonym czasie z terminalnym regionem Xp. Fakt ten, zdaniem autorów, może być interpretowany jako ewolucyjny relikw przemawiający za tym, że heteromorficzne chromosomy płciowe ssaków wyższych wywodzą się od wspólnego przodka. Blok heterochromatyny Y, zdaniem autorów, charakteryzuje się znaczną międzykomórkową i międzyosobniczą zmiennością wzoru replikacji. Wraz z obserwowaną zmiennością wzoru replikacji zmieniała się wyrazistość wzoru LA. Autorzy wyróżnili trzy typy płytek metafazalnych: (1) komórki bez wzoru LA w chromosomie Y, (2) komórki z częściową boczną asymetrią, (3) komórki z boczną asymetrią obejmującą cały blok heterochromatyny Y. Obok różnic międzyosobniczych autorzy zauważyli, że wyrazistość wzoru LA maleje wraz z badaniem płytek we wcześniejszych stadiach podziału komórkowego niż metafaza, co może przemawiać za tym, że również upakowanie heterochromatyny może mieć związek ze zmiennością zjawiska LA.

Zbliżony okres terminacji replikacji DNA regionów Yp oraz Xp jest jednym z cytogenetycznych dowodów przemawiających za homologią obu regionów. Dowodów genetycznych potwierdzających funkcjonalne pokrewieństwo obu loci dostarczyli Goodfellow i wsp. [39]. Autorzy śledząc metodami immunologicznymi produkcję antygenu 12E7 w hybrydach komórkowych, które z jednej strony były nosicielami translokacji  $Xqter \rightarrow Xp22.3 : Yq1.1 \rightarrow Yqter$  eliminującej region  $Xp22.3 \rightarrow pter$ , oraz z drugiej strony oceniając ekspresję genu 12E7 w hybry-



dach zawierających zduplikowany chromosom Y, potwierdzili identyczność locus genowego MIC2, lokalizując go w regionie Xp22.3 oraz Ypter → Yq1 : 1. Locus MIC2 kontrolujący ekspresję antygenu 12E7 unika lyonizacji, stąd funkcjonalne poziomy tego antygenu są zbliżone u kobiet i mężczyzn.

Wyniki badań Camargi i Cervenki [16] nad sekwencją replikacji subprążków chromosomu Y są zbieżne z wynikami Schemppa i Müllera [82]. Camargo i Cervenka [16] odnotowali fakt występowania w obrębie euchromatycznego prążka Yq11 subprążka późno replikującego DNA, identyfikując go z opisanym przez Limona i wsp. [64], II regionem LA zlokalizowanym na granicy euchromatyny z heterochromatyną. Fakt ten znajduje pewne uzasadnienie w badaniach Comingsa [21], z których wynika, że nie wszystkie powtarzalne sekwencje DNA barwią się C(+). Euchromatyczny, późno replikujący subprążek Yq11 jest tego przykładem. Wraz z postępem badań nad sekwencją replikacji subregionów chromosomu Y rozwijano inne techniki różnicujące subprążki euchromatyny i heterochromatyny chromosomu Y. Schnedl i wsp. [85], stosując technikę barwienia DA-DAPI, wykazali obecność w euchromatynie Y subprążka DA-DAPI jasno fluoryzującego/echinomycyna-DAPI negatywnie fluoryzującego, który można identyfikować z opisywanym prążkiem Yp11, negatywnie barwiącym się techniką prążków C, ale bogatym w powtarzalne sekwencje A-T. Autorzy sugerują, że opisywany subprążek zawiera „specyficzny-męski” DNA. Goyanes [40], stosując sekwencyjne barwienie AgNOR i barwnikiem Giemsa, w blisko 50% badanych płytek metafazalnych, pochodzących od trzech mężczyzn, zaobserwował dwa subprążki regionu Y-euchromatycznego. Podobnych obserwacji dokonali Yunis i wsp. [103], barwiąc techniką prążków G prometafazalne chromosomy Y.

Imponujący rozwój genetyki molekularnej zaowocował w badaniach nad chromosomem Y, identyfikacją specyficznego-męskiego, satelitarnego DNA [11, 22, 62]. Stało się to możliwe dzięki analizie restrykcyjnej enzymem Hae III, satelitarnego DNA genomu człowieka. Zidentyfikowano specyficzne restrykcyjne prążki 3.4 kb oraz 1.8 kb. Wykazano, że zawartość sekwencji 3.4 kb jest proporcjonalna do zmian wielkości bloku heterochromatyny Y [73]. Bostock i wsp. [11] sugerowali, że pewne powtarzalne sekwencje 3.4 kb zlokalizowane są również w euchromatynie. Schmidtke i Schmid [84] wykonali analizę restrykcyjną Hae III powtarzalnych sekwencji DNA z nieprawidłowym chromosomem Y w tym: w przypadku polisomii Y, i(Yq), Y-, tandemowej duplikacji Y, translokacji Y-autosomy. W przypadkach delecji Yq- wykazano deficyt elektroforetycznego prążka restrykcyjnego 2.1 kb Y-DNA. Porównanie poszczególnych przypadków pozwoliło autorom sformułować następują-

ce wnioski: (1) sekwencja 3.4. kb jest rozproszona w heterochromatynie Y i prawdopodobnie w niewielkim subprążku euchromatyny-Y, (2) sekwencja 2.1. kb jest głównie zlokalizowana w regionie terminalnym Yq, (3) obszar heterochromatyny Y zawierający sekwencję 2.1. kb jest regionem polimorficznym.

Podsumowując informacje o zjawisku bocznej asymetrii chromosomu Y oraz molekularnej budowie, można zauważyć:

1. Występowanie wzoru LA w chromosomie Y charakteryzuje się zmiennością;

2. W chromosomie Y obserwuje się podwójny wzór bocznej asymetrii, który może odzwierciedlać różnice w zawartości satelitarnego DNA.

#### ROLA CHROMOSOMU Y W DETERMINACJI PIERWOTNEJ GONADY I DALSZYM JEJ RÓŻNICOWANIU

Rola chromosomów płciowych człowieka w determinacji pierwotnej niezróżnicowanej gonady jest przedmiotem zainteresowań od blisko 25 lat. Powszechnie akceptowany jest pogląd, że ważną — jeżeli nie decydującą — rolę w tym pierwotnym akcie determinacji odgrywają czynnik lub czynniki związane z chromosomem Y. Od roku 1959 wiadomo, że osobnik obarczony kariotypem 47,XXY jest mężczyzną [49], podczas gdy osoba posiadająca kariotyp 45,X jest kobietą [33]. W przypadkach zespołu Klinefeltera 48,XXXY [4] oraz 49,XXXXY [34], determinacja płci jest męska, jakkolwiek osobnicy tacy charakteryzują się niepłodnością, ginekomastią, upośledzeniem umysłowym. Pewnym odstępstwem od tej reguły są przypadki „XX-mężczyzn”, przypadki prawdziwego hermafrodytyzmu oraz przypadki dysgenezy gonad z kariotypem 46,XY. Bardziej precyzyjna lokalizacja czynnika/czynników determinujących „męskość” jest możliwa dzięki analizie przypadków aberracji strukturalnych tego chromosomu, takich jak: chromosom Y dwucentromeryczny, izochromosom Y, chromosom Y w formie pierścienia, Y-autosomy, X-Y oraz Y-Y translokacje oraz delecje chromosomu Y. Z analiz takich wyłącza się pericentryczne inwersje, które obok heteromorfizmu regionu silnej fluorescencji Yq11 → qter (I typ heteromorfizmu) oraz heteromorfizmu regionu Ynf (II typ heteromorfizmu) określane są mianem heteromorfizmu III typu [97]. Jacobs i Ross [48] pierwsi wyrazili pogląd, że czynnik odpowiedzialny za determinację płci męskiej zlokalizowany jest w ramieniu Yp. Dobrze ilustruje ten pogląd porównanie przypadków 46,X,i(Yq), które są kobietami, z niektórymi przypadkami posiadającymi w kariotypie komponentę dic(Y), które są mężczyznami [27]. Davis [27] przytacza 24 opisy kariotypów zawierających linie

46,X,r(Y). We wszystkich przypadkach został wyeliminowany silnie fluorujący blok heterochromatyny oraz mniejszy lub większy fragment ramion Xq. W czterech przypadkach nie obserwowano mozaikowości z udziałem linii 45,X. Obraz kliniczny cytowanych przypadków był zróżnicowany i zawierał opisy typowych przypadków zespołu Turnera, prawdziwego hermafrodytyzmu, ale również kobiet i mężczyzn, których jedyną wspólną cechą była niepłodność. Różnorodność opisów klinicznych przypadków z dic(Y) oraz r(Y) stanowiła inspirację do formułowania hipotez o istnieniu więcej niż jednego genu determinującego płęć męską. Boczkowski [9] sugerował obecność dwóch różnych genów zlokalizowanych w ramieniu Yp oraz jednego w Xp. Gen zlokalizowany w sąsiedztwie centromeru miał być odpowiedzialny za inicjację determinacji pierwotnej gonady, gen położony terminalnie w ramieniu Yp byłby odpowiedzialny za dalsze dojrzewanie jądra, natomiast genowi Xp przypisywano rolę supresora antygeny H-Y. Siebers i wsp. [87], opisując przypadek mozaikowości 45,X/46,X,i(Yp) oraz dokonując przeglądu literatury, proponują zlokalizowanie genu regulatora odpowiedzialnego za pierwotny akt determinacji niezróżnicowanej gonady w proksymalnym regionie Yq oraz genu odpowiedzialnego za dojrzewanie gonady w ramieniu Yp. Weryfikację powyższych hipotez utrudnia fakt, że zwykle aberracjom strukturalnym chromosomu Y towarzyszy linia mozaikowa 45,X, której udziału w kształtowaniu obrazu klinicznego nie można pominąć.

Interesująca dla endokrynologa jest koincydencja zaburzeń płodności chorych z wykrywanymi aberracjami strukturalnymi. Davis [27], dokonując oceny kilkunastu przypadków delecji (Xq-) bądź translokacji Y/autosomy (w których doszło do eliminacji regionu Ynf euchromatyny), uważa zależność pomiędzy integralnością Ynf euchromatyny a płodnością za prawdopodobną. Przyjęcie takiej hipotezy miałoby wymierne znaczenie lekarskie. Jednoznaczna akceptacja takiego poglądu utrudnia jednak fakt, że większość omówionych przypadków była w okresie przed osiągnięciem dojrzałości płciowej, u innych nie badano nasienia, wreszcie w pozostałych przypadkach podejrzewano niepłodność jedynie na podstawie rozpoznawanego hipogonadyzmu. Wydaje się, że przy lokalizacji punktów złamań w tak małym chromosomie jak chromosom Y, należy zabiegać o wdrożenie technik o większej rozdzielczości niż klasyczne techniki prążkowe. Wdrożenie takich technik do praktyki cytogenetycznej z jednej strony oraz kompleksowa ocena rozwoju cielesno-płciowego chorych może przynieść wymierny postęp w wysiłkach nad określeniem zależności genotypowo/fenotypowych u chorych z aberracjami chromosomu Y.

Interesujących informacji na temat roli chromosomów płciowych

w determinacji pierwotnej gonady oraz dalszym jej różnicowaniu dostarczają niemozaikowe przypadki translokacji X-Y. Bernstein i wsp. [6] opisali mężczyznę z objawami hipogonadyzmu, u którego rozpoznano translokację 46,X t(X;Y) (p22; p11). W większości komórek (60-70%) inaktywacji uległ nieprawidłowy chromosom, w pozostałych komórkach inaktywacja objęła prawidłowy chromosom X. U chorego wykryto prawidłowy poziom antygenu H-Y. W żadnej spośród 147 płytek metafazalnych uzyskanych z limfocytów oraz 298 płytek metafazalnych uzyskanych z fibroblastów nie wykryto prawidłowego chromosomu Y. W przypadku opisanym przez Hechta i wsp. [42] wykryto „de novo” niezrównoważoną translokację Y-X. Analiza cytogenetyczna wykorzystująca rozdzielczość techniki BHG (BrdU-Hoechst-Giemsa) pozwoliła dokładnie rozpoznać punkty złamań 46,X,t(X;Y) (Xqter → Xp11.2 :: Yq11 → → Yqter) oraz określić wzór replikacji DNA. Wykryto zmienny wzór replikacji bloku heterochromatyny Y, a w 17 na 40 badanych płytek stwierdzono obecność wzoru LA. We wszystkich badanych płytkach metafazalnych inaktywacji uległ der(X). Analiza restrykcyjna DNA enzymem Hae III pozwoliła zidentyfikować prążki restrykcyjne 3.4 kb i 2.1. kb („specyficzny-męski” DNA) w typowym dla mężczyzn stężeniu. Wykryto również pośrednie wartości antygenu H-Y. Chora cierpiała na wtórny brak miesiączki oraz nieznaczne upośledzenie wzrostu. W opisywanym przypadku region Xp11.2 → Xpter był monosomicznym. Autorzy sugerują, że fakt ten był odpowiedzialny za wykryte objawy kliniczne oraz obecność pośrednich wartości antygenu H-Y. Za mniej prawdopodobne uznano wyjaśnienie wiążące obecność pośrednich wartości antygenu H-Y oraz objawów klinicznych z faktem wykrycia bloku heterochromatyny Y, któremu najprawdopodobniej nie towarzyszyła euchromatyna Yq.

Jak wynika z powyższych opisów, w przypadkach translokacji Y;X nie można spodziewać się prostych i jednoznacznych zależności pomiędzy aberracją chromosomalną a stanem klinicznym. Prognozując w podobnych przypadkach należy uwzględnić lokalizację punktów złamań chromosomów X i Y, mechanizm translokacji oraz wzór inaktywacji.

Jeszcze bardziej złożonego mechanizmu można się spodziewać w przypadkach dysgenezy gonad 46,XY (zespół Swyera). Ekspresja antygenu H-Y jest związana z obecnością regionu pericentrycznego chromosomu Y(Yp) [60]. Delecja regionu Yp pociąga za sobą zredukowany poziom antygenu H-Y, dysgenezę gonad oraz rozwój żeńskiego fenotypu [81]. Z drugiej strony wykazano, że delecja regionu terminalnego Xp u kobiet może korelować z obecnością antygenu H-Y<sup>+</sup> [100]. Jak już o tym była mowa, nieprawidłowości chromosomu X, Y bądź obu chromosomów wywołują nieprawidłowy funkcjonalnie poziom antygenu H-Y.

O skutkach fenotypowych może decydować również brak bądź nieprawidłowe wykształcenie receptora komórkowego dla antygeny H-Y [98]. Tak więc, niemozaikowe przypadki czystej dysgenezy gonad mogą być rezultatem: (1) strukturalnej delecji genu/genów H-Y ramienia Yp, (2) supresji aktywności genów H-Y zlokalizowanych w chromosomie X bądź w autosomach, (3) brakiem specyficznego receptora dla antygeny H-Y w płodowej gonadzie, (4) brakiem niespecyficznym powierzchniowych miejsc wbudowania antygeny. W dwóch pierwszych przypadkach poziomy antygeny H-Y będą ujemne, w pozostałych dodatnie [5].

Podsumowując powyższy wybór informacji o aberracjach strukturalnych chromosomu Y i ich skutkach, można zauważyć, że:

1. Na podstawie klasycznych technik prążkowych precyzyjna lokalizacja punktów złamań chromosomu Y jest trudna;

2. Trafną ocenę skutków fenotypowych aberracji strukturalnych chromosomu Y komplikuje bardzo częste współistnienie linii komórkowej 45,X;

3. Trudności powyższe potęguje fakt, że chromosom Y jest jednym z elementów w mechanizmie determinacji i różnicowania pierwotnej gonady w kierunku męskim, obok takich czynników, jak inne geny sprzężone z chromosomem X i zlokalizowane w obrębie autosomów uczestniczące w ekspresji antygeny H-Y, a także czynniki immunologiczne i hormonalne.

#### STRUKTURA HETEROCHROMATYNY Y W PRZYPADKACH NIEFLUORYZUJĄCEGO CHROMOSOMU Y

W patologii chromosomu Y osobne miejsce zajmuje problem niefluoryzującego, nieheterochromatycznego chromosomu Y (Ynf). Wykrycie podobnych przypadków ułatwia stosowanie testów chromatyny X i Y. Oba testy w tych rzadkich przypadkach są negatywne. Z drugiej strony wiadomo, że polimorfizm chromosomu Y (typ I — polimorfizmu — patrz wyżej), przede wszystkim dotyczy bloku heterochromatyny Y, która posiada zdolność do jaskrawej fluorescencji, przy zastosowaniu techniki prążków Q, bądź pozytywnego barwienia się przy stosowaniu techniki prążków C [8, 96]. Zredukowanie wielkości bądź zupełny brak regionu heterochromatyny Y jest częstą patologią (polimorfizmem?) chromosomu Y i interpretowane jest jako delecja terminalna Yq-. Do 1981 r. zarejestrowano blisko 85 podobnych przypadków [27]. W pewnych jednak przypadkach chromosom Y nie posiada zdolności do charakterystycznej fluorescencji, chociaż jego długość jest większa od euchromatycznego regionu ojcowskiego chromosomu Y [17, 24, 32, 35, 45, 55, 67, 70, 102]. W wymienionych pracach, u chorych ze zróżnicowanym obra-

zem klinicznym rozpoznawano niefluoryzujący chromosom Y (Ynf). W wielu pracach zwrócono uwagę na fakt, że niefluoryzujący chromosom Y różni się pod wieloma względami od prawidłowego chromosomu Y. Sugerowano, że chromosom ten na drodze przebudowy molekularnej uzyskał odmienne od typowych własności cytochemiczne [13-15, 45, 57]. Prezentowano pogląd, że mechanizmem prowadzącym do przebudowy chromosomu Y jest interstycjalna delecja prążka Yq2 (wg Manollov) oraz paracentryczna inwersja [55]. Odnotowano fakt odmiennej terminacji replikacji DNA chromosomu Ynf w porównaniu z ojcowskim chromosomem Y [13, 32, 45, 55]. Zaproponowano wreszcie hipotezę o zmienionych właściwościach chromosomu Ynf wywołanych zmienionymi relacjami białka chromosomalne/DNA [45]. Kałużewski i wsp. [57] zaproponowali następującą chronologię cytogenetycznych wydarzeń, które mogą doprowadzić do pojawienia się chromosomu Ynf, mozaikowości z udziałem linii 45,X oraz specyficznych skutków klinicznych: „Uszkodzenie pierwotne dotyczy zygoty 46,XY, gdzie na drodze bliżej niesprecyzowanych molekularnych przemian, zmieniają się właściwości powtarzalnych sekwencji DNA terminalnego regionu ramion długich chromosomu Y. Wydarzenie to prowadzi do mitotycznej niestabilności chromosomu Y, co zwiększa ryzyko pojawienia się linii komórkowej 45,X. Objawy kliniczne mogą być wywołane przez następujący mechanizm: geny determinujące męski rozwój gonady, zlokalizowane w pobliżu centromeru, są prawidłowe i determinują rozwój gonady w kierunku męskim. Brak dalszego prawidłowego różnicowania się gonady uwarunkowany jest zarówno przez obecność linii komórkowej 45,X, jak również zmienionych właściwości genów zlokalizowanych w Yq (genów znajdujących się w regionie sąsiadującym z sekwencjami powtarzalnymi Yq), oba zresztą mechanizmy mogą funkcjonować obok siebie. Chorzy z kariotypem 45,X/46,XY oraz żeńskim fenotypem mogą stanowić wynik ilościowego udziału obu w/w mechanizmów”. Pogląd ten został odnotowany w kilkudziesięciu pracach, w kilku pracach podjęto z nim polemikę.

Madan i wsp. [70] przedstawili trzy nowe mozaikowe przypadki niefluoryzującego chromosomu Y, dokonując przeglądu dotychczasowych poglądów na etiologię tego zespołu. Madan zgadza się z opinią o prezygotycznym wydarzeniu prowadzącym do powstania Ynf. Nie zgadza się jednak z poglądem, że tak duży segment DNA, jaki zawarty jest w heterochromatynie Y, na drodze pojedynczej mutacji w pierwszym pokoleniu może ujawnić zmianę sekwencji DNA.

Daniel i wsp. [25] wskazują na duże podobieństwo prezentowanego przez siebie przypadku 1 z przypadkami 1-3 prezentowanymi przez Kałużewskiego i wsp. [57]. Daniel biorąc pod uwagę fakt, że w przypad-

kach 1 i 3 opisanych przez Kałużewskiego wykryto typowo męskie poziomy antygeny H-Y zgadza się, że opisywane chromosomy są chromosomami Y. Autor sugeruje jednak, że opisywane chromosomy są w rzeczywistości dwucentromerycznymi izochromosomami Y, w których jeden z centromerów uległ inaktywacji, tak jak ma to miejsce w opisywanym przez niego przypadku 1.

Priest i wsp. [79] opisali przypadek wykrytego „de novo” niefluoryzującego chromosomu Y. Autorzy odnotowali ten fakt w trakcie diagnostyki prenatalnej. Nie wykryto linii 45,X zarówno w hodowli komórek owodniowych, jak i podczas 60 pasaży fibroblastów skóry noworodka. Obserwacja ta nie potwierdza, zdaniem autorów, mitotycznej niestabilności chromosomu Ynf sugerowanej przez Kałużewskiego i wsp. [57].

Wielu autorów [25, 71, 99] uważa, że chromosom Ynf jest chromosomem dwucentromerycznym, który posiada podwójny region euchromatyny, w którym doszło do wyeliminowania bloku heterochromatyny Y oraz w którym inaktywacji uległ jeden z centromerów.

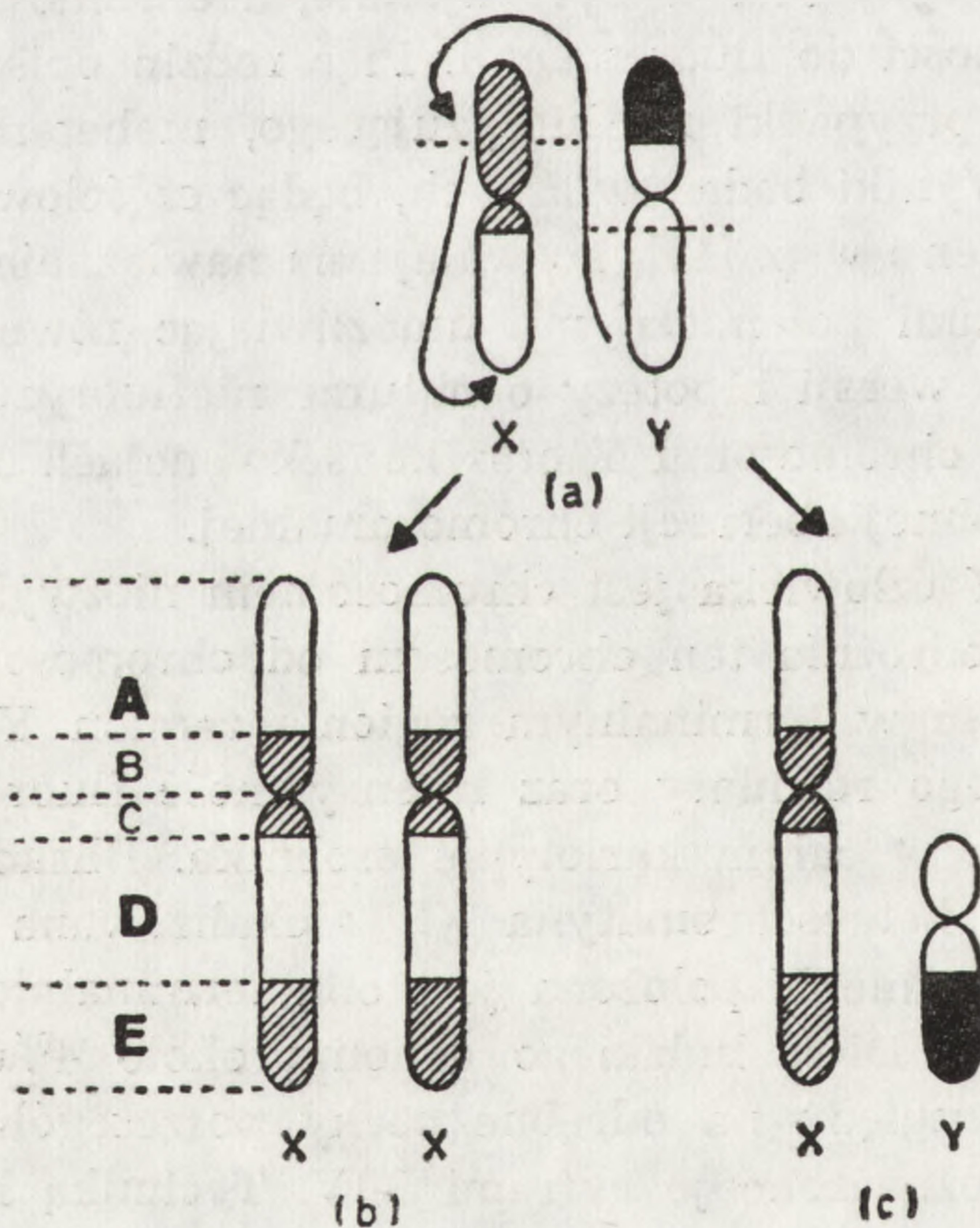
W przygotowaniu do publikacji znajdują się wyniki badań własnych dotyczące 4965 chorych z zaburzeniami cielesno-płciowymi, u których podejrzewano chromosomalne uwarunkowanie choroby. U 15 chorych testy chromatyny X i Y były ujemne, a chromosom Y nie posiadał typowej zdolności do fluorescencji. Pięć rodzin opisano szczegółowo, wśród nich dwa przypadki niefluoryzującego, nieheterochromatycznego chromosomu Y. Wyniki badań własnych, będąc częściowo zbieżne z wynikami badań Cohen i wsp. [19], pozwalają na nawiązanie dyskusji z przytoczonymi poglądami polemicznymi, umożliwiając również sformułowanie udoskonalonej wersji hipotezy o naturze niefluoryzującego, nieheterochromatycznego chromosomu Y oraz konsekwencjach cytogenetycznych i klinicznych podobnej aberracji chromosomalnej.

Chromosom Y człowieka jest chromosomem niezwykłym. Podstawową cechą, która odróżnia ten chromosom od chromosomu X i autosomów, jest obecność w terminalnym regionie ramion Yq bloku heterochromatyny, którego rozmiary oraz intensywność fluorescencji najczęściej są największe w całym kariotypie osobnika. Blisko 20% ludzkiego genomu stanowi heterochromatyna C, zlokalizowana pericentrycznie i tylko w chromosomie Y położona jest ona terminalnie. Wśród powtarzalnych sekwencji DNA ludzkiego genomu około 4% stanowi satelitarny DNA. Ze względu na odrębne cechy poszczególnych frakcji satelitarnego DNA oznaczono je cyframi I-IV. Technika hybrydyzacji „in situ” ustalono, że konstytutywna heterochromatyna chromosomów 2, 3, 4, 6, 8 i 11 charakteryzuje się tym, że nie zawiera wszystkich frakcji, natomiast heterochromatyna C chromosomów 1, 9, 13, 14, 15, 20, 21, 11 i Y w mniejszym lub większym stopniu posiada wszystkie cztery

frakcje. Dwa chromosomy w karyotypie człowieka charakteryzują się największą zawartością satelitarnego DNA — jest to chromosom 9 i Y [74]. W chromosomie Y zidentyfikowano techniką restrykcji enzymatycznej „specyficzny-męski DNA” utożsamiany w dużym stopniu z frakcją II satelitarnego DNA — jest to kolejna, niezwykła cecha tego chromosomu.

#### CHROMOSOMY X I Y W PROCESIE EWOLUCJI KARIOTYPU

Fakt pojawienia się unikalnych sekwencji satelitarnego DNA chromosomu Y był prawdopodobnie pierwszym krokiem na ewolucyjnej drodze uzyskania morfologicznej tożsamości tego chromosomu [12, 61]. Podobne zjawisko obserwuje się w dimorficznych chromosomach płciowych węży (chromosomy W i Z) [51, 88]. Na drodze ewolucji od prymitywnych kręgowców, gdzie nie obserwujemy dimorfizmu chromosomów płciowych, do człowieka, chromosom Y w odróżnieniu od chromosomu X został niemal zupełnie pozbawiony loci genowych, z wyjątkiem determinujących płęć oraz kontrolujących rozwój gonad i układu



Ryc. 5. Proces ewolucyjnej „erozji” chromosomu Y (wg Wyss i wsp., *Clinical Genetics* 1982, **21**: 145-159; zmodyfikowane); (a) — niezróżnicowane chromosomy płciowe niższych kręgowców, (b) — karyotyp 46,XX kobiety, (c) — karyotyp 46,XY mężczyzny. Szczegóły w tekście



moczowo-płciowego. Podczas tego procesu, często nazywanego „degeneracją chromosomu Y” [75] lub „erozją chromosomu Y” [26], rozmiary tego chromosomu zostały zredukowane do 1/3 chromosomu X (ryc. 5).

Wielu autorów [37, 43, 44, 69] przyjmuje, że mechanizmem napędowym ewolucji niezróżnicowanych chromosomów płciowych niższych kręgowców do chromosomów dimorficznych ssaków wyższych i człowieka była translokacja. Translokacji uległ znaczny fragment chromosomu Y (region A) na chromosom X ( $A \rightarrow X$ ), jednocześnie terminalny region Xp (region E) został przeniesiony na region terminalny Xq. Po tym wydarzeniu jedynie regiony B i C chromosomu X i Y zachowały homologię. Chromosom X stał się „chimerą” subregionów odpowiedzialnych za cechy somatyczne (A i D) oraz funkcję gonad (B i E). Przeniesienie fragmentu A z chromosomu Y do X spowodowało duplikację wielu sprzężonych z chromosomem X genów. Proces lyonizacji doprowadza do niezbędnego zrównoważenia genetycznego komórki. Hipotezę tę potwierdza szereg pośrednich dowodów genetycznych [101]. Jak już wspomniano, znanych jest obecnie ponad 100 loci genowych sprzężonych z chromosomem X. Przy założeniu, że w chromosomie X może być zlokalizowanych blisko 2000 loci genowych [37], należy się spodziewać, że jest tylko sprawą czasu wykrycie odseparowanych (np. w regionie A i D) zduplikowanych loci. Uzyskanie takiego dowodu uczyniłoby przedstawioną hipotezę bardzo prawdopodobną.

Proces lyonizacji stanowi charakterystyczną cechę jednego z dwóch chromosomów X — implikacje cytogenetyczne, biochemiczne i cytologiczne tego faktu zostały omówione wyżej.

Cechą unikalną chromosomu Y jest heterochromatyna Y. Jaką biologiczną funkcję spełnia heterochromatyna? Wielu autorów [29, 90, 94] przypisuje heterochromatynie następujące funkcje: stabilizację centromerów i telomerów, zabezpieczenie życiowo ważnych regionów genu — „body-guard”, koniugację homologicznych chromosomów w mejozie, regulację procesu „crossing-over” oraz formowanie chiasm, stworzenie barier reprodukcyjnych, stwarzanie warunków dla ewolucji kariotypu, koniugację chromosomów niehomologicznych dla zbliżenia regionów o podobnej funkcji, kontrolę rozmiarów komórki oraz szybkości podziałów, zabezpieczenie euchromatyny przez uformowanie wewnątrzjądrowej ochrony „koperty”.

Żadna z wymienionych funkcji nie została przekonywająco udowodniona. O ile funkcja heterochromatyny C jest przedmiotem domysłów, o tyle rola heterochromatyny Y jest całkowicie nieznana.

Powyższy wybór informacji o właściwościach cytologicznych, biochemicznych i genetycznych chromosomu X i Y został poprzedzony cytatem ze Starego Testamentu opisującym kreowanie Ewy. Akt ten wy-

magal wyjęcia zebra lub przeniesienia boku ciała Adama będącego hermafrodytą. Gromadząc informacje o chromosomie X i Y korzystano z prac posługujących się nowymi osiągnięciami inżynierii genetycznej, cytologii, cytogenetyki i biochemii.

Chcąc jednak na zakończenie zademonstrować istotę różnicowania się obu chromosomów, trzeba było powrócić do ewolucyjnego modelu, który wymaga przyjęcia poglądu o translokacji dużego fragmentu chromosomu Y na chromosomie X dla dokonania kroku w kierunku dimorfizmu chromosomów płciowych. Symbolika tego luźnego skojarzenia przekazu biblijnego z hipotezą naukową zachęca do refleksji.

Autor pragnie podziękować prof. prof. dr. hab. med. Tadeuszowi i Markowi Pawlikowskiemu oraz prof. dr. hab. med. Janowi Steffenowi za inspirację oraz wiele cennych wskazówek.

Praca była finansowana przez Akademię Medyczną w Łodzi w ramach tematu bezumownego: „Badania nad procesem inaktywacji chromosomu płciowego X” oraz ze środków przyznanych w ramach tematu PAN No 09.7.3.2.3. „Molekularne podstawy procesów życiowych u drobnoustrojów i w organizmach wyższych”.

Ryciny 1-3 pochodzą ze zbiorów Zakładu Genetyki Medycznej Instytutu Endokrynologii AM w Łodzi, autorami zdjęć są B. Kałużewski i Z. Pokorska.

#### LITERATURA

- [1] ANGEL R. R., JACOBS P. A., Lateral asymmetry in human constitutive heterochromatin, *Chromosoma*, **51**: 301-310, 1975.
- [2] — Lateral asymmetry in human constitutive heterochromatin: Frequency and inheritance, *Am. J. Hum. Genet.*, **30**: 144-152, 1978.
- [3] ATKINS L., GUSTAVSON K. H., The pattern of DNA synthesis in human chromosomes in cells with an XXY sex chromosome constitution, *Hereditas*, **51**: 135-145, 1964.
- [4] BARR M. L., SHAVER E. L., CARR D. H., An unusual sex chromatin pattern in three mentally deficient subjects, *J. Ment. Defic. Res.*, **3**: 78-87, 1959.
- [5] BERNSTEIN R., The Y chromosome and primary sexual differentiation, *J. Am. Med. Assoc.*, **245**: 1953-1956, 1981.
- [6] BERNSTEIN R., PINTO M. R., ALMEIDA M., SOLARSH S. M., MECK J., JENKINS T., X;Y translocation in an adolescent mentally normal phenotypic male with features of hypogonadism, *J. Med. Genet.*, **17**: 437-443, 1980.
- [7] BIANCHI N. O., DE BIANCHI M. S. A., DNA replication sequence of human chromosomes in blood cultures, *Chromosoma*, **17**: 237-290, 1965.
- [8] BOBROW M., PEARSON P. L., PIKE M. C., EL ALFI O. S., Length variation in the quinacrine binding segment of human Y chromosomes of different sizes, *Cytogenetics*, **10**: 190-198, 1971.
- [9] BOCZKOWSKI K., Sex determination and gonadal differentiation in man, *Clin. Genet.*, **2**: 379-386, 1971.
- [10] BOCZKOWSKI K., CASEY M. D., Pattern of DNA replication of the sex chromosomes in three males, two with XYY and one with XXYY karyotype, *Nature*, **213**: 928-930, 1967.

- [11] BOSTOCK C. J., GOSDEN J. R., MITCHELL A. R., Localisation of a male-specific DNA fragment to a sub-region of the human Y-chromosome, *Nature*, **272**: 324-328, 1978.
- [12] BRUTLAG D. L., Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA, *Ann Rev. Genet.*, **14**: 121-144, 1980.
- [13] BÜHLER E., Non-fluorescent Y chromosome (Abstract), *Helv. Paed. Acta, Suppl.*, **34**: 127, 1974.
- [14] — Clinical and cytological aspects of sex chromosome activity, *Hereditas*, **86**: 63-74, 1977.
- [15] — A synopsis of the human Y chromosome, *Hum. Genet.*, **55**: 145-175, 1980.
- [16] CAMARGO M., CERVENKA J., Patterns of DNA replication of human chromosomes. II. Replication map and replication model, *Am. J. Hum. Genet.*, **34**: 757-780, 1982.
- [17] CASPERSSON T., HULTÉN M., JONASSON J., LINDSTEN J., THERKELSEN A., ZECH L., Translocation causing non-fluorescent Y chromosomes in human XO/XY mosaics, *Hereditas*, **68**: 317-324, 1971.
- [18] CAVE M. D., Reverse patterns of thymidine-H<sup>3</sup> incorporation in human chromosomes, *Hereditas*, **54**: 338-355, 1966.
- [19] COHEN G., MANUEL A., COHEN M., FAGAN K., GRUNSTEIN H., A deletion of heterochromatin only of the Y chromosome in an azoospermic male, *Hum. Genet.*, **64**: 297-300, 1983.
- [20] COHEN M. M., SHAW M., MacCLUER J. W., Racial differences in the length of the human Y chromosomes, *Cytogenetics*, **5**: 34-52, 1966.
- [21] COMINGS D. E., Mechanism of chromosome banding and implications for chromosome structure, *Ann. Rev. Genet.*, **12**: 25-46, 1978.
- [22] COOKE H., Repeated sequence specific to human males, *Nature*, **262**: 182-186, 1976.
- [23] CRAIG A. P., SHAW M. W., Autoradiographic studies of the human Y chromosome, *Chromosoma*, **32**: 364-377, 1971.
- [24] CURTIS W. R. S., WHITE B. J., LUCKY A. W., ROCHE-BENDER N., KNAB D. R., JOHNSONBAUGH R. E., Gonadal dysgenesis with mosaicism and a nonfluorescent Y chromosome: Report of two cases with correlation of clinical, pathologic, and cytogenetic findings, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **136**: 639-645, 1980.
- [25] DANIEL A., LYONS N., CASEY J. H., GRAS L., Two dicentric Y isochromosomes, one without the Yqh heterochromatic segment. Review of the Y isochromosomes, *Hum. Genet.*, **54**: 31-39, 1980.
- [26] DARLINGTON C. D., *The evolution of genetic systems*, Basic Books, New York 1958, 265.
- [27] DAVIS R. M., Localisation of male determining factors in man: a thorough review of structural anomalies of the Y chromosome, *J. Med. Genet.*, **18**: 161-195, 1981.
- [28] De la CHAPELLE A., FELLMAN J., UNNÉRUS V., Determination of human paternity from the length of the Y chromosome, *Ann. Génét.*, **10**: 60-64, 1967.
- [29] ERDTMANN B., Aspects of evaluation, significance, and evolution of human C-band heteromorphism, *Hum. Genet.*, **61**: 281-294, 1982.
- [30] FERRIER P. E., FERRIER S. A., XXYY Klinefelter's syndrome: case report and a study of the Y chromosome' DNA replication pattern, *Ann. Génét.*, **11**: 145-151, 1968.
- [31] FERRIER P. E., FERRIER S. A., BILL A. H., A male pseudohermaphrodite

- with a dicentric Y chromosome. Autoradiographic study, *Humangenetik*, **6**: 131-141, 1968.
- [32] FONATSCH Ch., FLATZ S. D., FREYMANN R., Non-fluorescent Y chromosome in a male infant with Turner's symptoms and XO/XY mosaicism, *Clin. Genet.*, **11**: 235-240, 1977.
- [33] FORD C. E., JONES K. W., POLANI P. E., de ALMEIDA J. C., BRIGGS J. H., A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome), *Lancet*, **1**: 711-713, 1959.
- [34] FRACCARO M., KAIJSER K., LINSTEN J., A child with 49 chromosomes, *Lancet*, **279**: 899-902, 1960.
- [35] FRYNS J. P., PEDERSEN J. C., GODDEERIS P., van den BERGHE H., Nonfluorescent Y-chromosome in mixed gonadal dysgenesis with 45,X/46,XY mosaicism, *Ann. Génét.*, **23**: 54-56, 1980.
- [36] GALLOWAY S. M., EVANS H. J., Asymmetrical C-bands and satellite DNA in man, *Exptl. Cell Res.*, **94**: 454-459, 1975.
- [37] GALTON M., Evolution of sex chromosomes in mammals and birds, *Lancet*, **2**: 1397-1398, 1966.
- [38] GIBAS Z., LIMON J., Isolabeling of the long arm of the human Y chromosome demonstrated by the FPG technique, *Chromosoma*, **69**: 113-120, 1978.
- [39] GOODFELLOW P., BANTING G., SHEER D., ROPERS H. H., CAINE A., FERGUSON-SMITH M. A., POVEY S., VOSS R., Genetic evidence that a Y-linked gene in man is homologous to a gene on the X chromosome, *Nature*, **302**: 346-349, 1983.
- [40] GOYANES V. J., Sequential staining of euchromatic and heterochromatic regions of the human Y chromosome, *J. Med. Genet.*, **17**: 468-471, 1980.
- [41] GOTO K., AKEMATSU T., SHIMAZU H., SUGIYAMA T., Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanisms of staining, *Chromosoma*, **53**: 223-230, 1975.
- [42] HECHT Th., COOKE H. J., CERRILLO M., MEER B., RECK G., HAMEISTER H., A new case of Y to X translocation in a female, *Hum. Genet.*, **54**: 303-307, 1980.
- [43] HOO J. J., Cytogenetic evidence for evolution of X-chromosome inactivation, *Lancet*, **2**: 1299-1300, 1975.
- [44] — Clinical consequences of Xp-, *Hum. Genet.*, **46**: 349-351, 1979.
- [45] HSU L. Y. F., KIM H. J., PACIUC S., STEINFELD L., HIRSCHHORN K., Non-fluorescent and non-heterochromatic Y chromosome in 45,XO/46,XY mosaicism, *Ann. Génét.*, **17**: 5-9, 1974.
- [46] HSU T. C., LOCKHART L. H., The beginning and the terminal stages of DNA synthesis of human cells with an XXXXY constitution, *Hereditas*, **52**: 320-324, 1964.
- [47] ISCN (1978), An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1978). Birth Defects: Original Article Series, vol. XIV, No 8 (The National Foundation, New York 1978); [również w] *Cytogenet. Cell Genet.*, **21**: 309-404, 1978.
- [48] JACOBS P. A., ROSS A., Structural abnormalities of the Y chromosome in man, *Nature*, **210**: 352-354, 1966.
- [49] JACOBS P. A., STRONG J. A., A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism, *Nature*, **183**: 302-303, 1959.
- [50] JALAL S. M., PFEIFFER R. A., PATHAK S., HSU T. C., Subdivision of the human Y chromosome, *Humangenetik*, **24**: 59-65, 1974.

- [51] JONES K. W., Evolutionary conservation of sex specific DNA sequences, *Differentiation*, **23** (suppl.): 56-59, 1983.
- [52] KAŁUŻEWSKI B., Aberracje chromosomowe w chorobach cielesno-płciowych, [w]: *Endokrynologia Kliniczna dla Studentów Medycyny*, wyd. Akademia Medyczna w Łodzi, 1982, 180-194.
- [53] — BrdU-Hoechst, Giemsa analysis of DNA replication in synchronized lymphocytes cultures. Study of human X and Y chromosomes, *Chromosoma*, **85**: 553-569, 1982.
- [54] KAŁUŻEWSKI B., JAKUBOWSKI L., MORUZGAŁA T., Value of X- and Y-body tests, *Can. Med. Ass. J.*, **116**: 1342-1343, 1977.
- [55] KAŁUŻEWSKI B., JAKUBOWSKI L., MORUZGAŁA T., BJANID O., ROMER T. E.: Y non fluorescent dans un cas de mosaïcisme 45,X/46,XY, *J. Génét. Hum.*, **26**: 225-235, 1978.
- [56] KAŁUŻEWSKI B., JEŻEWSKA-MUSIAŁ M., MORUZGAŁA T., Cytogenetic analysis in Klinefelter syndrome with 47,XXY/48,XXXY karyotype, *Pol. Endocrinol.*, **28**: 214-229, 1972.
- [57] KAŁUŻEWSKI B., JOKINEN A., HORTLING H., De la CHAPELLE A., A theory explaining the abnormality in 45,X/46,XY mosaicism with non-fluorescent Y chromosome. Presentation of three cases, *Ann. Génét.*, **21**: 5-11, 1978.
- [58] KIKUCHI Y., SANDBERG A. A., Chronology and pattern of human chromosome replication. II. Autoradiographic behaviour of various Y and X chromosomes, *J. Natl. Cancer Inst.*, **34**: 795-813, 1965.
- [59] KIM M. A., Fluorometrical detection of thymine base differences in complementary strands of satellite DNA in human metaphase chromosomes, *Hu-mangenetik*, **28**: 57-63, 1975.
- [60] KOO G. C., WACHTEL S. S., SAENGER P. S., NEW M. I., DOSIK H., AMAROSE A. P., DORUS E., VENTRUTO V., H-Y antigen: expression in human subjects with the testicular feminization syndrome, *Science*, **196**: 655-656, 1977.
- [61] KUNKEL L. M., SMITH K. D., Evolution of human Y-chromosome DNA, *Chromosoma*, **86**: 209-228, 1982.
- [62] KUNKEL L. M., SMITH K. D., BOYER S. H., BORGAONKAR D. S., WACHTEL S. S., MILLER O. J., BREG W. R., JONES H. W., RARY J. M., Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**: 1245-1249, 1977.
- [63] LATT S. A., DAVIDSON R. L., LIN M. S., GERALD P. S., Lateral asymmetry in the fluorescence of human Y chromosomes stained with 33258 Hoechst, *Expt. Cell Res.*, **87**: 425-429, 1974.
- [64] LIMON J., GIBAS Z., KAŁUŻEWSKI B., MORUZGAŁA T., Demonstration of two different regions of lateral asymmetry in human Y chromosomes, *Hum. Genet.*, **51**: 247-252, 1979.
- [65] LIN M. S., ALFI O. S., Detection of sister chromatid exchanges by 4'-6-Diamidino-2-Phenylindole fluorescence, *Chromosoma*, **57**: 219-225, 1976.
- [66] LIN M. S., LATT S. A., DAVIDSON R. L., Microfluorometric detection of asymmetry in the centromeric region of mouse chromosomes, *Expt. Cell Res.*, **86**: 392-394, 1974.
- [67] Lo CURTO F., SCAPPATICCI S., ZUFFARDI O., CHIERICHETTI G., FRACCARO M., Non-fluorescent Y chromosome in a 45,XO/46,XY mosaic, *Ann. Génét.*, **15**: 107-110, 1972.

- [68] LUBS H. A., RUDDLE F. H., Chromosome polymorphism in American negro and white populations, *Nature*, **233**: 134-136, 1971.
- [69] LYON M. F., Evolution of X-chromosome inactivation in mammals, *Nature*, **250**: 651-653, 1974.
- [70] MADAN K., GOOREN L., SCHOEMAKER J., Three cases of sex chromosome mosaicism with a nonfluorescent Y, *Hum. Genet.*, **46**: 295-304, 1979.
- [71] MAGENIS E., DONLON T., Nonfluorescent Y chromosomes. Cytologic evidence of origin, *Hum. Genet.*, **60**: 133-138, 1982.
- [72] MANOLOV G., MANOLOVA Y., FISKESJÖ G., LEVAN A., The complexity of the fluorescent pattern of the human Y chromosome, *Hereditas*, **68**: 328-331, 1971.
- [73] McKAY R. D. G., HERITAGE J., BOBROW M., COOKE H. J., Endonuclease analysis of Y chromosome DNA, *Cytogenet. Cell Genet.*, **22**: 357-358, 1978.
- [74] MIKLOS G. L. G., JOHN B., Heterochromatin and satellite DNA in man: Properties and prospects, *Am. J. Hum. Genet.*, **31**: 264-280, 1979.
- [75] MONSALVE M. V., ERDTMANN B., OTTO P. A., FROTA-PESSOA O., The human Y chromosome: racial variation and evolution, *Rev. Brasil. Genet.*, **4**: 433-446, 1980.
- [76] MÜLLER U., SCHEMPP W., Homologous early replication patterns of the distal short arms of prometaphasic X and Y chromosomes, *Hum. Genet.*, **60**: 274-275, 1982.
- [77] OCKEY C. H., Human chromosome identification and the pattern of DNA replication in fibroblasts from an XXY male. A quantitative autoradiographic study of early and late synthesis, *Cytogenetics*, **8**: 272-295, 1969.
- [78] PEARSON P. L., BOBROW M., Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei, *Nature*, **226**: 78-80, 1970.
- [79] PRIEST J. H., CHEN A. T. L., FERNHOFF P. M., REIDY J. A., WHITSETT C., Prenatal diagnosis of a de novo non-fluorescent Y chromosome, *J. Med. Genet.*, **17**: 314-323, 1980.
- [80] ROMER B. A., ROMER T. E., W sprawie rutynowego oznaczania ciała Y w nabłonku jamy ustnej, *Pol. Tyg. Lek.*, **XXII**: 2052-2054, 1972.
- [81] ROSENFELD R. G., LUZZATTI L., HINTZ R. L., MILLER O. K., KOO G. C., WACHTEL S. S., Sexual and somatic determinants of the human Y chromosome: studies in a 46,XYp- phenotypic female, *Am. J. Hum. Genet.*, **31**: 458-468, 1979.
- [82] SCHEMPP W., MÜLLER U., High resolution replication patterns of the human Y chromosome, *Chromosoma*, **86**: 226-237, 1982.
- [83] SCHMID W., DNA replication patterns of human chromosomes, *Cytogenetics*, **2**: 175-193, 1963.
- [84] SCHMIDKE J., SCHMID M., Regional assignment of a 2.1-kb repetitive sequence to the distal part of the human Y heterochromatin, *Hum. Genet.*, **55**: 255-257, 1980.
- [85] SCHNEDL W., DANN O., SCHWEIZER D., Effects of counterstaining with DNA binding drugs on fluorescent banding patterns of human and mammalian chromosomes, *Eur. J. Cell Biol.*, **20**: 290-296, 1980.
- [86] SEUÁNEZ H. N., *The Phylogeny of Human Chromosomes*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1979.
- [87] SIEBERS J. W., VOGEL W., HEPP H., BOLZE H., DITTRICH A., Structural aberrations of the Y chromosome and the corresponding phenotype.

- Report of a case with the karyotype 45,X/46,X,i(Yp), *Humangenetik*, **19**: 57-66, 1973.
- [88] SINGH L., PURDOM I. F., JONES K. W., Satellite DNA and evolution of sex chromosomes, *Chromosoma*, **59**, 43-62, 1976.
- [89] SLEZINGER S. I., PROKOFIEWA-BELGOWSKAYA A. A., Replications of human chromosomes in primary cultures of embryonic fibroblasts. I. Interchromosomal asynchrony of DNA replication, *Cytogenetics*, **7**: 337-346, 1968.
- [90] STAHL A., HARTUNG M. L., L'Hétérochromatine, *Ann. Génét.*, **24**: 69-77, 1981.
- [91] STEFFEN J. A., STOLZMANN W. M., Studies on in vitro lymphocyte proliferation in cultures synchronized by the inhibition of DNA synthesis. I. Variability of S plus G<sub>2</sub> periods of first generation cells, *Exp. Cell Res.*, **56**: 453-460, 1969.
- [92] SOFUNI T., SANDBERG A. A., Chronology and pattern of human chromosome replication, *Cytogenetics*, **6**: 357-370, 1967.
- [93] SOUDEK D., Chromosomal variants with normal phenotype in man. *J. Hum. Evol.*, **2**: 341-355, 1973.
- [94] SUMNER A. T., The nature of chromosome bands and their significance for cancer research, *Anticancer Res.*, **1**: 205-216, 1981.
- [95] TAKAGI N., SANDBERG A. A., Chronology and pattern of human chromosome replication. VII. Cellular and chromosomal DNA behaviour, *Cytogenetics*, **7**: 118-134, 1968.
- [96] TISHLER P. V., LAMBOROT-MANZUR M., ATKINS L., Polymorphism of the human Y chromosome: fluorescence microscopic studies on the sites of morphologic variation, *Clin. Genet.*, **3**: 116-122, 1972.
- [97] VERMA R. S., RODRIGUEZ J., DOSIK H., The clinical significance of pericentric inversion of the human Y chromosome: a rare „third” type of heteromorphism, *J. Heredity*, **73**: 236-238, 1982.
- [98] WACHTEL S. S., KOO G. C., De la CHAPELLE A., KALLIO H., HEYMAN J. M., MILLER O. J., H-Y antigen in 46,XY gonadal dysgenesis, *Hum. Genet.*, **54**: 25-30, 1980.
- [99] WISNIEWSKI L. P., HIRSCHHORN K., Distamycin A-DAPI banding of nonfluorescent Y (Y<sup>nf</sup>) chromosomes in 45,X/46,XY<sup>nf</sup> mosaicism, *Hum. Genet.*, **60**: 130-132, 1982.
- [100] WOLF U., FRACCARO M., MAYEROVÁ A., HECHT T., ZUFFARDI O., HAMEISTER H., Turner syndrome patients are H-Y positive, *Hum. Genet.*, **54**: 315-318, 1980.
- [101] WYSS D., DeLOZIER C., DANIELL J., ENGEL E., Structural anomalies of the X chromosome: personal observation and review of nonmosaic cases, *Clin. Genet.*, **21**: 145-159, 1982.
- [102] YANAGISAWA S., Structural abnormalities of the Y chromosome and abnormal external genitals, *Hum. Genet.*, **53**: 183-188, 1980.
- [103] YUNIS J., TSAI M., WILLEY A., Molecular organization and function of the human genome, [w] Yunis J. ed. *Molecular structure of human chromosomes*, New York: Academic Press, 1977, 1-27.
- [104] ZECH L., Investigation of metaphase chromosomes with DNA-binding fluorochromes, *Expt. Cell Res.*, **58**: 463, 1969.

*Otrzymano: 13 marca 1984 r.*

*Przyjęto: 9 kwietnia 1984 r.*

*Adres autora: Sterlinga 3, 91-425 Łódź.*

1981  
1982  
1983  
1984  
1985  
1986  
1987  
1988  
1989  
1990  
1991  
1992  
1993  
1994  
1995  
1996  
1997  
1998  
1999  
2000  
2001  
2002  
2003  
2004  
2005  
2006  
2007  
2008  
2009  
2010  
2011  
2012  
2013  
2014  
2015  
2016  
2017  
2018  
2019  
2020  
2021  
2022  
2023  
2024  
2025



## METODY IMMUNOCYTOCHEMICZNEGO WYKRYWANIA ANTYGENÓW

### IMMUNOCYTOCHEMICAL METHODS OF DETECTING ANTIGENS

Maciej ZABEL

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Akademia Medyczna, Poznań

*Streszczenie.* Przedstawiono zasady metod stosowanych w badaniach immunocytochemicznych. Omówiono między innymi metody nieznakowanych przeciwciał, zastosowanie proteiny A i układu awidyna—biotyna oraz metody równoczesnego wykrywania kilku antygenów. Szczególną uwagę zwrócono na zalety i wady poszczególnych metod oraz omówiono praktyczne zasady wykonywania reakcji immunocytochemicznych. Oddzielnie przedstawiono techniki stosowane w immunocytochemicznej lokalizacji antygenów na poziomie ultrastrukturalnym.

*Summary.* Principles of methods used in immunocytochemical studies were presented. Among others, unlabeled antibody technique, application of protein A and avidin—biotin system and methods of parallel detection of several antigens were discussed. Particular attention was paid to advantages and pitfalls of using individual methods. Practical principles of performing immunocytochemical reactions were given. In a separate section, techniques used in immunocytochemical localization of antigens at the ultrastructural level were presented.

#### 1. WSTĘP

Metody immunocytochemiczne polegają na wykrywaniu i lokalizacji składników komórek i tkanek na zasadzie reakcji antygen—przeciwciała. Najczęściej wykrywany jest antygen za pomocą swoistych przeciwciał znakowanych w sposób bezpośredni lub pośredni. Rzadziej stosowaną odmianą reakcji immunocytochemicznych jest tzw. reakcja odwrócona polegająca na wykrywaniu przeciwciał w tkance za pomocą znakowanego antygeny.

Coons [26] jako pierwszy zastosował przeciwciała znakowane izocyjankiem fluoresceiny do wykrywania antygenów. Później wprowadzono do znakowania przeciwciał izotiocjanian fluoresceiny, który lepiej

wiąże się z przeciwciałami i daje silniejszą fluorescencję [100]. Fluorochromy były stopniowo wypierane przez inne znaczniki, jak enzymy (peroksydaza) [86], białka zawierające metal (ferrytyna) [114] i wreszcie metale (złoto koloidalne) [38]. Wprowadzenie nowych znaczników umożliwiło rozwój badań nad lokalizacją antygenów na poziomie ultrastrukturalnym. Obok tego wprowadzono nowe techniki pozwalające podnieść czułość tych metod lub umożliwić ich szersze zastosowanie poprzez tworzenie „gotowych” układów, które mogą być użyte do wykrywania różnych przeciwciał. Do metod tych zaliczyć należy — reakcję pośrednią, wprowadzenie metod z nieznakowanymi przeciwciałami, a zwłaszcza z kompleksem PAP [20, 117], wykorzystanie silnego powinowactwa awidyny do biotyny (metoda ABC) [52] oraz proteiny A, a szczególnie kompleksu proteina A — złoto [4, 9, 14, 30, 107]. Dalszym postępowaniem w immunocytochemii było wprowadzenie metod służących do wykrywania kilku antygenów na tych samych skrawkach [84].

#### 1.1. DANE OGÓLNE

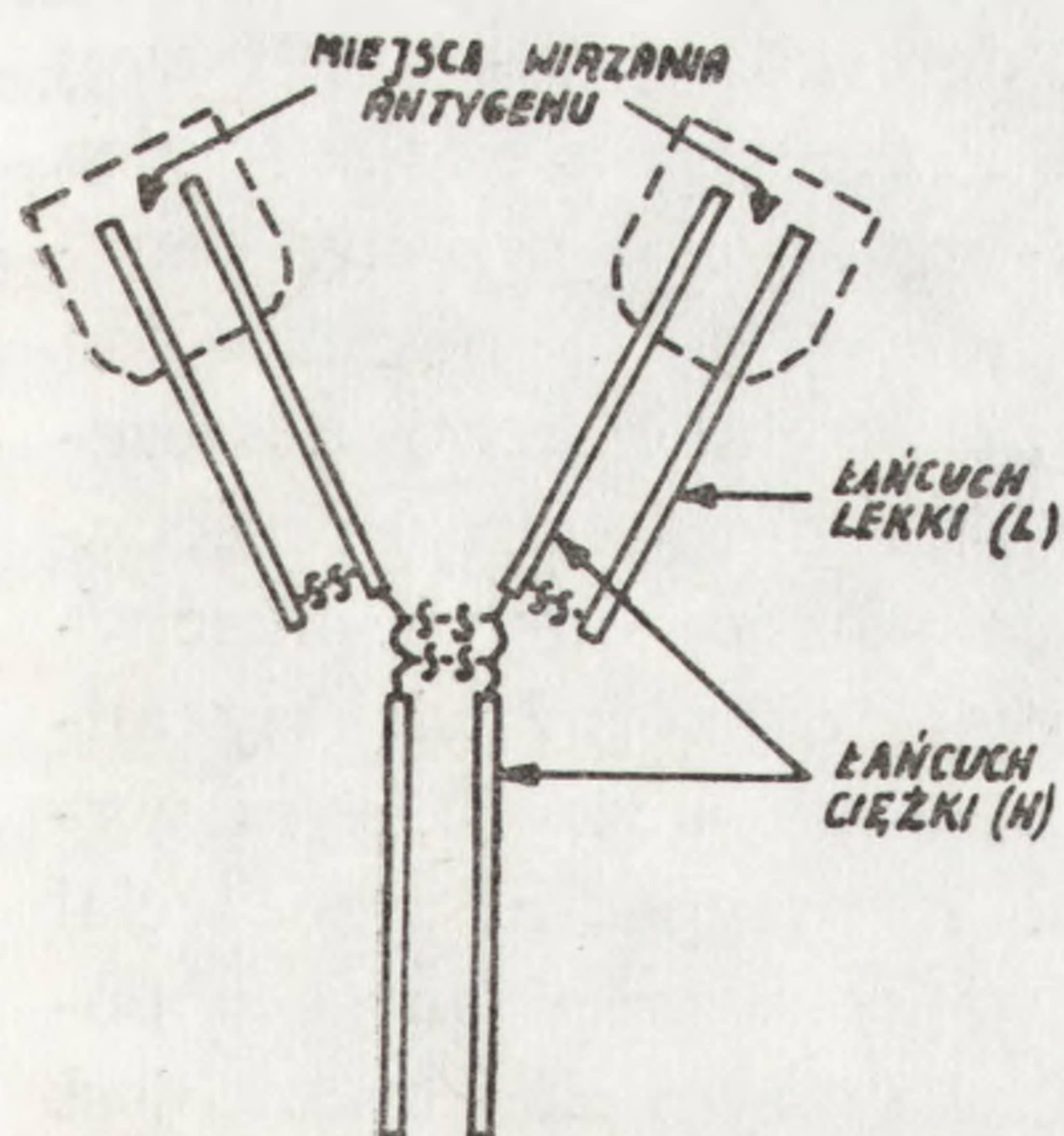
Reakcje immunocytochemiczne polegają, jak już wspomniano, na wykrywaniu antygenów tkankowych za pomocą specyficznych przeciwciał. Należy przy tym pamiętać, że antygen może być wykrywany w miejscu syntezy, magazynowania lub jego wiązania, np. przez receptory [22]. W dalszym ciągu pracy stosowany będzie termin pierwsze przeciwciało, co ma oznaczać, że jest to swoiste przeciwciało wykrywające dany antygen. Przeciwciało najczęściej nie wiąże się z całym antygenem lecz jedynie z jego fragmentem zwanym determinantą antygenową. W przypadku białka jest to ugrupowanie kilku aminokwasów. Dlatego istnieje zawsze możliwość wykrywania za pomocą przeciwciał także innych białek, które mają inną strukturę i funkcję, lecz przypadkowo posiadają identyczną lub bardzo podobną determinantę antygenową [22, 93, 125]. Problem ten jest szczególnie ważny przy stosowaniu przeciwciał monoklonalnych [63]. Dlatego też nawet po zastosowaniu testów kontrolnych i testów na specyficzność przeciwciała możliwe jest, że wykrywany będzie nie ten antygen, przeciw któremu wyprodukowane zostało przeciwciało lub też wiele różnych antygenów. W przypadku takich wątpliwości mówimy nie o wykryciu danego antygeny, lecz o wykryciu substancji o immunoreaktywności danego antygeny [125]. Jest to także ważne z powodu różnych sposobów przygotowania materiału do badań, które mogą tak zmieniać immunoreaktywność antygeny, że wykrywać go nie będziemy lub wykrywać będziemy jedynie niewielką jego część [22]. Z tych względów badania immunocytochemiczne wymagają często uzupełnienia innymi metodami lub potwierdzenia eksperymentalnego [22, 93]. Często pomocne jest stosowanie różnych surowic lub różnych prze-

ciwciał monoklonalnych, co zwiększa prawdopodobieństwo, że wykrywamy rzeczywiście poszukiwany antygen [125].

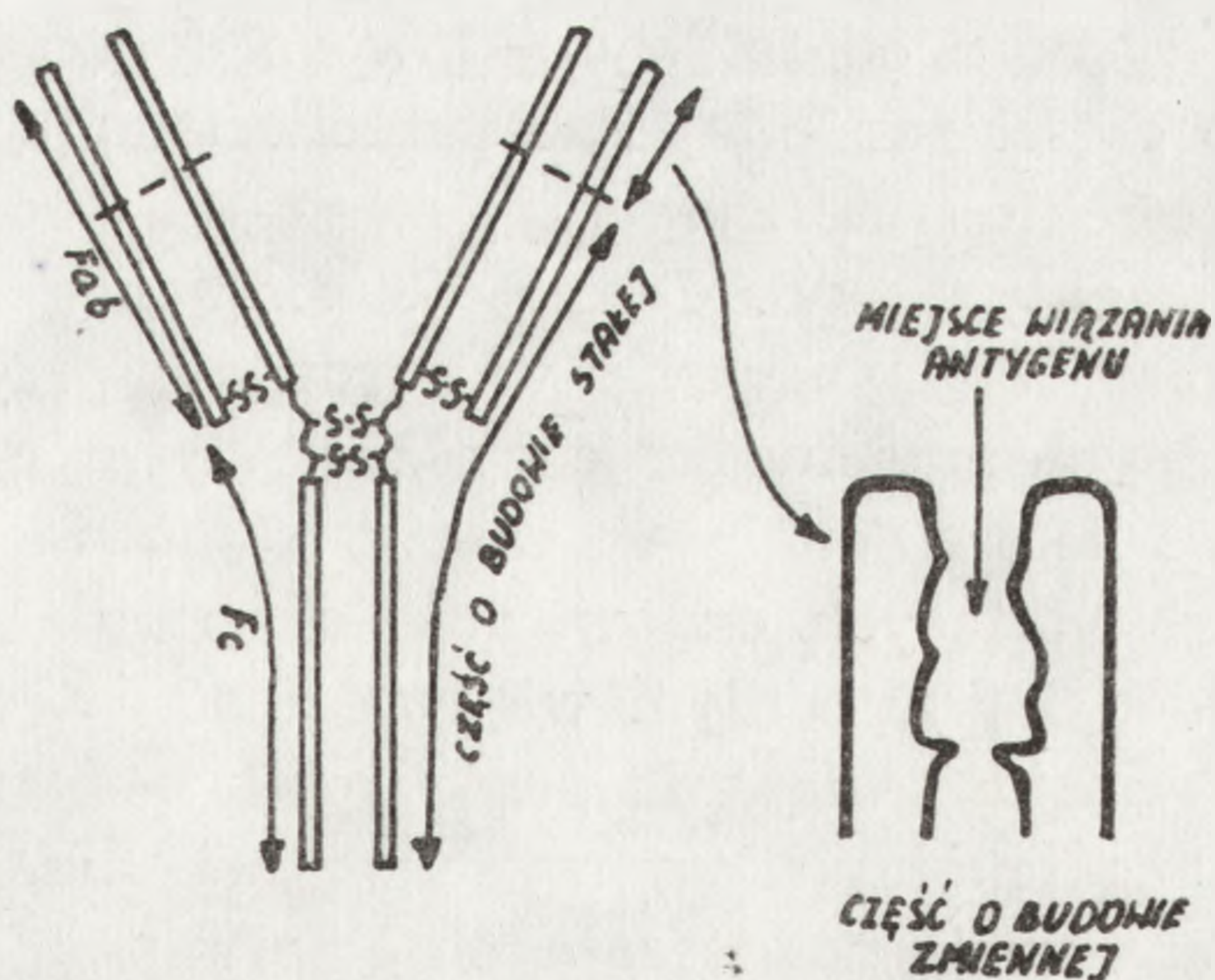
Obecnie najbardziej popularna ze względu na dużą czułość i swoistość jest metoda z kompleksem PAP, często zastępowana już przez przewyższającą ją czułością metodą z kompleksem awidyna—biotynowa—peroksydaza (met. ABC). Dla celów mikroskopii elektronowej najbardziej zalecanymi, szczególnie ze względu na możliwość precyzyjnej lokalizacji antygeny, są metody ze złotem koloidalnym, szczególnie metoda z kompleksem proteina A—złoto koloidalne [30]. Z punktu widzenia praktycznego istotne znaczenie ma zawsze wybór odpowiedniego znacznika, czyli substancji, która jako końcowy produkt reakcji immunocytochemicznej ma być obserwowana. Drugi problem to wybór odpowiedniej metody immunocytochemicznej, która w danych warunkach musi być dostatecznie czuła i swoista.

### 1.2. BUDOWA I CECHY PRZECIWCIAŁ [1, 35, 110, 116]

Przeciwciała używane w immunocytochemii należą przede wszystkim do immunoglobulin G (IgG). Zbudowane są one z czterech łańcuchów, dwóch lekkich i dwóch ciężkich, które połączone są między sobą wiązaniami kowalencyjnymi (mostki dwusiarczkowe) i niekowalencyjnymi (ryc. 1). W cząsteczce można wyróżnić dwie identyczne okolice wiążące antygen (Fab) oraz jedną Fc. Te okolice Ig można łatwo odzielić proteolitycznie stosując papainę. Większa część cząsteczki przeciwciała ma stałą budowę dla danego gatunku i dla danej klasy. Jedynie niewielka część obu łańcuchów w Fab ma budowę zmienną zależną od antygeny, przeciw któremu jest skierowana (ryc. 2). Jeżeli w zmieszaniu duża ilość przeciwciał powiązana jest z antygenem, a ilość

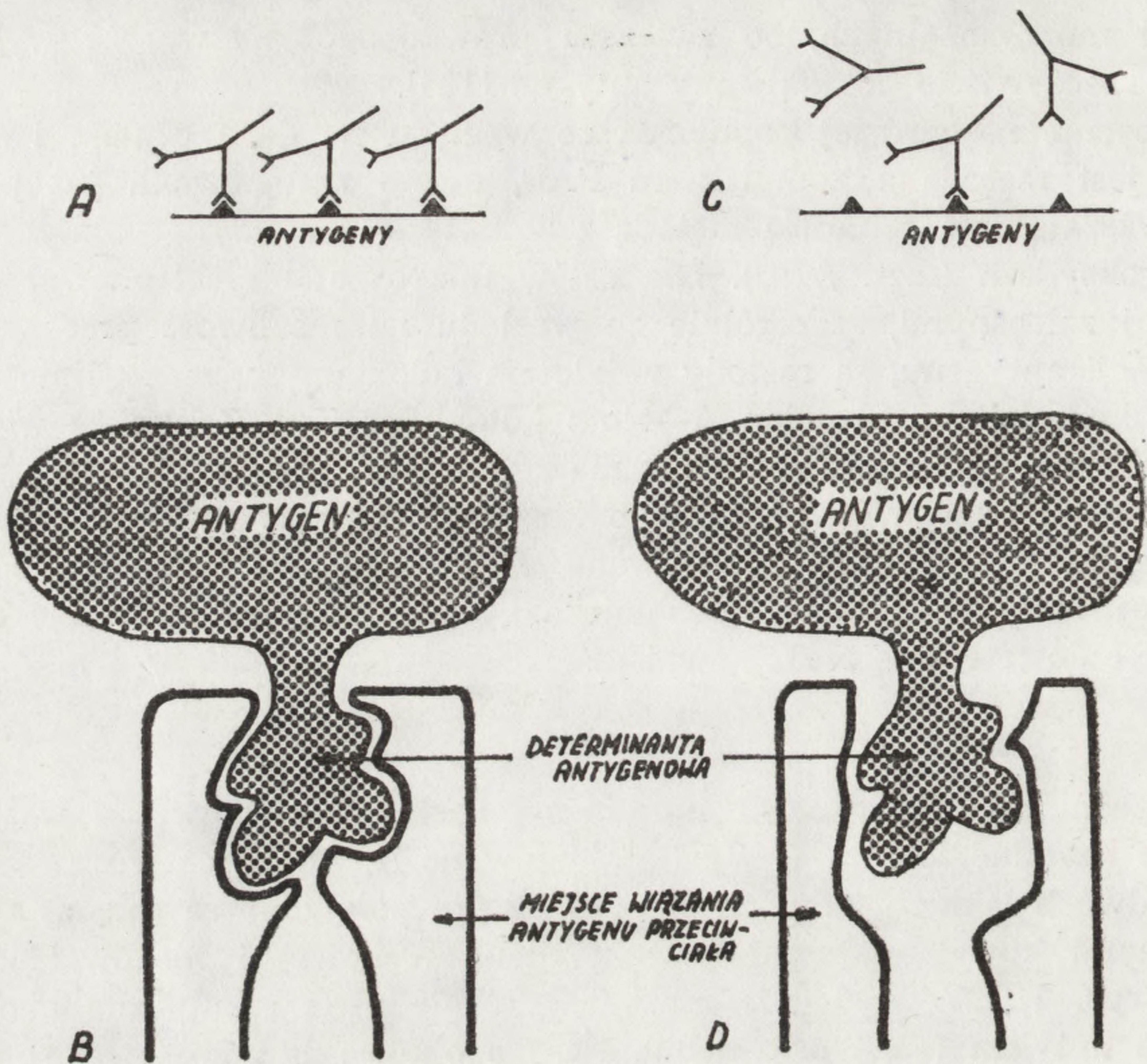


Ryc. 1



Ryc. 2

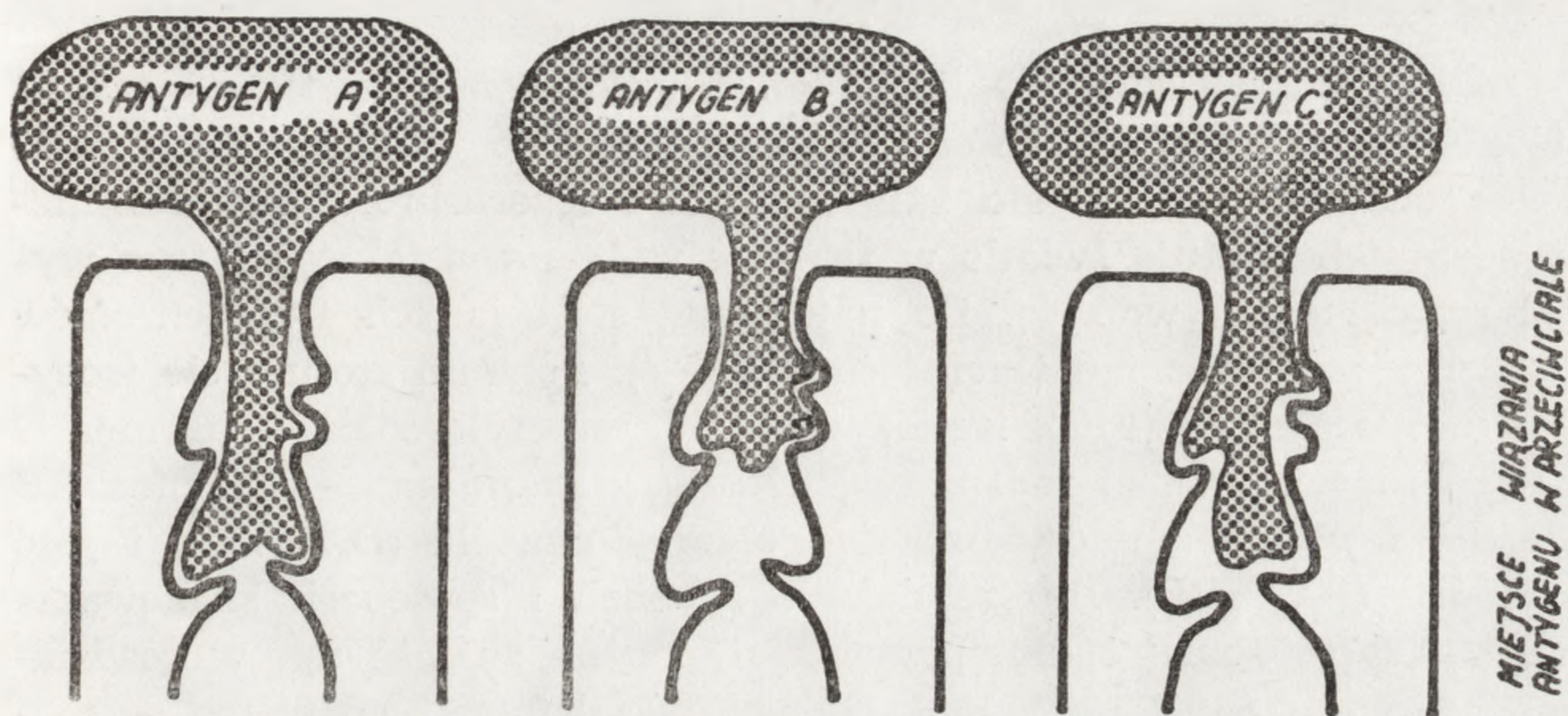
Ryc. 1 i 2. Schemat budowy przeciwciał (zmienione według [1])



Ryc. 3. Wiązanie determinant antygenowych przez przeciwciała o dużym powinowactwie (A i B) oraz przez przeciwciała o małym powinowactwie (C i D) (zmienione według [1])

wolnych przeciwciał i wolnych antygenów jest niewielka, to mówimy o wysokim powinowactwie przeciwciała do antygeny. Zależy to przede wszystkim od trójwymiarowego dopasowania determinanty antygenowej do części zmiennej Fab przeciwciała (ryc. 3). Przeciwciała czy surowice heteroklonalne zawierają mieszaninę różnych przeciwciał przeciw danemu antygenowi. Różne determinanty antygenowe wiążą poszczególne przeciwciała zawarte w surowicy, przy czym powinowactwo poszczególnych przeciwciał jest różne. Wytrzymałość wiązania (awidity) przeciwciał heteroklonalnych zależy od powinowactwa poszczególnych przeciwciał wiążących odpowiednie determinanty antygenowe. Im większy antygen i tym samym większa ilość determinant antygenowych, tym wytrzymałość wiązania przeciwciał jest większa. W przypadku przeciwciał monoklonalnych wytrzymałość wiązania jest większa, jeżeli antygen posiada wiele powtarzalnych determinant, przeciw którym skierowane jest przeciwciało. Warunki otrzymywania przeciwciał o dużym powinowactwie i wytrzymałości wiązania są nieznane. Jeżeli przeciwciała wykrywają tylko jeden antygen, to mówimy, że są to przeciwciała specyficzne.

Ale czasami możemy mieć przeciwciała o małej specyficzności, tzn. wykrywające kilka podobnych antygenów (ryc. 4). Wysoce specyficzne przeciwciała można uzyskiwać stosując do immunizacji czyste, najlepiej syntetyczne antygeny, a w razie konieczności tylko charakterystyczne fragmenty antygeny.



Ryc. 4. Przeciwciało o małej specyficzności wiąże kilka podobnych determinant różnych antygenów (zmienione według [35])

Poprzez immunizację zwierząt otrzymuje się surowicę zawierającą przeciwciała heteroklonalne, a przeciwciała monoklonalne produkowane są przez komórki izolowane ze śledziony zwierzęcia uczulonego, po wytworzeniu hybrydy z allogeniczną komórką plazmatyczną nowotworową. Przeciwciała monoklonalne wprowadzane są do badań immunocytochemicznych od kilku lat i obecnie wiele z nich dostępnych jest w handlu. Wielką ich zaletą jest to, że można dokładnie sprecyzować determinantę antygenową, która jest wykrywana. Ale ich stosowanie wiąże się z pewnymi trudnościami. Przede wszystkim wykrywanie jednej tylko determinanty antygenowej to duże niebezpieczeństwo występowania tej samej determinanty w innych antygenach, co zmusza często do stosowania różnych przeciwciał monoklonalnych dla potwierdzenia wykrycia poszukiwanego antygeny [63]. Ponadto przeciwciała te produkowane są w niskiej koncentracji, a prawdopodobieństwo niskiej wytrzymałości wiązania (avidity) jest większe niż w przypadku przeciwciał heteroklonalnych [125].

### 1.3. ZNACZNIKI STOSOWANE W METODACH IMMUNOCYTOCHEMICZNYCH

Ogólnie możemy powiedzieć, że znaczniki muszą posiadać właściwości umożliwiające ich zaobserwowanie bezpośrednio (np. fluorochromy) lub pośrednio (np. enzymy) w jednym z rodzajów mikroskopów. Związki stosowane do znakowania mogą być wbudowywane, służyć do opłasz-

czania lub łączenia na innej zasadzie cząstek używanych w reakcjach immunocytochemicznych (np. przeciwciał). Do istotnych cech, którymi musi charakteryzować się ponadto znacznik, należą możliwość tworzenia stałych kompleksów oraz nieuszkodzenie struktury i właściwości znakowanej substancji, przynajmniej w zakresie koniecznym dla przeprowadzenia reakcji immunocytochemicznej.

**1.3.1. Fluorochromy [83, 92, 130].** Fluorochromy są to substancje, które wykazują zdolność do emitowania światła po pobudzeniu ich źródłem promieniowania. Mimo istnienia wielu fluorochromów tylko nieznaczna część z nich emitują światło w zakresie widma widzialnego i to z wystarczającą intensywnością. Do najczęściej stosowanych fluorochromów zaliczamy izotiocyjanian fluoresceiny (FITC). Ponadto stosuje się izotiocyjanian fluoresceiny (FIC), izotiocyjanian tetrametylorodaminy izomer G (TRITC), izotiocyjanian rodaminy B (RBITC), lissamina — rodamina RB 200 (LRB 200), 4-aminorosamina B, chlorek dansylu (DANSYL) i jego pochodne (BANSYL). Bliższe dane o zaletach i sposobach znakowania białek fluorochromami (np. przeciwciał) można znaleźć np. w rozdziałach podręczników [83, 92, 130]. Głównymi zaletami tych metod są możliwość otrzymania bardzo trwałych kompleksów fluorochrom—przeciwciało, szybkość wykonania reakcji, a zasadnicze wady to stosunkowo niska czułość, duże trudności z całkowitym usunięciem nieswoistej fluorescencji, nietrwałość preparatów, trudności aparaturowe i kłopoty związane z wykonywaniem dokumentacji. Fluorochromy stosować można do znakowania przeciwciał, antygenów, komplementu, a także proteiny A [108].

**1.3.2. Enzymy.** Typowym przykładem znakowania pośredniego są enzymy, gdyż kompleks przeciwciała (lub też innego związku stosowanego w reakcjach immunocytochemicznych) z enzymem wymaga następnego wykrycia aktywności tego enzymu za pomocą typowych metod histochemicznych. W wyniku otrzymujemy barwny lub elektronowo gęsty produkt reakcji w miejscu występowania antygeny. Zaletami tych znaczników jest możliwość zastosowania ich zarówno w mikroskopii świetlnej, jak i elektronowej oraz możliwość użycia ich w bardzo czułych metodach z nieznakowanymi przeciwciałami (np. metoda z kompleksem PAP). Wadą tych znaczników jest przede wszystkim konieczność blokowania aktywności enzymatycznej występującej w tkance, np. należy zablokować aktywność peroksydazy w tkance jeżeli stosujemy peroksydazę jako znacznik. Do najczęściej stosowanych znaczników enzymatycznych zaliczamy peroksydazę chrzanową [20, 84, 117], cytochrom C [29], glukozooksydazę [25] lub fosfatazę zasadową [37]. Najbardziej popularnym znacznikiem, głównie dzięki metodzie z kompleksem PAP,

jest peroksydaza. Do wykrywania peroksydazy stosuje się reakcję według Grahama i Karnowsky'ego [47] lub jej modyfikacje. W reakcji tej stosuje się jako substrat 3,3'-dwaaminobenzydynę (DAB). Jednakże ze względu na karcinogenne działanie DAB jest ona zastępowana przez inne substraty, jak np. 3-amino-9-etylokarbazol [48], 4-chloro-1-naftol [3, 84] i odczynnik Hankera (chlorowodorek p-fenyldwuaminy i pyrokatechol [54]) i inne [89]. W wyniku działania peroksydazy powstaje z DAB (w obecności  $H_2O_2$ ) nierozpuszczalny polimer, który jest barwny i dlatego można go obserwować w mikroskopie świetlnym [47], a na skrawkach półcienkich, na których występuje bardzo słabe znakowanie, także w mikroskopie fluorescencyjnym [49] i różnicowym mikroskopie interferencyjnym Nomarsky'ego [50]. Dużą zaletą polimeru DAB jest także to, że może być łatwo osmowany, co stwarza możliwość zaobserwowania go w mikroskopie elektronowym [20, 117]. Stosowane substraty dla innych enzymów: cytochrom C — DAB [29], glukozooksydaza — beta D-glukoza [25], fosfataza zasadowa — fosforan naftolu AS [37]. Metody znakowania przeciwciał (lub białek) za pomocą enzymów przedstawione są m. in. w pracach Avrameas i wsp. [2], Nakane i Kavoi [85], Falini i wsp. [37].

**1.3.3. Białka zawierające metal ciężki [92].** Praktyczne zastosowanie znalazła głównie ferrytyna. Ze zrozumiałych względów może być ona stosowana jedynie do celów mikroskopii elektronowej. Ferrytyna jest białkiem termostabilnym o c. cz. 600 000 — 700 000 i zawiera 23% żelaza. W mikroskopie elektronowym jest widoczna jedynie środkowa część cząsteczki zawierająca żelazo (wielkości ok. 5 nm). Mała wielkość cząsteczki i dobry kontrast który daje ferrytyna powodują, że ma ona stosunkowo duże zastosowanie. Ferrytyna może być zastosowana do znakowania m.in. przeciwciał, awidyny i lektyn [6, 8, 55, 92, 109]. Sposoby i problemy związane ze znakowaniem ferrytyną można znaleźć w cytowanych pracach.

**1.3.4. Metale ciężkie.** W latach sześćdziesiątych próbowano zastosować do znakowania przeciwciał różne metale ciężkie, np. żelazo, uran, rtęć lub ich proste związki [92], obecnie nie są one praktycznie stosowane i mają jedynie znaczenie historyczne. Szerokie zastosowanie znalazło w różnych metodach immunocytochemicznych złoto koloidalne [30]. Po raz pierwszy zostało ono użyte w metodach immunocytochemicznych przez Faulka i Taylora w 1971 r. [38]. Dużymi zaletami złota koloidalnego są bardzo dobry kontrast w mikroskopie elektronowym, stabilne i szybkie adsorbowanie białek, brak zmian w aktywności biologicznej zaadsorbowanego białka i możliwość tworzenia różnej wielkości (ale zawsze równej) cząstek złota, co umożliwia zastosowanie ich do wykrywania

kilku antygenów na jednym skrawku [32, 42, 46, 61, 102]. Złoto koloidalne ma duże zastosowanie w badaniach ultrastrukturalnych i to nie tylko immunocytochemicznych [13, 105].

Największe zastosowanie w immunocytochemii zyskało złoto koloidalne w tworzeniu kompleksów z proteiną A [12, 101, 107], z antygenami (GLAD) [70, 71], z awidyną [22] oraz z immunoglobulinami [30, 32]. Poza mikroskopem elektronowym transmisyjnym złoto koloidalne może być także użyte w mikroskopie elektronowym skaningowym ze względu na silną emisję elektronów wtórnych [45, 59, 60]. Dodatkową zaletą jest także fakt, że może być ono użyte do znakowania dla celów mikroskopii świetlnej [31, 34, 43, 51, 103]. W warunkach tych istnieje możliwość ciągłego monitorowania w mikroskopie tworzenia się znakowania. Możliwe jest także bardzo szerokie zastosowanie tego znacznika w różnych eksperymentach i na różnorodnym materiale. Może być zastosowane do wykrywania antygenów na skrawkach ultracienkich mrożonych [10, 44] i z plastiku [41, 62, 71, 98, 107], a ze względu na dobrą penetrację do komórek także w reakcjach przed zatopieniem materiału [32]. Ta ostatnia cecha została wykorzystana m. in. do wykrywania tubuliny w komórkach hodowanych bezpośrednio na siatkach mikroskopowo-elektronowych pokrytych formwarem [32]. Pewne nadzieje postępu wiąże się również z zastosowaniem opłaszczania złota koloidalnego przez przeciwciała monoklonalne, szczególnie wykorzystanie ich do wykrywania wielu antygenów na tych samych skrawkach [30].

Sposoby tworzenia złota koloidalnego są stosunkowo proste [40]. Polegają one na kontrolowanej redukcji kwasu czterochlorozłotowego w obecności eteru nasyconego białym fosforem [38, 104] (tworzą się cząstki wielkości od 3 do 5 nm) lub soli sodowej kwasu askorbinowego [58] (tworzą się cząstki wielkości 10-15 nm) lub cytrynianu sodu [40] (tworzą się cząstki wielkości 15-150 nm). Zaznaczyć należy, że stosowanie różnych stężeń tych związków daje różne wielkości cząstek złota w podanym zakresie, ale są one w danym przypadku zawsze równej, powtarzalnej wielkości. Dalszym etapem w przygotowaniu kompleksu ze złotem koloidalnym jest zadsorbowanie białka (np. proteiny A, awidyny, przeciwciał lub antygeny) na powierzchni cząstek złota koloidalnego. Najbardziej korzystne warunki adsorpcji otrzymuje się przy prowadzeniu reakcji w pH równym punktowi izoelektrycznemu białka i przy niskim stężeniu elektrolitów [42]. Zastosowanie tych warunków jest możliwe głównie w przypadku czystych białek, np. proteiny A lub syntetycznych antygenów. Mechanizm tworzenia kompleksów białko—złoto koloidalne jest stosunkowo dobrze poznany [42, 105, 107]. Cząsteczki złota w koloidzie są naładowane ujemnie i odpychają się od siebie. Dlatego różne kationy powodują ich agregację. Wprowadzone białko do roztworu złota koloidalnego zostaje zaadsorbowane na cząstkach złota na za-



sadzie sił elektrostatycznych Van der Waalsa i powoduje stabilizację koloidu. Po przeprowadzonej adsorpcji białka na cząstkach złota koloidalnego należy dodatkowo stabilizować otrzymany koloid. W tym celu dodaje się glikol polietylenowy (PEG) 20 000 [60] lub albuminę (BSA) [30, 32]. Wirowaniem roztworu usuwa się nadmiar białka użytego do adsorpcji. Po zawieszeniu osadu otrzymujemy odczynnik, który może być przechowywany miesiącami w temp. 4°C lub w roztworze z glicerolem poniżej 0°C [30].

**1.3.5. Pierwiastki promieniotwórcze.** Możliwości zastosowania pierwiastków promieniotwórczych jako znacznika do celów immunocytochemicznych były stosunkowo często wykorzystywane w różnych metodach, np. do znakowania antygenów, przeciwciał, proteiny A (m.in. [18, 72, 90, 91, 99]). Jednakże obecnie są one rzadko stosowane, głównie ze względu na trudności metodyczne oraz wprowadzenie innych prostszych znaczników dających lepszą lokalizację antygenów.

## 2. ZASADY METOD IMMUNOCYTOCHEMICZNYCH

### 2.1. METODY BEZPOŚREDNIE [125]

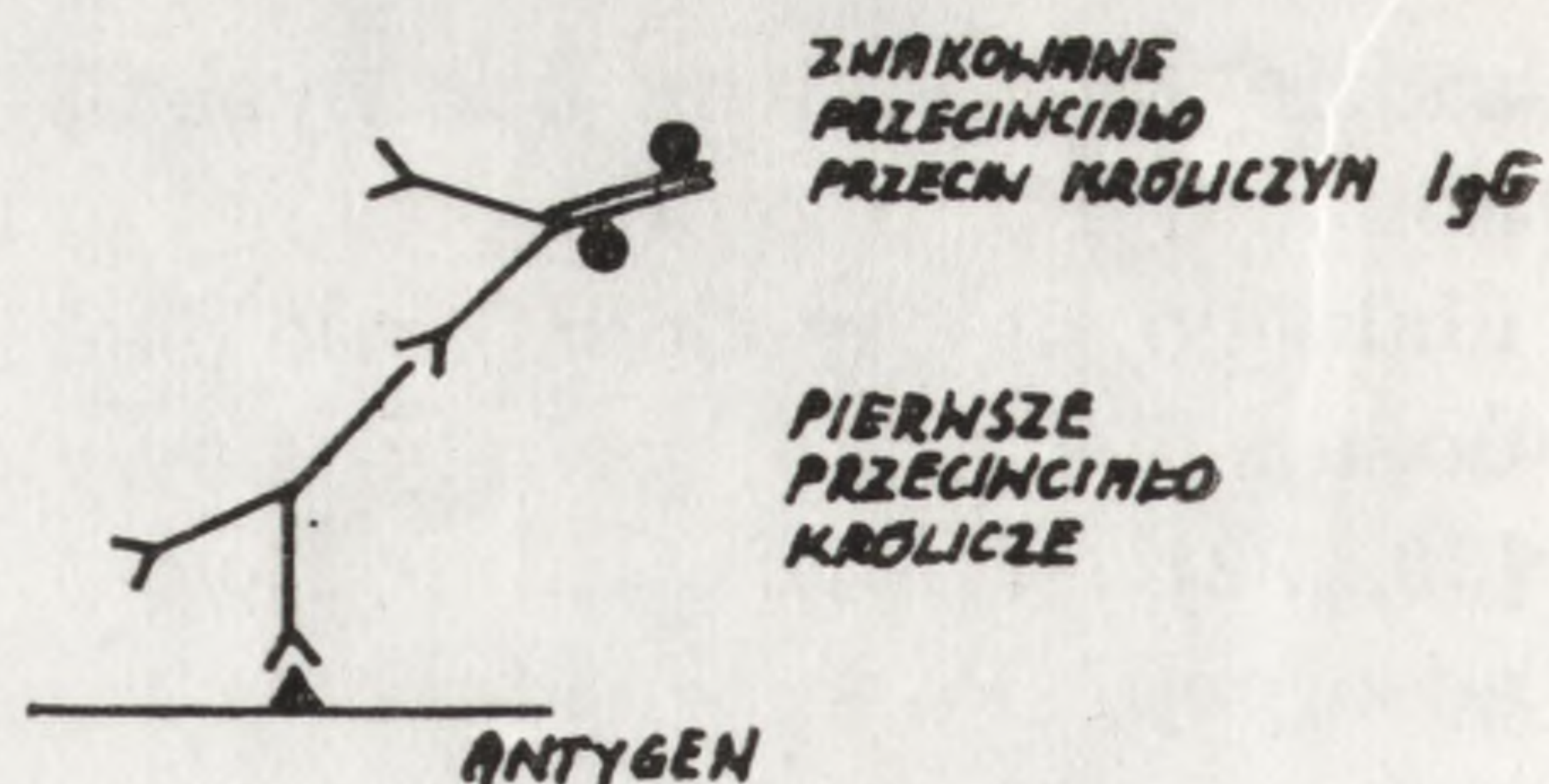
Są to klasyczne reakcje immunocytochemiczne polegające na stosowaniu znakowanego pierwszego przeciwciała (ryc. 5). Reakcje te są najbardziej proste w wykonaniu, ale też stosunkowo mało czułe ze względu na małą ilość znacznika występującego w miejscu występowania antygeny. Dużą niedogodnością tej metody jest konieczność oddzielnego znakowania każdego ze stosowanych pierwszych przeciwciał.

### 2.2. METODY WIELOSTOPNIOWE

Polegają one na stosowaniu kilkietapowych reakcji, w efekcie czego otrzymuje się wzmocnienie znakowania lub też wzrost specyficzności reakcji. Zaletą tych metod jest także to, że nie znakuje się pierwszego przeciwciała i dzięki temu nie ma strat w powinowactwie do antygeny [117]. Ponadto układy znakujące łączą się z reguły w większej ilości z pierwszym przeciwciałem, co wzmagą wielokrotnie ilość wprowadzonego znacznika. Ze względów praktycznych ważne jest także to, że te same układy znakujące można zastosować do przeciwciał przeciw różnorodnym antygenom. Ogólnie możemy podzielić je na metody, w których stosuje się dalsze przeciwciała (np. metody nieznakowanych przeciwciał), znakowane antygeny i metody, w których stosuje się układy bez przeciwciał (np. z proteiną A). Możliwe jest także stosowanie w jednym układzie kilku z wymienionych zasad (np. metody z przeciwciałem znakowanym haptensem, met. ABC).



Ryc. 5. Metoda bezpośrednia (schemat)



Ryc. 6. Metoda pośrednia (schemat)

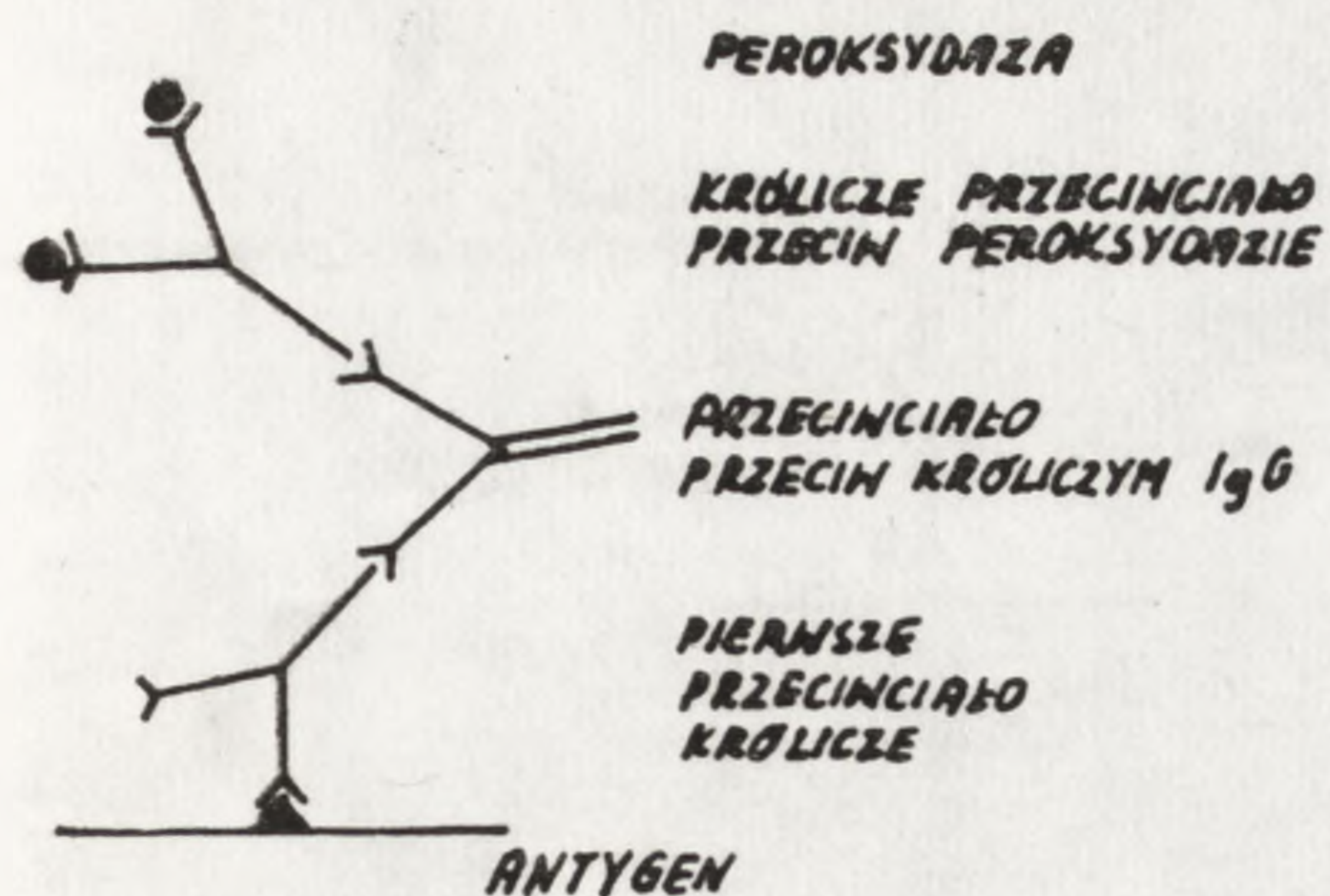
**2.2.1. Metoda pośrednia [92].** Polega na stosowaniu po pierwszym przeciwciele (np. od królika) znakowanego przeciwciała przeciw króliczym IgG (ryc. 6). Metody te są kilkakrotnie bardziej czułe niż bezpośrednio, stosunkowo proste w wykonaniu i przed wprowadzeniem innych czulszych metod (PAP, ABC) były bardzo powszechnie stosowane. Obecnie są one stosowane w enzymoimmunologicznych metodach oznaczania poziomu hormonów lub przeciwciał, np. ELISA [92].

**2.2.2. Metody nieznakowanych przeciwciał.** Metody te polegają na stosowaniu układu przeciwciał, przy czym żadne z nich nie jest znakowane. Znacznik wprowadzony jest do tego układu w ostatnim etapie, gdyż antygenem dla ostatniego z użytych przeciwciał jest stosowany znacznik. Znacznikiem jest najczęściej peroksydaza. Duża czułość tych metod (kilkaset razy większa niż metod bezpośrednich) wynika ze stosowania nieznakowanych przeciwciał i wielostopniowości reakcji (przeciwciała heteroklonalne łączą się z wieloma determinantami antygenowymi poprzedniego przeciwciała), co powoduje przyłączenie dużej ilości znacznika.

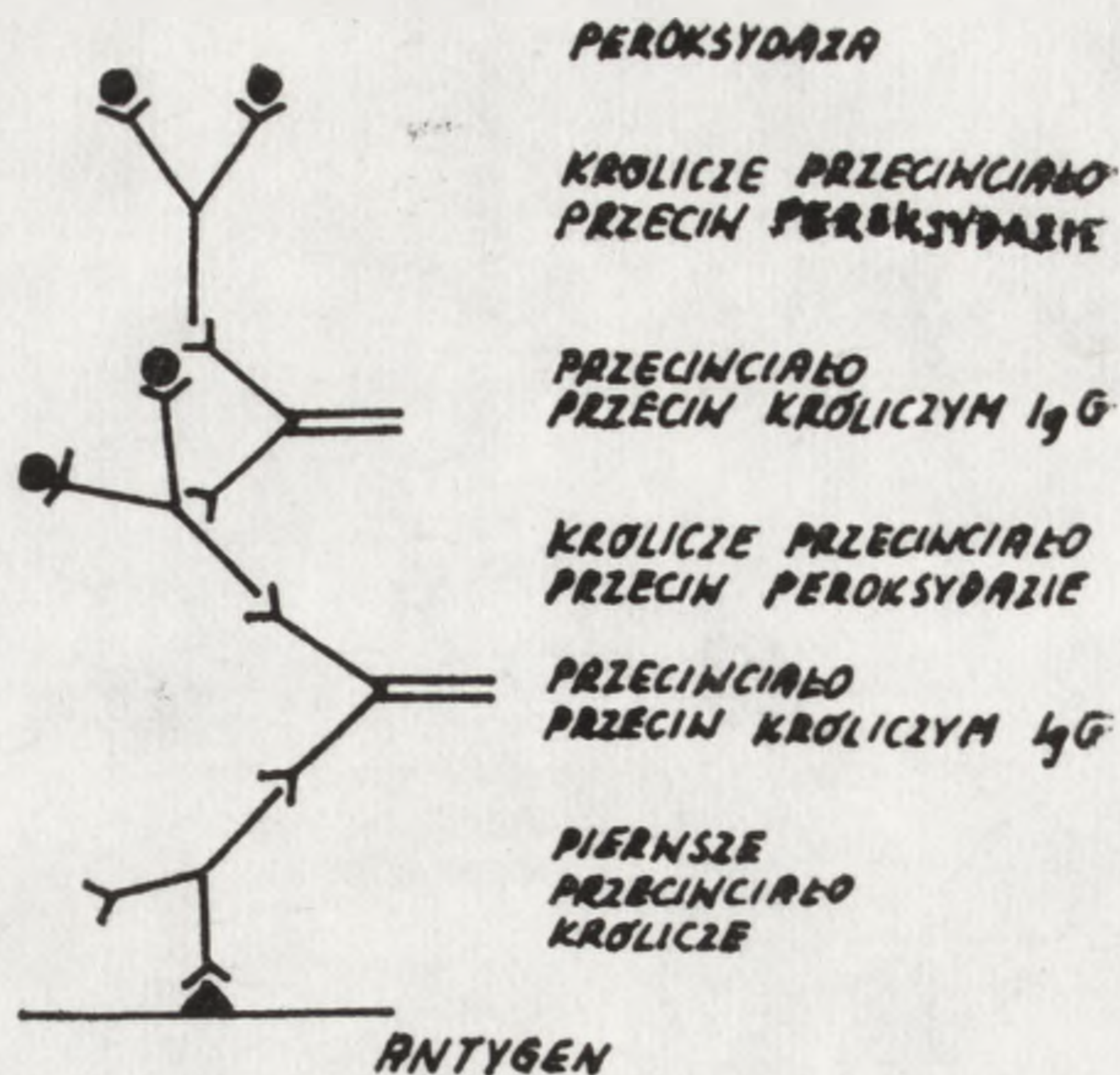
W metodach, które omówimy, przykładowo podane zostały układy, gdzie pierwsze przeciwciało uzyskane zostało od królika, a znacznikiem jest peroksydaza.

**2.2.2.1. Mostek pojedynczy [77, 94, 118].** Stosujemy tutaj kolejno pierwsze przeciwciało królicze, przeciwciało przeciw króliczym IgG, królicze przeciwciało przeciw peroksydazie i peroksydazę (ryc. 7).

**2.2.2.2. Mostek podwójny [88].** Metoda ta polega na identycznej zasadzie jak poprzednio opisana, lecz przed peroksydazą stosuje się ponownie przeciwciało przeciw króliczym IgG, a następnie znów królicze przeciwciało przeciw peroksydazie. Ostatni etap jest identyczny i polega na stosowaniu peroksydazy (ryc. 8). Metoda ta jest bardziej czuła niż mostek pojedynczy, gdyż wprowadza się więcej cząsteczek peroksydazy. Jednak obie te metody są obecnie rzadziej stosowane niż metoda PAP, gdyż stosuje się w nich wiele etapów, a czułość nawet w mostku



Ryc. 7. Metoda nieznakowanych przeciwciał — mostek pojedynczy (schemat)

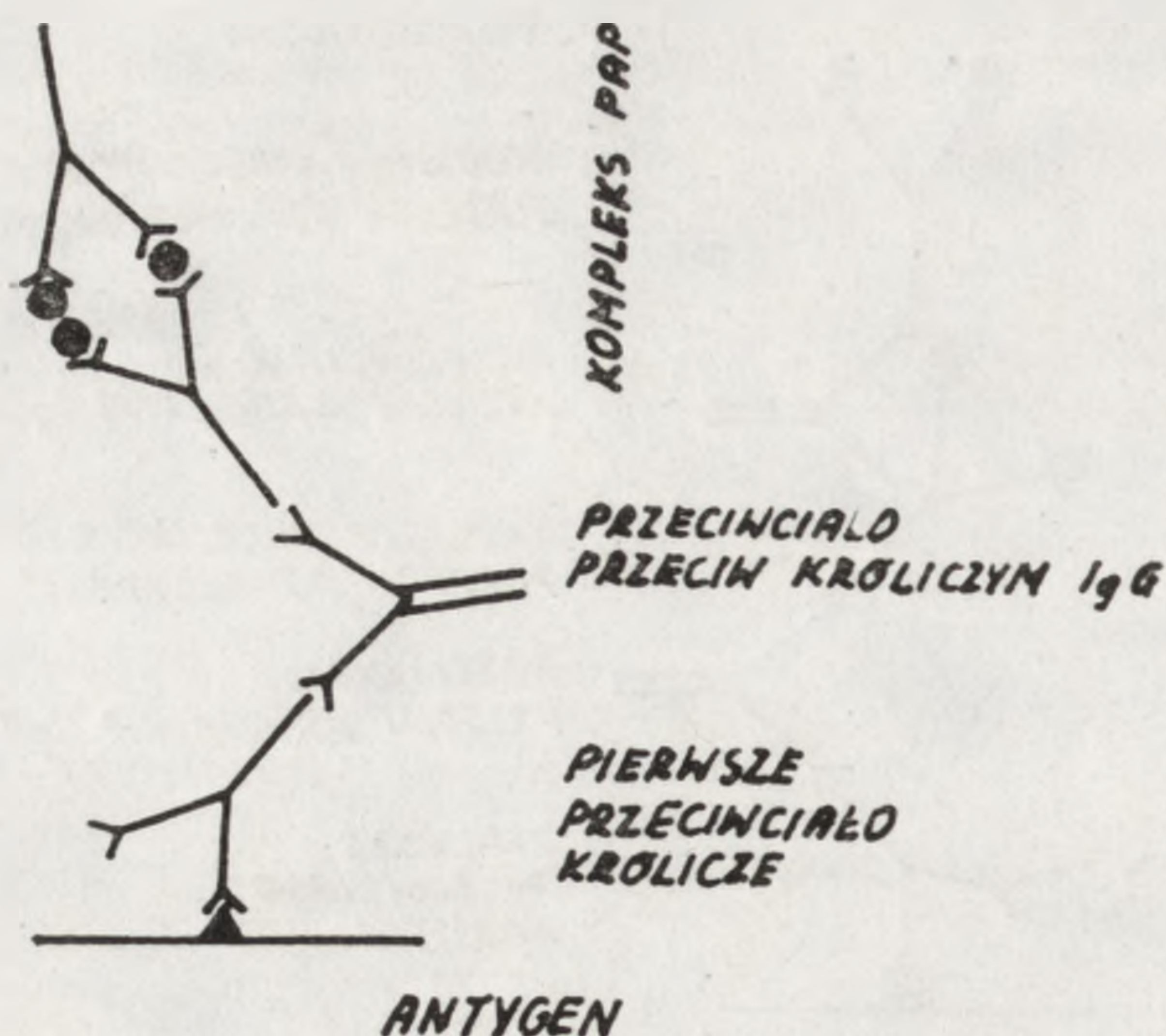


Ryc. 8. Metoda nieznakowanych przeciwciał — mostek podwójny (schemat)

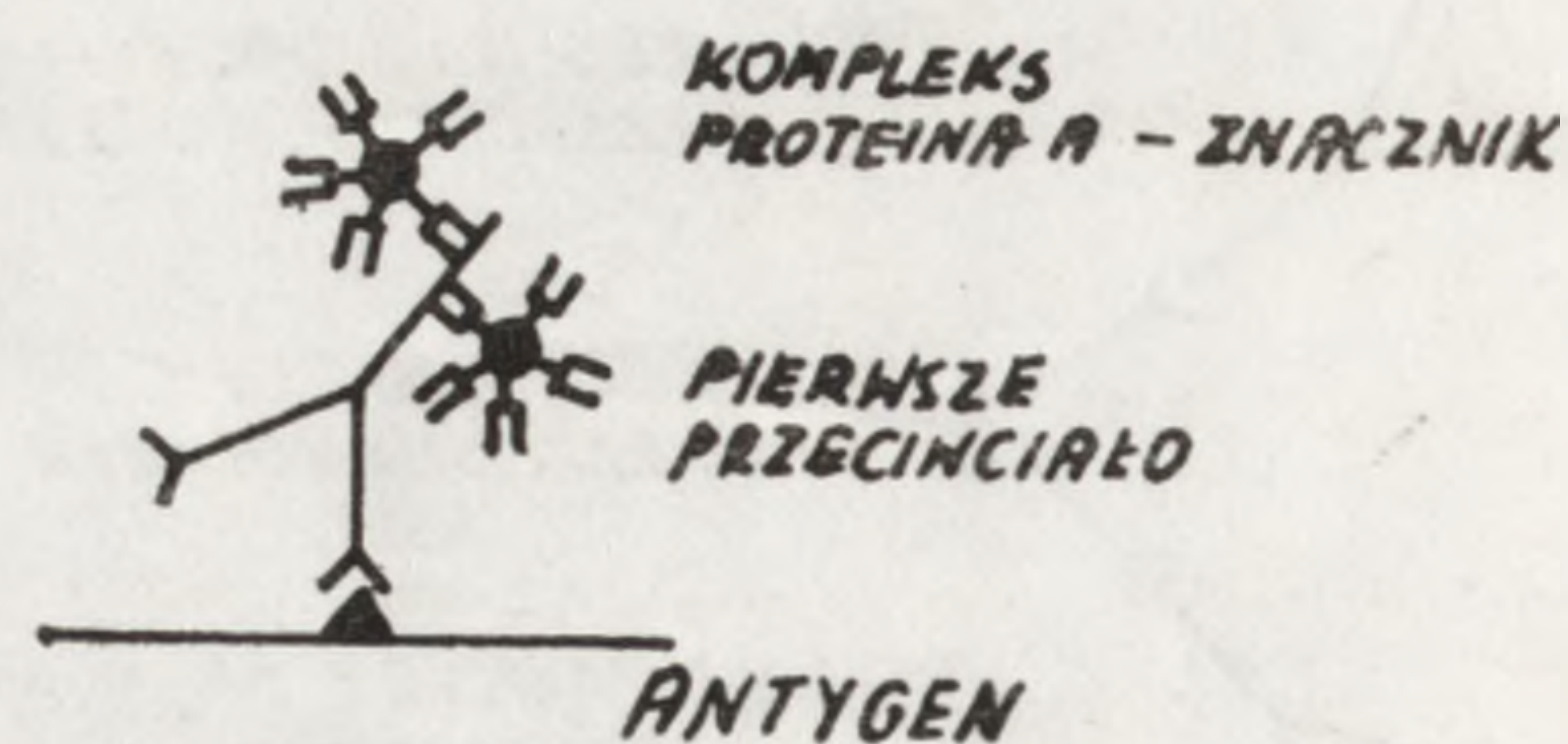
podwójnym nie jest większa niż w metodzie PAP. Ponadto w obu metodach mostku pojedynczym i podwójnym stosuje się pewien nadmiar peroksydazy, co może wpływać na zwiększenie niespecyficzności reakcji (patrz podrozdział 3.3).

**2.2.2.3. Metoda PAP [20, 117] (ryc. 22 i 23).** Metoda ta znalazła duże zastosowanie w immunocytochemii ze względu na dużą czułość i względną prostotę w przeprowadzeniu reakcji. Zasadniczym elementem było tu wprowadzenie kompleksu peroksydaza—antyperoksydaza (PAP). Kompleks PAP jest zbudowany z dwóch przeciwciał króliczych przeciw peroksydazie i trzech cząsteczek peroksydazy. Najprawdopodobniejszy układ cząsteczek peroksydazy i przeciwciał w kompleksie PAP [117] podany został na ryc. 9. Sposób przygotowywania kompleksu PAP podany jest w pracy Sternbergera i wsp. [117]. Obecnie stosować można gotowy kompleks PAP produkowany przez wiele firm. Wykonanie tej reakcji polega na stosowaniu dwóch pierwszych etapów, podobnie jak w metodzie mostka pojedynczego, a w etapie trzecim stosujemy kompleks PAP, co schematycznie przedstawia ryc. 9.

**2.2.2.4. Inne metody z nieznakowanymi przeciwciałami.** Metody te są oparte na identycznych jak poprzednio zasadach, ale możliwe jest zastosowanie przeciwciał i kompleksu PAP od innych zwierząt lub też zastosowanie innego enzymu jako znacznika, np. fosfatazy zasadowej [75]. Szczególnie zalecana jest metoda GAG, czyli metoda z kompleksem glukozooksydaza—antyglukozooksydaza [25]. Metoda ta jest przeprowadzona identycznie jak metoda z PAP, ale ma ona być jeszcze bardziej czuła. Możliwe jest także przygotowanie kompleksu PAP z przeciwciał monoklonalnych [76].



Ryc. 9. Metoda nieznakowanych przeciwciał z kompleksem peroksydaza — antyperoksydaza (PAP) (schemat)



Ryc. 10. Metoda z kompleksem proteina A—znacznik, np. złoto koloidalne (schemat)

**2.2.3. Proteina A [87, 120]** (ryc. 26). Proteina A jest białkiem o c.c.z. 42 000, bardzo stabilnym w szerokim zakresie pH od 0.99 do 11.8. Została ona wyizolowana ze ściany komórkowej bakterii *Staphylococcus aureus*. Zasadniczą cechą biologiczną tego białka jest duże powinowactwo do IgG wielu gatunków i częściowo także do IgA i IgM. Istnieją jednak pewne różnice w wiązaniu proteiny A do Ig, zależnie od gatunku i klasy (tab. 1). Proteina A wiąże się do części Fc Ig, a nie do części

TABELA 1

Wiązanie immunoglobulin różnych gatunków i klas przez proteinę A (według [120])

Gatunek	Rodzaj immunoglobuliny	Podklasy
Człowiek	IgG	1, 2, 4,
	IgA	2
	IgM	niektóre
Królik	IgG (kompleksy rozpuszczalne)	
Mysz	IgM (słabo)	
	IgG	1 (słabo) 2a, 2b, 3
Szczur	IgG	1, 2c
Świnka morska	IgG	1, 2
Krowa	IgG	2 (słabo)
Owca	IgG	2 (słabo)
Koza	IgG	2 (słabo)
Pies	IgG	a, b, c, d
	IgA	niektóre
	IgM	niektóre

Fab. Każda cząsteczka proteiny A ma cztery miejsca do łączenia z Fc IgG i jedno miejsce, którym łączy się z peptydoglikanem ściany komórkowej bakterii. Stała dysocjacji wiązania proteiny A z ludzką lub króliczą IgG wynosi od  $4 \times 10^7$  do  $2 \times 10^8 \text{ mol}^{-1}$ , co pozwala użyć proteiny A do izolowania IgG metodą fazy stałej. Podane właściwości proteiny A są wykorzystywane w wielu technikach immunocytochemicznych. Szczególnie ważna jest zdolność proteiny A do wiązania Fc IgG. Najczęściej stosowane jest bezpośrednie łączenie proteiny A ze znacznikiem np. złotem koloidalnym [14, 30, 101, 104, 107], peroksydazą [36], ferrytyną [9] lub znakowanie  $^{125}\text{J}$  [18] i stosowanie ich w drugim etapie po stosowaniu pierwszego przeciwciała (ryc. 10). Szczególnie godne polecenia są kompleksy proteiny A—złoto koloidalne dające bardzo dobre rezultaty w lokalizacji antygeny na poziomie ultrastrukturalnym. Ze względu na użycie immunoglobulin tylko jako pierwszego przeciwciała należy stosować nieco inne metody blokowania nieswoistego wiązania. W tym celu stosuje się najczęściej albuminę bydlęcą lub owoalbuminę [14, 107].

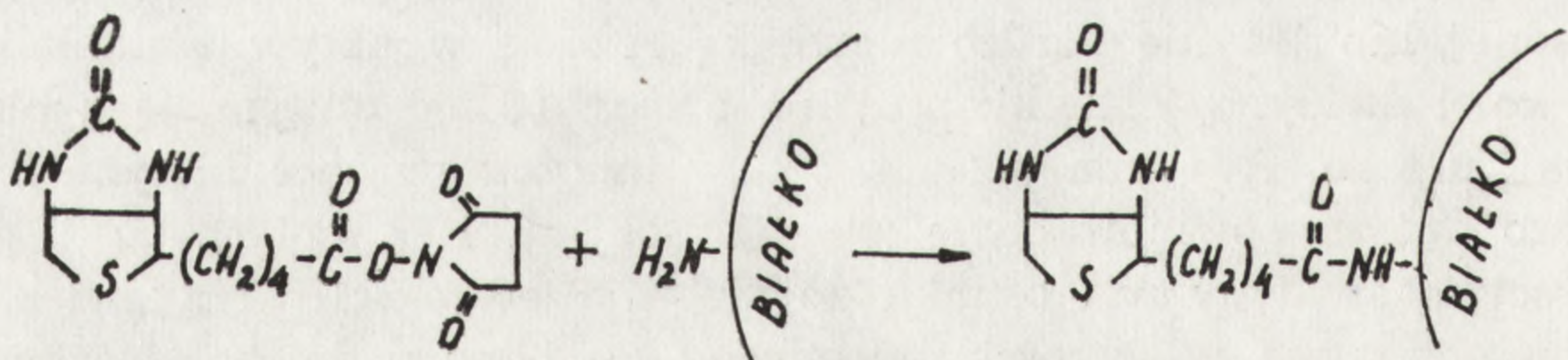
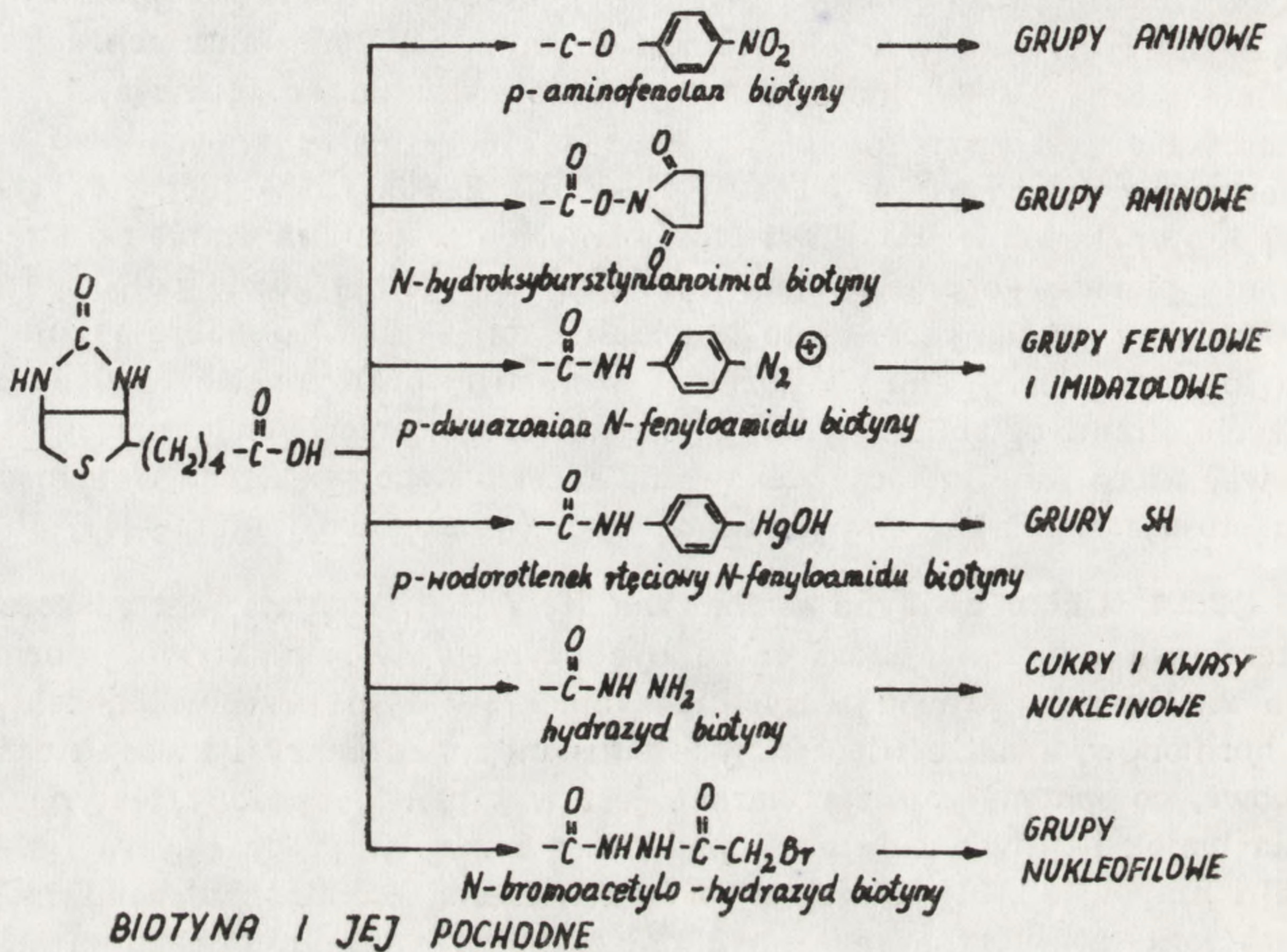
**2.2.4. Układ awidyna — biotyna [6, 7, 52].** Biotyna jest niskocząsteczkową witaminą, która może być użyta w swojej aktywnej formie do znakowania prawie wszystkich białek, w tym przeciwciał, lektyn i hormonów, a także wielu innych substancji, jak cukry i kwasy nukleinowe, co schematycznie pokazane jest w tabeli 2. Sposoby biotynowania białek i innych substancji podane są m. in. w pracy Bayera i wsp. [5] i innych [52, 81]. Ważny z punktu widzenia immunocytochemicznego jest fakt, że biotyna może być dołączona w wielu miejscach, a więc jedna cząsteczka znakowanego związku ma wiele wbudowanych cząsteczek biotyny. Ponadto wiadomo, że biotynowanie nie powoduje najczęściej żadnej lub jedynie bardzo niewielką różnicę w aktywności białka.

Z kolei awidyna jest glikoproteiną o c.c.z. 68 000 otrzymaną z białka jaja kurzego. Awidyna posiada cztery miejsca wiążące biotynę i to o bardzo dużym powinowactwie (stała dysocjacji  $10^{15} \text{ mol}^{-1}$ ). Czyli powinowactwo awidyny w stosunku do biotyny jest ok.  $10^6$  razy większe niż powinowactwo większości przeciwciał do odpowiedniego antygeny. Te cechy awidyny i biotyny wykorzystane zostały między innymi do opracowania bardzo czułych metod immunocytochemicznych. Możliwość kombinacji metod jest olbrzymia, tym bardziej że także awidyna może być użyta do tworzenia kompleksów z innymi substancjami, np. z przeciwciałami lub znacznikami [5, 52].

**2.2.4.1. Metoda IBRAB, czyli metoda pośredniego mostka z użyciem awidyny i biotyny [64].** Metoda ta w zasadzie jest podobna do metody mostka pojedynczego w metodzie nieznakowanych przeciwciał. Stosuje się tutaj kolejno: pierwsze przeciw-

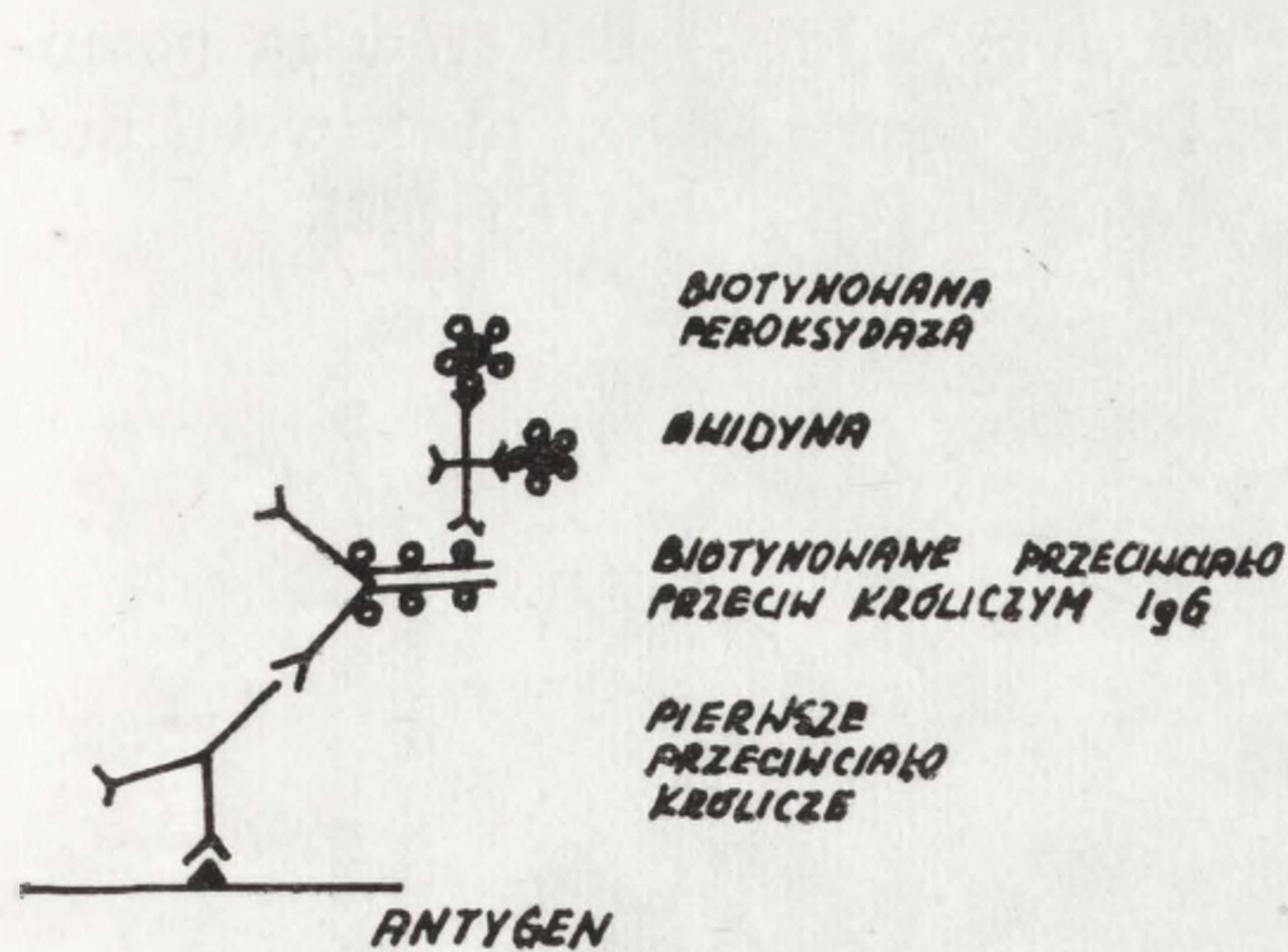
TABELA 2

Biotyna i jej pochodne, za pomocą których można biotynować podane po prawej stronie grupy chemiczne lub związki. U dołu podano przykład biotynowania białka (zmienione według [7])

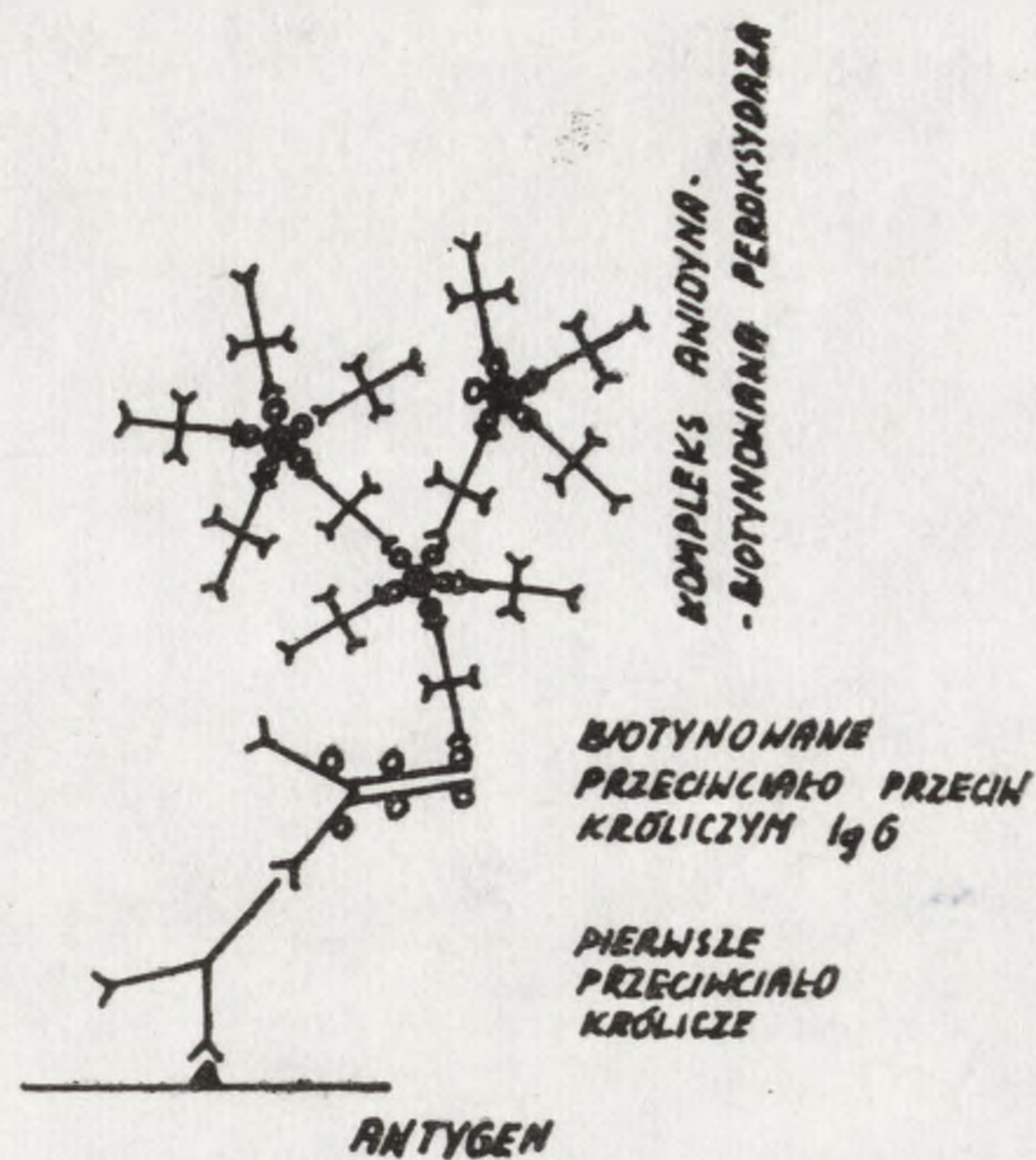


ciało (np. królicze), biotynowane przeciwciało przeciw króliczym IgG, awidynę i biotynowaną peroksydazę (ryc. 11).

2.2.4.2. Metoda ABC, czyli metoda z użyciem kompleksu awidyna—biotynowana peroksydaza [23, 24, 64] (ryc. 21 i 24). Dalszym etapem w rozwoju metod immunocytochemicznych z użyciem awidyny—biotyny było rozwinięcie czulszej i prostszej niż IBRAB metody, którą nazwano metodą ABC. Zasadniczą cechą tej metody jest tworzenie kompleksu awidyna—biotynowana peroksydaza



Ryc. 11. Metoda IBRAB, czyli metoda pośredniego mostka z użyciem awidyny i biotyny (schemat)



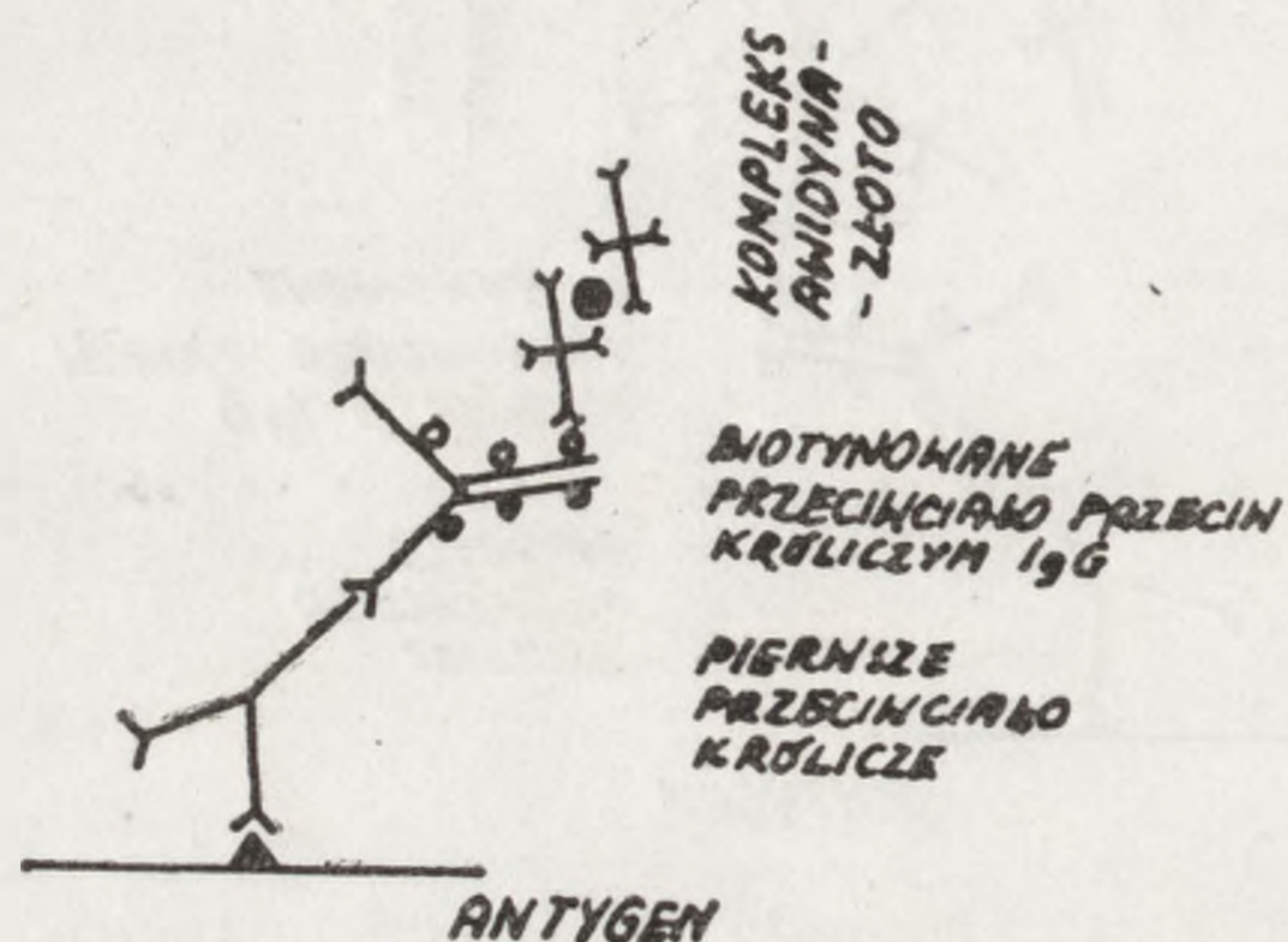
Ryc. 12. Metoda ABC, czyli metoda z kompleksem awidyna—biotynowana peroksydaza (schemat)

przed zastosowaniem jej w reakcji immunocytochemicznej. Użycie odpowiednich stężeń obu substancji (awidyna — 10  $\mu\text{g/ml}$  i biotynowana peroksydaza — 5  $\mu\text{g/ml}$ ) prowadzi do powstania olbrzymich kompleksów o nieznannej bliżej strukturze, ale zawierającej wiele cząsteczek peroksydazy (ryc. 12). Stosowanie innych niż podano stężeń któregoś z reagentów powoduje znaczne osłabienie reakcji ABC. Samo wykonanie reakcji polega na stosowaniu kolejno: pierwsze przeciwciało (np. królicze), biotynowane przeciwciało przeciw króliczym IgG i w ostatnim etapie kompleks awidyna—biotynowana peroksydaza (ryc. 12). Metoda ta cechuje się bardzo dużą czułością (ok. 10-50 razy większą niż PAP), co umożliwia stosowanie wyższych rozcieńczeń pierwszego przeciwciała, a to w efekcie zmniejsza zdecydowanie niespecyficzność reakcji.

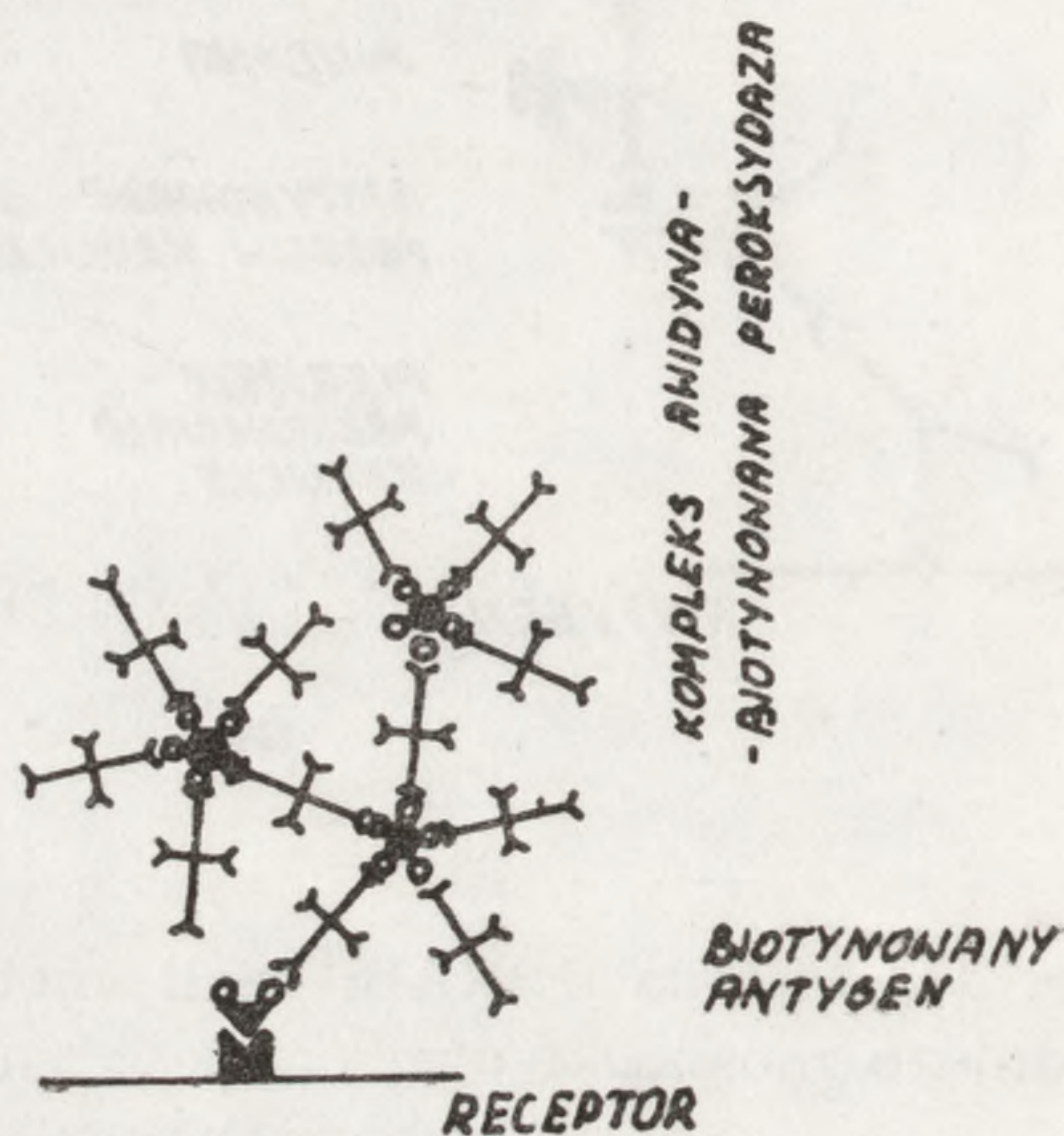
**2.2.4.3. Metoda z kompleksem awidyna—znacznik** [52]. Metoda ta jest mniej czuła niż metoda ABC. Zasadniczym elementem jest kompleks awidyna—znacznik, np. złoto koloidalne lub peroksydaza, stosowany w ostatnim etapie reakcji. Reakcja przebiega według schematu — pierwsze przeciwciało (np. królicze), biotynowane przeciwciało przeciw króliczym IgG, kompleks awidyna—znacznik, np. złoto koloidalne (ryc. 13).

**2.2.4.4. Inne metody i sposoby wykorzystania układu awidyna—biotyna.** Układ ten może być zastosowany także do metod z innymi znacznikami, np. awidyna znakowana ferrytyną [6], awidyna znakowana enzymami [52] lub biotynowany antygen [81]. Układ

ten może być także wykorzystany do wykrywania receptorów za pomocą biotynowanego liganda [81] (ryc. 14) do oceny jakości przeciwciał metodą fazy stałej, badań radioimmunologicznych i innych [52].



Ryc. 13. Metoda z kompleksem awidyna—znacznik np. złoto koloidalne (schemat)



Ryc. 14. Metoda immunocytochemicznego wykrywania receptorów przy pomocy biotynowanego liganda i metody ABC (schemat)

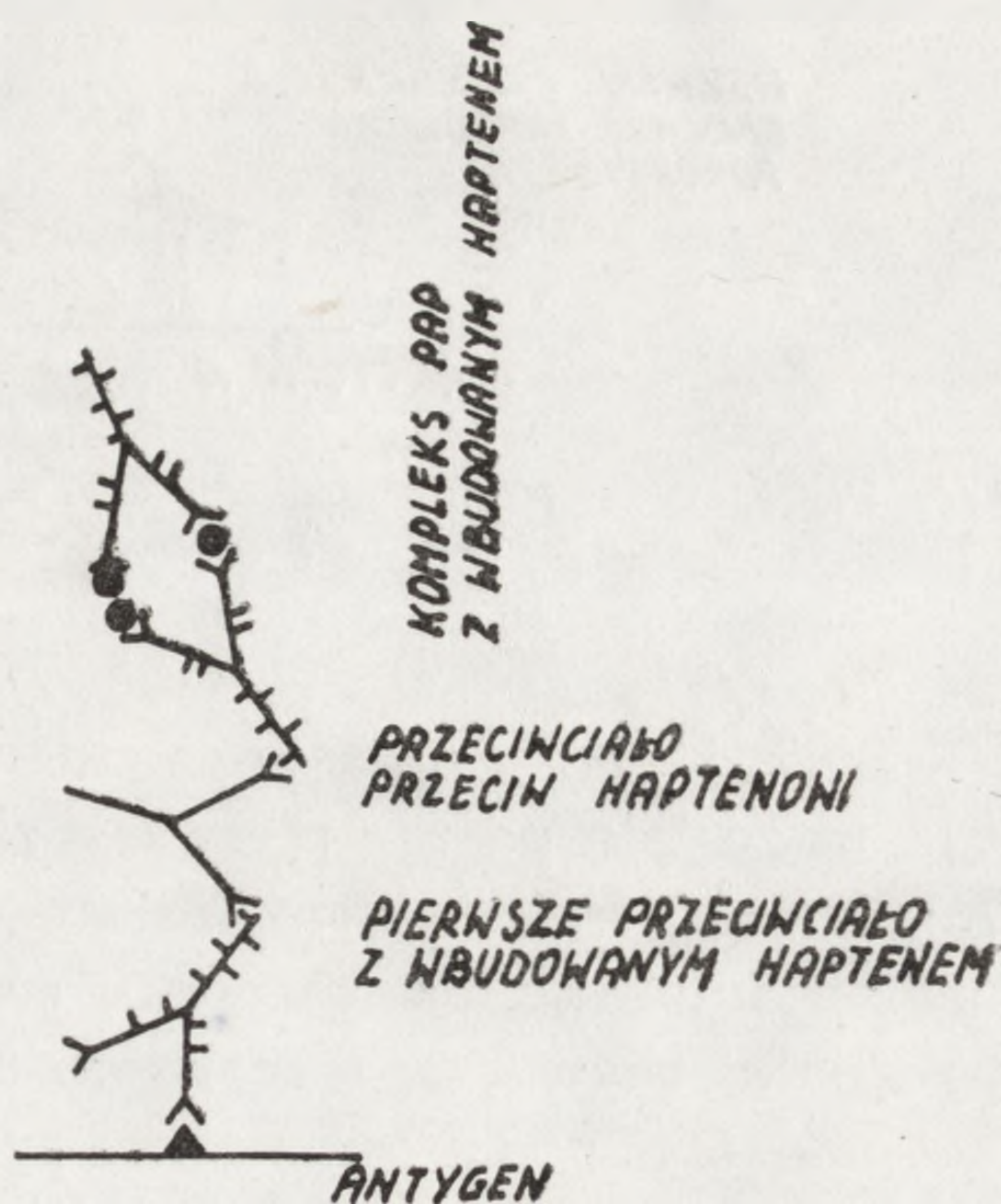
**2.2.5. Metody znakowanych antygenów [70] (ryc. 25).** Polegają one na tworzeniu kompleksu antygen—znacznik i używaniu go w drugim etapie, po stosowaniu pierwszego przeciwciała (ryc. 15). Najczęściej stosowanymi znacznikami są tu enzymy, np. peroksydaza, fosfataza zasadowa [37] lub złoto koloidalne [70]. Zaletą tych metod jest duża swoistość, a przede wszystkim możliwość wykorzystania ich do wykrywania kilku antygenów na jednym skrawku poprzez zastosowanie w ostatnim etapie różnych znaczników skompleksowanych z kolejnymi antygenami. Pewną odmianą jest tutaj zastosowanie biotynowanego antygeny, który może być wykrywany metodą ABC [81].

**2.2.6. Metoda z przeciwciałami z wbudowanym haptenu [21, 66].** Uważana jest za bardzo swoistą i czułą metodę wymagającą jednak wielu dodatkowych czynności. Zasadniczą ideą metody jest stosowanie pierwszego przeciwciała z wbudowanym haptenu. Pierwsze przeciwciało ma wiele cząstek haptenu, przez co stosowane w drugim etapie przeciwciało przeciw haptenui wzmacnia znakowanie. Dalsze etapy uzależnione już są zastosowaniem bądź klasycznej metody PAP, bądź kompleksu PAP z wbudowanym haptenu (ryc. 16) lub ewentualnie innych z omówionych metod. Metoda ta ze względu na dużą czułość i specyficzność jest szczególnie zalecana przy stosowaniu przeciwciał monoklonalnych.





Ryc. 15. Metoda ze znakowanym antygenem (schemat)



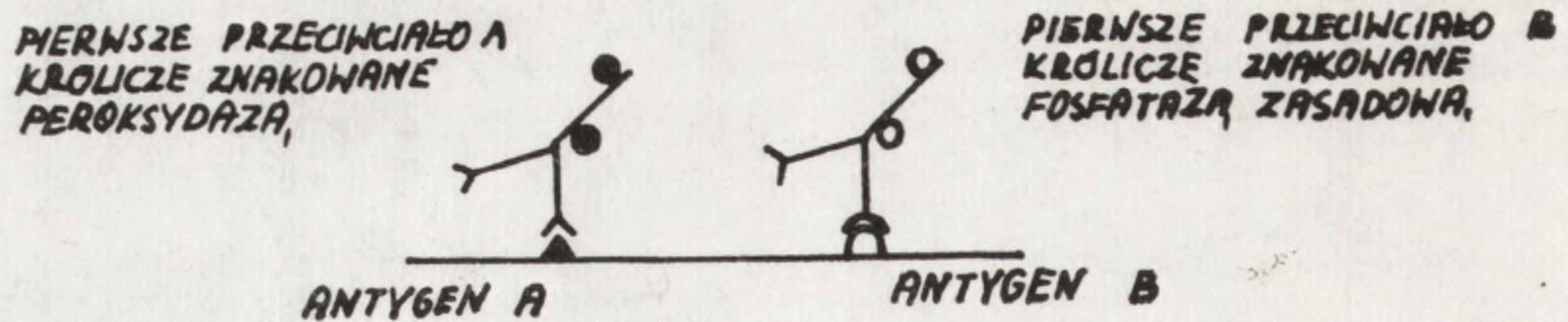
Ryc. 16. Metoda z przeciwciałami z wbudowanym haptenem (schemat)

### 2.3. METODY RÓWNOCZESNEGO WYKRYWANIA KILKU ANTYGENÓW

Często konieczne jest wykrywanie równoczesne kilku antygenów, aby odpowiedzieć, czy antygeny te znajdują się w tych samych komórkach lub organellach komórkowych. Klasycznym tego przykładem mogą być problemy związane z oceną występowania wielu hormonów w tych samych komórkach dokrewnych, szczególnie w komórkach serii APUD. Inny przykład to wykrywanie kilku różnych Ig lub ich łańcuchów. Pierwszy, który zastosował równoczesne wykrywanie kilku antygenów, był Nakane [84]. Wykorzystał on metodę usuwania przeciwciał i wykrywał na tym samym skrawku kilka hormonów w przysadce mózgowej. Możliwe jest stosowanie prawie nieograniczonej możliwości kombinacji różnych metod, znaczników i technik.

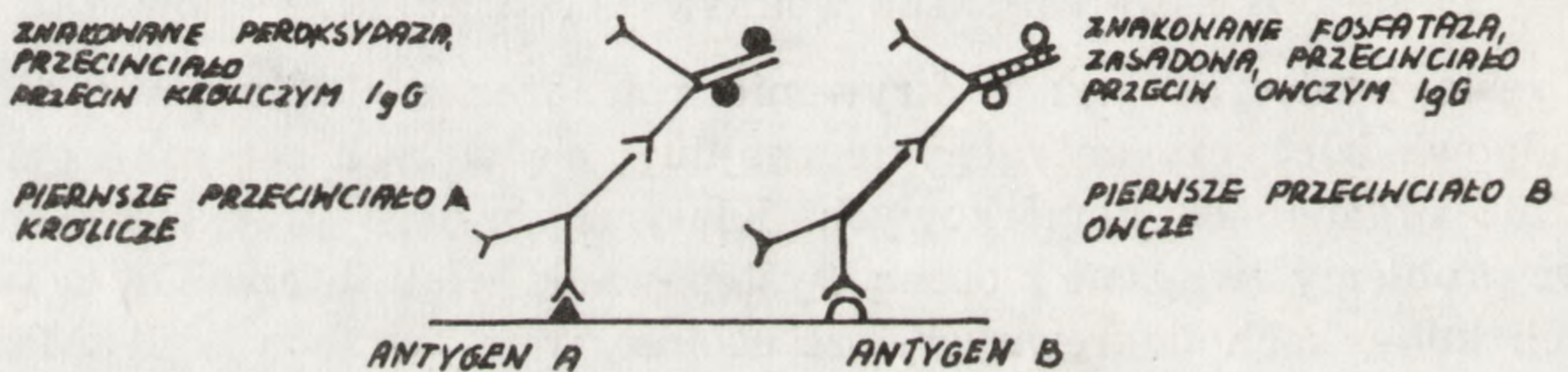
**2.3.1. Metoda usuwania przeciwciał [84, 123].** Została ona wprowadzona przez Nakane [84]. Zasada jej polega na tym, że w niskim pH można wyeluować przeciwciała, a produkt reakcji pozostaje na skrawku. W metodzie tej stosuje się kolejno znakowane peroksydazą przeciwciało A, a potem reakcję z DAB, eluowanie przeciwciał w niskim pH, znakowane peroksydazą przeciwciało B i reakcja z innym substratem (dającym inne zabarwienie). Reakcje te mogą być jeszcze powtarzane, jeżeli chcemy wykazać więcej niż dwa antygeny.

**2.3.2. Metoda bezpośrednia z użyciem dwóch znaczników [37, 69, 125].** Polega ona na stosowaniu dwóch różnych pierwszych przeciwciał znakowanych np. różnymi enzymami lub fluorochromami (ryc. 17).



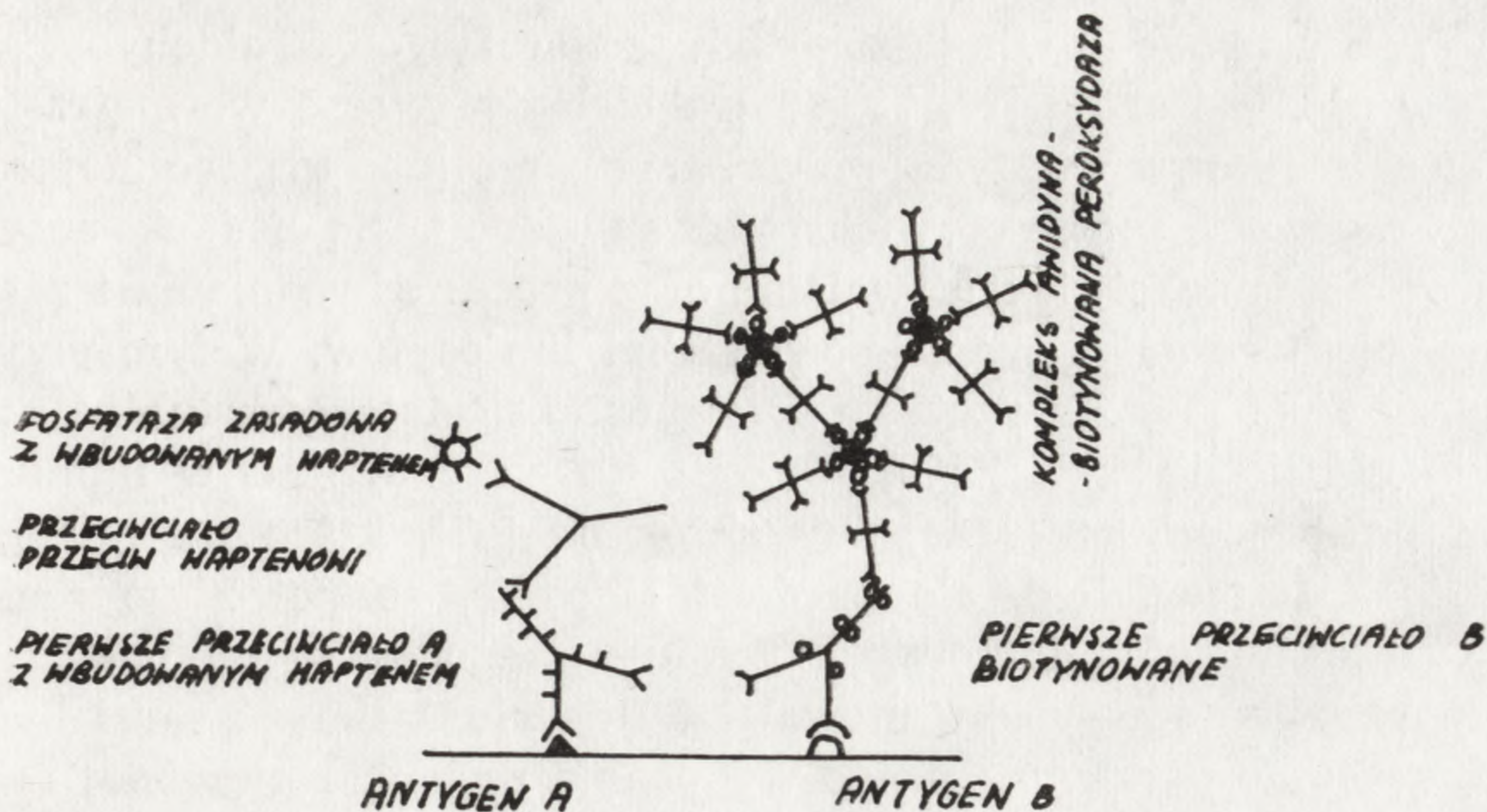
Ryc. 17. Metoda równoczesnego wykrywania dwóch antygenów tkankowych metodą bezpośrednią z użyciem dwóch różnych znaczników (schemat)

**2.3.3. Metody z zastosowaniem różnogatunkowych przeciwciał.** Metoda ta została po raz pierwszy zastosowana przez Masona i Sammons [78]. Polega ona na tym, że stosuje się pierwsze przeciwciała przeciw różnym antygenom uzyskane u różnych zwierząt (np. u królika i u owcy) i dalej używa się dwa różne układy immunoenzymatyczne lub inne. Przykład taki podany został na ryc. 18. Pewną odmianą tej metody jest zastosowanie jednogatunkowych przeciwciał monoklonalnych różnych podklas, np. IgG1 i IgG2a [75].

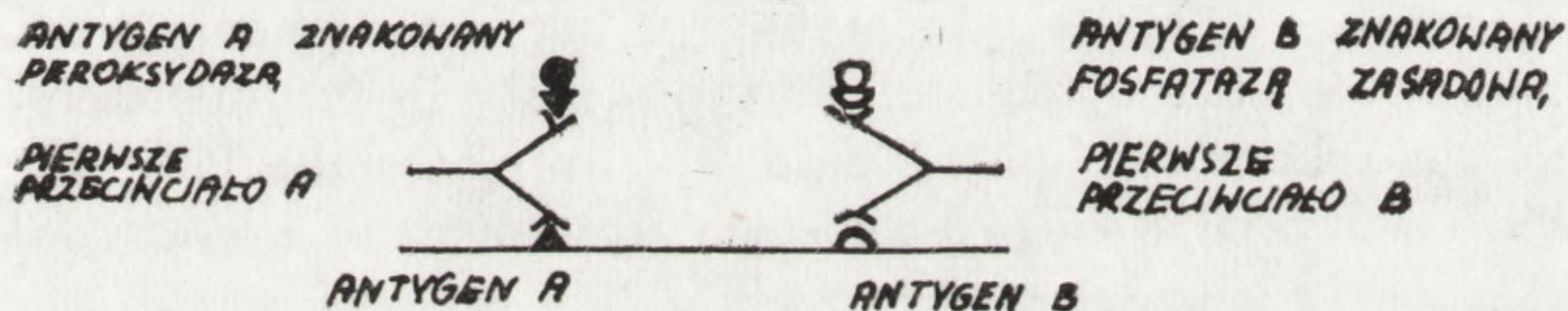


Ryc. 18. Równoczesne wykrywanie dwóch antygenów za pomocą różnogatunkowych przeciwciał na przykładzie metody pośredniej (schemat)

**2.3.4. Kombinacje różnych metod immunocytochemicznych.** Możliwość kombinacji jest praktycznie nieograniczona. Przykładowo można zastosować równolegle dwa pierwsze przeciwciała z wbudowanym haptenem [126] lub kombinacje tej metody z układem awidyna—biotyna [75] (ryc. 19). Możliwe jest także zastosowanie do tych celów dwóch znakowanych antygenów (ryc. 20) za pomocą różnych enzymów lub różnej wielkości złota koloidalnego [37, 104]. Roth [104] zastosował do wykrywania dwóch antygenów na skrawkach ultracienkich kompleksy proteiny A ze złotem koloidalnym różnej wielkości 3 nm i drugi 15 nm. Do celów mikroskopii świetlnej zastosował ten sam autor [103] dwa kompleksy proteiny A ze złotem i srebrem koloidalnym. W mikroskopie optycznym koloid złota daje barwę czerwoną, a koloid srebra żółtą.



Ryc. 19. Metoda równoczesnego wykrywania dwóch antygenów za pomocą różnych metod immunocytochemicznych na przykładzie metody z przeciwciałami z wbudowanym haptenem i metody ABC (schemat)



Ryc. 20. Równoczesne wykrywanie dwóch antygenów za pomocą metody ze znakowanymi antygenami (schemat)

2.3.5. Metoda skrawków seryjnych [50, 112, 129]. Możliwe jest wykrywanie kilku antygenów na skrawkach seryjnych z zastosowaniem tej samej metody immunocytochemicznej zarówno dla celów mikroskopii świetlnej, jak i elektronowej.

### 3. UWAGI PRAKTYCZNE WYKONYWANIA REAKCJI IMMUNOCYTOCHEMICZNYCH

#### 3.1. UTRWALANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU

W celu wykonania reakcji immunocytochemicznej poszukiwany antygen musi pozostać w tkance nierozpuszczalny, powinien być możliwie łatwo dostępny dla przeciwciała, przy czym ogólna struktura tkanki powinna być możliwie dobrze zachowana. Najczęściej bardzo dobre wyniki uzyskuje się po utrwaleniu w formaldehydzie lub w glutaraldehy-

dzie lub po utrwaleniu w mieszaninach zawierających te aldehydy, szczególnie w płynie Bouina [70, 73, 125]. Aldehydy tworzą wewnątrz- i zewnątrzcząsteczkowe wiązania między białkami [53, 57], co najczęściej nie niszczy antygenowości większości substancji. Są jednak antygeny wrażliwe na jakiegokolwiek utrwalanie oraz proces odwadniania i zatapiania, np. niektóre antygeny na powierzchni limfocytów. W tym przypadku należy wykonywać reakcję na skrawkach kriostatowych lub na skrawkach tkanki liofilizowanej [70, 125]. Często zalecany jest w immunocytochemii p-benzochinon [124] lub akroleina [67], które utrwalają, podobnie jak formaldehyd, ale bardziej łagodnie, co powoduje mniejsze straty antygenowości. Przy wykrywaniu nowego antygeny należy zawsze wypróbować odpowiedni utrwalacz. Utrwalona tkanka musi być dalej odpowiednio przygotowana do wykonania reakcji. Najczęściej reakcja wykonywania jest na skrawkach parafinowych przygotowanych w sposób rutynowy lub rzadziej zatopionych w próżni [70, 92]. Ten ostatni sposób zatapiania jest szczególnie przydatny do wykrywania łatwo rozpuszczalnych antygenów wewnątrzkomórkowych. Antygeny zewnątrzkomórkowe i błonowe są najlepiej wykrywane na nieutrwalonych skrawkach kriostatowych. Metoda ta może być także zastąpiona przez wykonanie reakcji immunocytochemicznej na małych fragmentach tkanek lub zawiesinie komórek, przed zatopieniem materiału [70,125]. Często dobre wyniki uzyskuje się przez zastosowanie proteaz bezpośrednio przed

TABELA 3

Sposoby utrwalania i przygotowywania tkanki dla celów immunocytochemii (zmienione według [125])

Rodzaje antygeny	Utrwalanie	Przygotowanie tkanki
Antygeny zewnątrzkomórkowe np. immunoglobuliny w błonie podstawnej kłębuszków nerkowych	1. świeże 2. zimny alkohol lub aceton	1. skrawki kriostatowe 2. wykonanie reakcji przed zatopieniem
Antygeny na powierzchni komórek	1. świeże 2. zimny alkohol lub aceton 3. formaldehyd	1. rozmazy 2. skrawki kriostatowe 3. wykonanie reakcji przed zatapianiem
Peptydy i aminy biogenne w komórkach dokrewnych lub nerkowych; enzymy i inne białka wewnątrzkomórkowe	1. formaldehyd, glutaraldehyd, Bouin, 2. p-benzochinon 3. akroleina	1. skrawki parafinowe 2. liofilizacja, utrwalenie w parach paraformaldehydu i zatopienie w próżni
Glikoproteidy	1. formalina 2. kwas nadjodowy-lizyna-paraformaldehyd (80)	1. skrawki parafinowe

wykonaniem reakcji. Trypsyna lub pronaza najprawdopodobniej rozluźniają strukturę białek w utrwalonej tkance i ułatwiają penetrację przeciwciał oraz udostępniają większą liczbę determinant antygenowych [28, 33, 39, 65]. Do tych samych celów stosować można także Triton X100 [70, 115]. Przygotowanie tkanki do celów mikroskopii elektronicznej omówione zostanie w podrozdziale 4.1. Ogólne wskazówki utrwalania i przygotowania tkanek podane zostały w tabeli 3.

### 3.2. PRZYGOTOWANIE PRZECIWCIAŁ [70, 125]

Jak podano w podrozdziale 1.2, przeciwciała powinny charakteryzować się wysoką specyficznością, powinowactwem, siłą wiązania i odpowiednim stężeniem w surowicy, co w efekcie umożliwia stosowanie wysokich rozcieńczeń. Najczęściej przeciwciała dają się latami przechowywać w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ , a często także w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ , najlepiej w dużym stężeniu z dodatkiem 0,1-1% albuminy i 0,01 do 0,1% azydku sodu lub 0,01% merthiolatu (azydek sodu w stężeniu powyżej 0,01% hamuje aktywność peroksydazy). Pierwsze przeciwciało należy stosować w odpowiednim rozcieńczeniu, co każdorazowo należy określić doświadczalnie. Zbyt niskie rozcieńczenia powodują duże niespecyficzne znakowanie tkanki, a zbyt wysokie dają słabe znakowanie w miejscu lokalizacji antygeny. Inkubację z pierwszym przeciwciałem prowadzić należy najlepiej przez noc (18-24 godz.) w temp.  $4^{\circ}\text{C}$  i potem przez 1 godz. w temp. pokojowej. Przedłużona inkubacja jest bardziej korzystna niż inkubacja krótka (do 1 godz.) ze względu na możliwość stosowania wyższych rozcieńczeń pierwszego przeciwciała, co daje lepszą specyficzność reakcji [94]. Surowice zawierające mieszaninę wielu przeciwciał mogą być oczyszczone metodą adsorpcji, np. na sefarozie opłaszczony czystym antygenem i następnym eluowaniem czystych przeciwciał w niskim lub wysokim pH. Przeciwciała monoklonalne oczyszczenia oczywiście nie wymagają, co jest ich olbrzymią zaletą.

### 3.3. ZWIĘKSZANIE SPECYFICZNOŚCI REAKCJI IMMUNOCYTOCHEMICZNYCH

Niespecyficzna reakcja immunocytochemiczna wypada pozytywnie w przypadku nieswoistego wiązania przeciwciał np. przez komplement lub siłami jonowymi [70, 125] albo wiązania znaczników w tych miejscach tkanki, gdzie nie ma wykrywanego antygeny. Możliwe jest także wykrywanie antygenów „pokrewnych” mających identyczne lub podobne determinanty antygenowe. Niespecyficznie pozytywna reakcja jest oczywiście uzależniona od stosowanych przeciwciał i od typu reakcji immunocytochemicznej. Stosunkowo najmniej problemów tego typu występuje przy stosowaniu czystych przeciwciał lub przeciwciał monoklonalnych. Najmniej nieswoistego znakowania obserwuje się w metodach

z kompleksem awidyna—biotynowana peroksydaza i znakowanych antygenów. Dużym problemem jest wiązanie nieswoiste lub adsorbowanie przeciwciał przez różne miejsca w tkance. Problem ten występuje z różnym nasileniem we wszystkich rodzajach metod. W celu blokowania tych miejsc należy przed inkubacją z pierwszym przeciwciałem wykonać krótką preinkubację przez 10-30 min. z normalną surowicą od zwierzęcia, od którego pochodzi drugie przeciwciało [125]. Potem, bez płukania, nakładamy pierwsze przeciwciało. Drugim sposobem jest intensywne płukanie skrawków w PBS (ewentualnie z dodatkiem albuminy lub Tritonu X100) między kolejnymi surowicami po pierwszym przeciwciele. Płukanie to usuwa z tkanki wiele nieswoiście związanych przeciwciał, które są wiązaniami o niskim powinowactwie. Niektórzy autorzy [83] zalecają adsorpcję stosowanych surowic z homogenatem lub proszkiem acetonowym wątroby. Problem nieswoistego wiązania przeciwciał jest mniejszy przy stosowaniu przeciwciał monoklonalnych, heteroklonalnych oczyszczonych lub przy stosowaniu surowic w wysokim rozcieńczeniu [125]. Drugim problemem jest usuwanie ewentualnego znakowania występującego w tkance przygotowanej do wykonania reakcji. Przykładem tego jest fluorescencja własna tkanek [110] lub aktywność enzymów stosowanych jako znacznik np. peroksydazy. Blokowanie endogennej peroksydazy przeprowadzamy na samym początku reakcji przez stosowanie 0,1-1%  $H_2O_2$  w metanolu lub w wodzie [56, 70, 125]. I wreszcie ostatni z większych problemów, to problem stosowania czystych kompleksów znacznika z przeciwciałem. Wiadomo bowiem, że np. wolne fluorochromy i enzymy mogą być nieswoiście związane przez tkankę i mogą dawać nieswoiście pozytywną reakcję [70, 125]. Sposoby otrzymywania czystych kompleksów znacznik—przeciwciało (lub innych) podane są w pracach cytowanych poprzednio przy omawianiu tworzenia tych kompleksów.

#### 3.4. TESTY NA SPECYFICZNOŚĆ REAKCJI IMMUNOCYTOCHEMICZNYCH

Petrusz [93] zaproponował następujące niezbędne wymagania konieczne do potwierdzenia wyników immunocytochemicznych: (1) dokładna standaryzacja wszystkich etapów stosowanej metody, (2) stosowanie wzrastających rozcieńczeń pierwszego przeciwciała, aż do rozcieńczeń nie dających pozytywnego odczynu lub zastąpienia pierwszego przeciwciała przez inne przeciwciała lub normalną surowicę od zwierzęcia tego samego gatunku, (3) stosowanie testu na specyficzność przeciwciał, (4) uzasadnienie lokalizacji immunocytochemicznej istotnymi informacjami z innych badań (biochemicznych, fizjologicznych itp.). Są to innymi słowy niezbędne warunki, których pozytywne wyniki przemawiają za specyficznością wykonanej reakcji immunocytochemicznej.

**3.4.1. Zastępowanie pierwszego przeciwciała przez normalną surowicę.** Ogólną kontrolą na specyficzność reakcji immunocytochemicznej jest zastąpienie pierwszego przeciwciała przez normalną surowicę od zwierzęcia tego samego gatunku, u którego otrzymano pierwsze przeciwciało w identycznym rozcieńczeniu. Negatywny wynik tej kontroli świadczy o tym, że pozytywny odczyn z surowicą zawierającą pierwsze przeciwciało jest wynikiem specyficznego wiązania tego przeciwciała. Nie wyklucza to jednak możliwości wykrywania innych antygenów o podobnej budowie. Ten problem występuje przy wykrywaniu wielu hormonów polipeptydowych posiadających identycznie zbudowane części swoich łańcuchów, np. gastryna, cholecystokinina, ceruleina lub przy wykrywaniu hormonów komórek korykotropowych. W tym celu wykonać należy testy adsorpcyjne z odpowiednimi antygenami.

**3.4.2. Testy adsorpcyjne [4, 95, 96, 111, 116, 125].** Testy te wykonujemy zawsze w przypadku zastosowania nowego przeciwciała, nowej tkanki lub też nowej metody. Mają one na celu potwierdzenie, że wykrywamy rzeczywiście tylko poszukiwany antygen. Ogólna zasada testów adsorpcji polega na preinkubacji pierwszego przeciwciała z antygenem i antygenami pokrewnymi i potem użyciem tak przygotowanego przeciwciała do reakcji immunocytochemicznej. Pozytywny wynik tego testu, czyli całkowite zablokowanie reakcji świadczy o tym, że antygen użyty do preinkubacji może być wykrywany przez testowane pierwsze przeciwciało. Należy jednak pamiętać, że w teście tym można otrzymać pozytywny wynik w barwieniu (wynik testu negatywny) zależny od wiązania kompleksu antygen—przeciwciało do receptorów tkankowych [125]. Klasycznym przykładem wymagającym szerokich testów adsorpcyjnych są przeciwciała przeciwko którejs z katecholamin [111] wymagające preinkubacji z wieloma substancjami pokrewnymi (inne katecholaminy, prekursorzy i metabolity, a także inne aminy biogenne). W przypadku wykrywania antygenów posiadających identyczne fragmenty (np. niektóre hormony) należy do testowania użyć nie całe antygeny, lecz jedynie fragmenty charakterystyczne dla poszczególnych antygenów. Do testu stosujemy pierwsze przeciwciało w rozcieńczeniu używanym w reakcji i małe ilości możliwie czystego, najlepiej syntetycznego antygeny i ewentualnych antygenów pokrewnych w różnych stężeniach zwykle do kilku nmoli/ml. Preinkubację prowadzimy po zmieszaniu antygeny z przeciwciałem (z dodatkiem 0,1% albuminy) przez 12-24 godz. w temp. 4°C. W celu eliminowania testowanego przeciwciała można także użyć antygeny zaadsorbowanego na sefarozie. Jedną z nowych technik na badanie specyficzności reakcji immunocytochemicznej jest metoda opracowana przez Schipperę i Tildersa [111]. Czysty antygen i odpowiednie

antygeny pokrewne rozpuszcza się w szeregu rozcieńczeń w żelatynie, utrwała i wykonuje reakcję immunocytochemiczną. Analiza otrzymanych wyników pozwala na dokładną ocenę specyficzności stosowanych przeciwciał.

#### 4. ZASTOSOWANIE METOD IMMUNOCYTOCHEMICZNYCH DO WYKRYWANIA ANTYGENÓW NA POZIOMIE ULTRASTRUKTURALNYM

Zasady metod immunocytochemicznych do celów mikroskopii elektronowej są podobne jak do mikroskopii świetlnej, ale decydujące znaczenie ma tutaj znacznik. Musi on albo zawierać dostatecznie dużą ilość pierwiastków o dużym ciężarze atomowym, albo też musi się nimi łatwo kontrastować. Do pierwszej grupy zaliczamy ferrytynę i złoto koloidalne, a do drugiej grupy peroksydazę. Produktem reakcji w wykrywaniu peroksydazy jest polimer DAB, który daje się łatwo osmować (patrz podrozdział 1.3).

##### 4.1. UTRWALANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU

Ogólne zasady utrwalania i przygotowania materiału są identyczne jak w przypadku mikroskopii świetlnej (patrz podrozdział 3.1), ale zagadnieniem szczególnej wagi jest zachowanie prawidłowej struktury komórek i tkanek. Dlatego też najczęściej zalecanym utrwalaczem jest glutaraldehyd lub jego mieszanina z formaldehydem. Po utrwaleniu materiał może być zatapiany w sposób rutynowy w wielu plastikach, np. metakrylany, Epon, Araldit. Do polimeryzacji obok wysokiej temperatury stosować można w razie potrzeby promieniowanie ultrafioletowe [125]. Ostatnio zastosowano zatapianie w niskiej temperaturze w Lowicryl K4M, co ma w niektórych przypadkach obok dobrego zachowania ultrastruktury zapobiegać stratom antygenowości wielu białek [15, 106]. Wiele danych wskazuje, że czterotlenek osmu wprawdzie osłabia silnie antygenowość wielu substancji, jednak może być on łatwo usunięty, co wiąże się z odzyskaniem antygenowości tych substancji. Osm może być usunięty ze skrawków tkanek zatapianych w plastiku przez utlenienie nadtlakiem wodoru, kwasem nadjodowym, a najlepiej metanadjodanem sodu [16], choć w niektórych przypadkach jest to zbyt kosztowne [3].

##### 4.2. TECHNIKI WYKONYWANIA REAKCJI

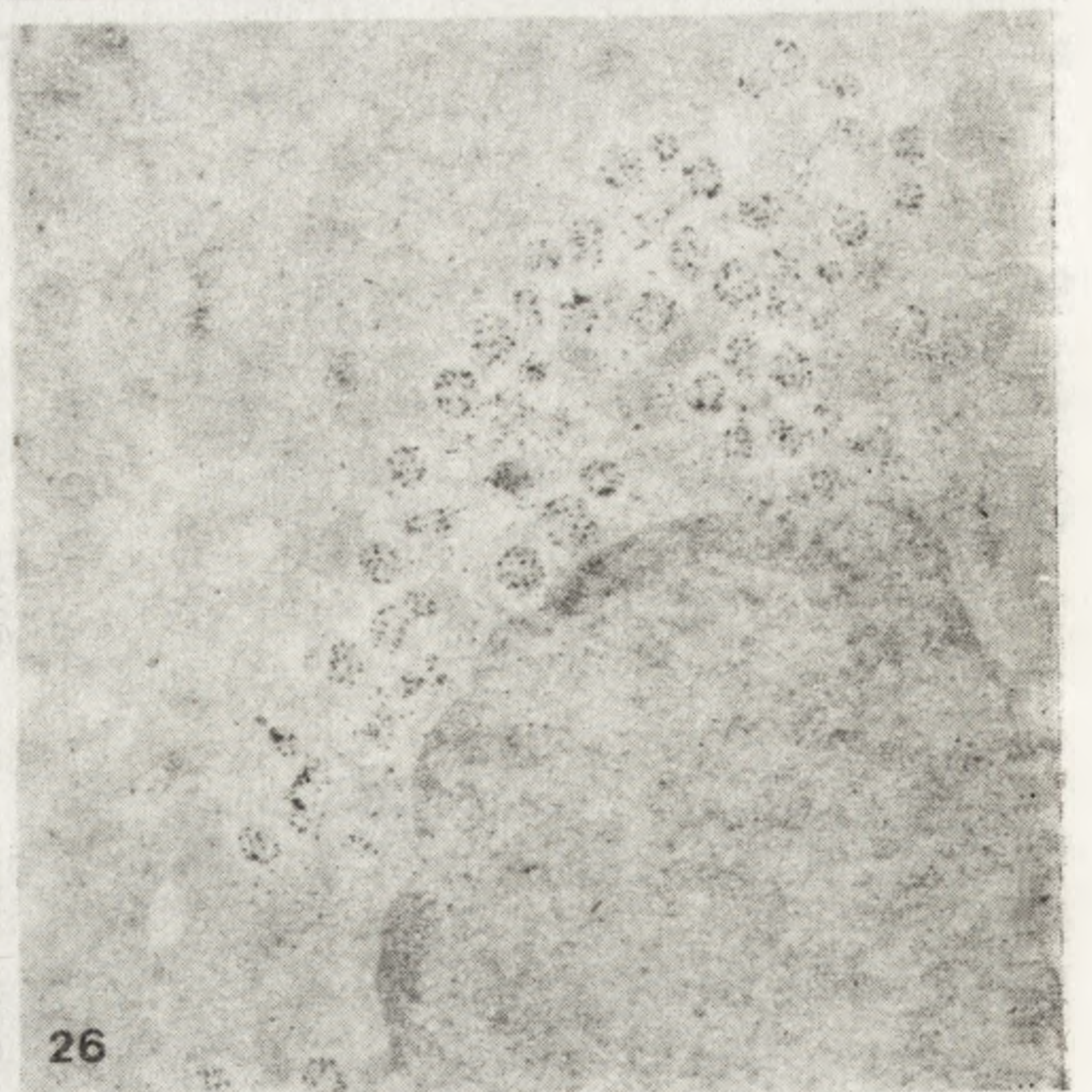
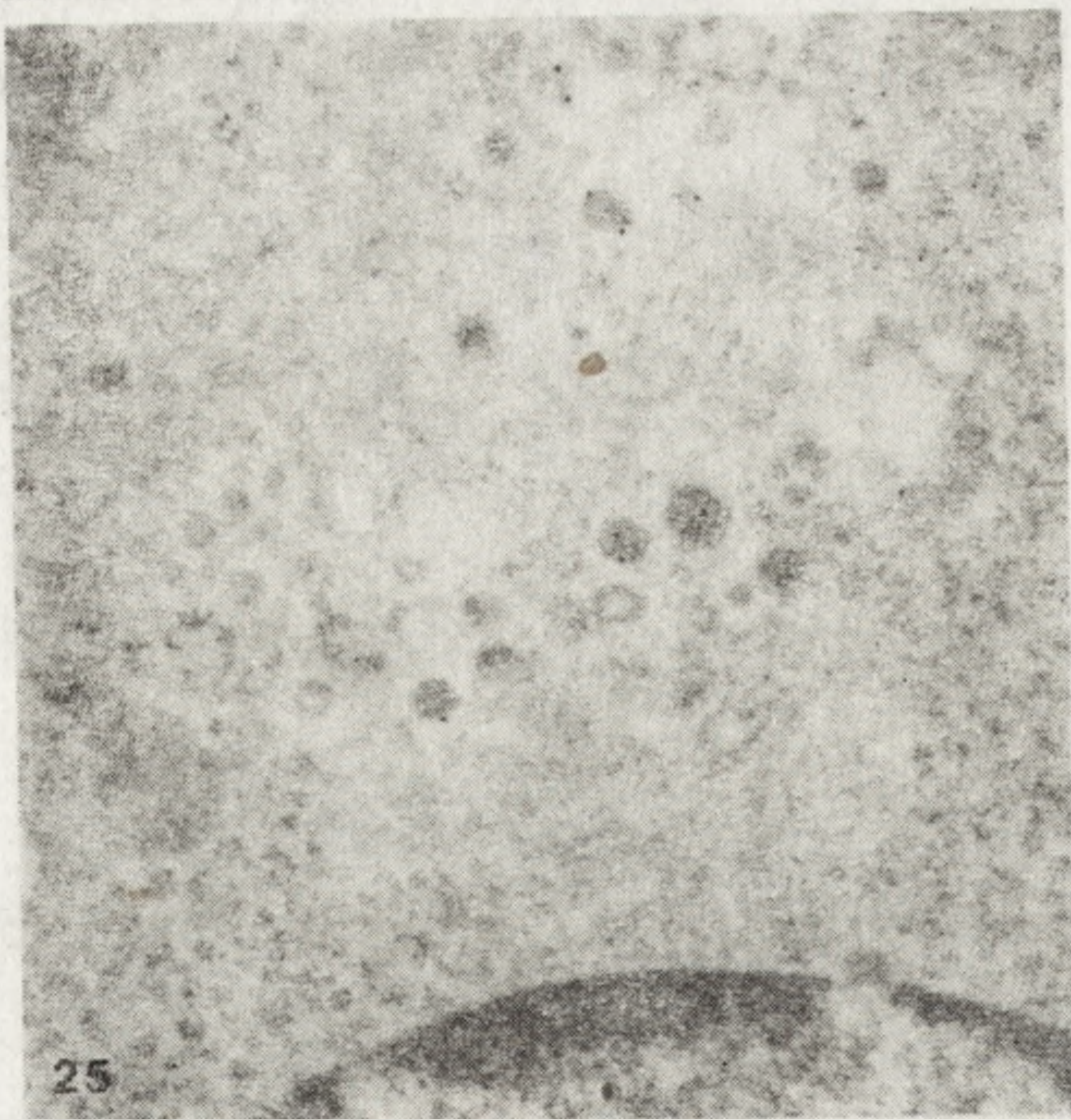
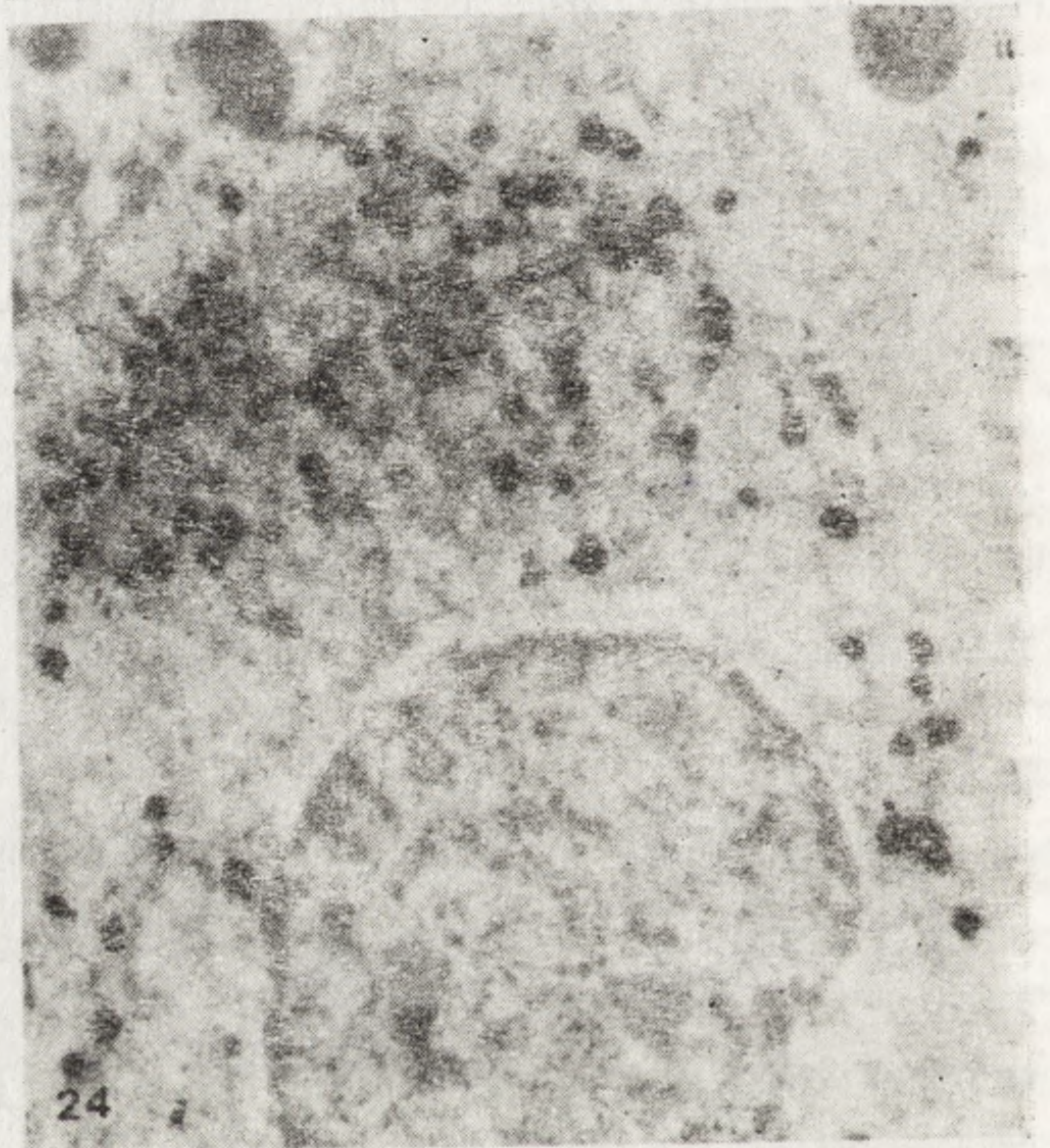
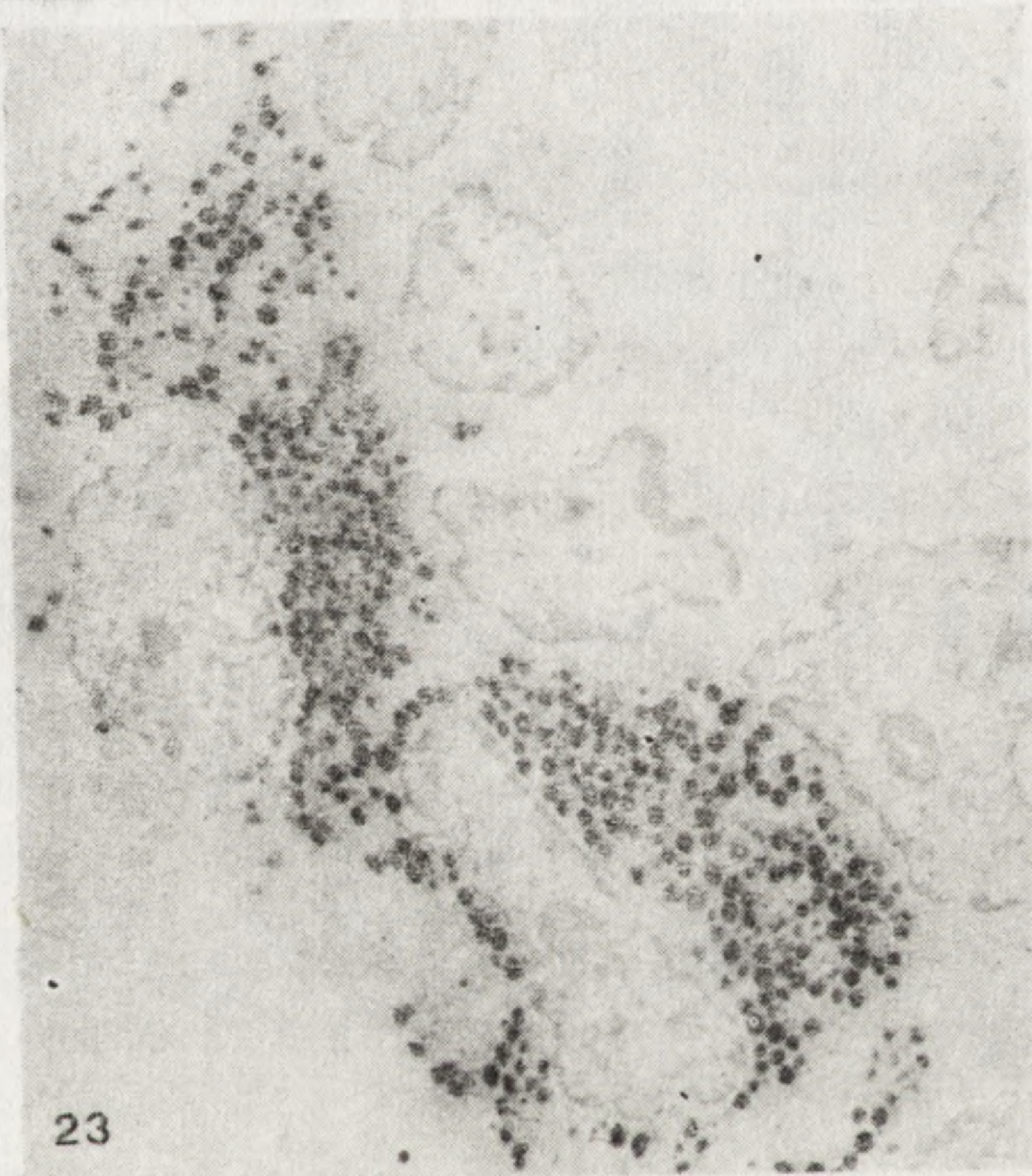
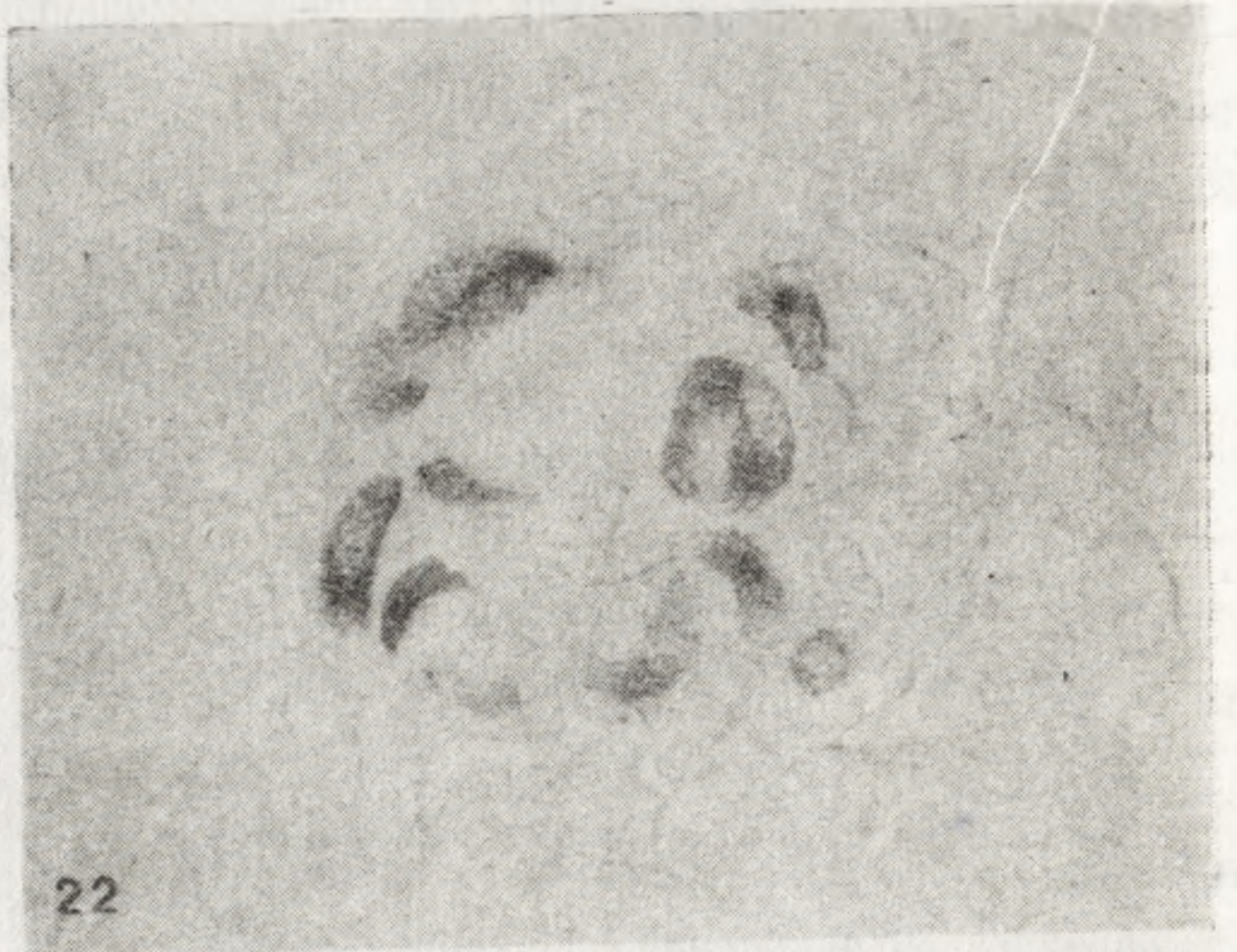
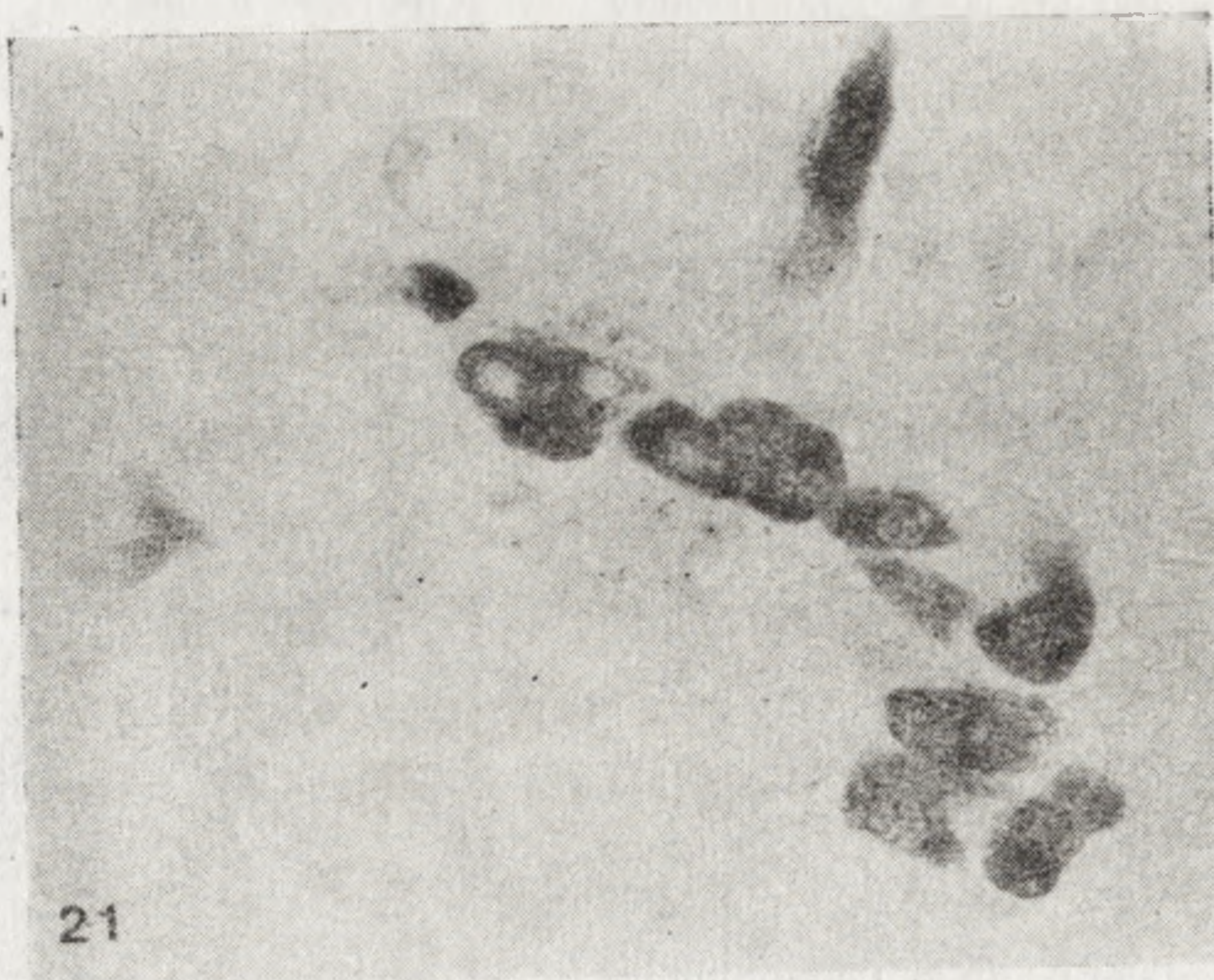
Do celów mikroskopii elektronowej stosuje się skrawki ultracienkie z tkanek zatapianych w plastiku, skrawki ultracienkie mrożone lub wykonywanie reakcji immunocytochemicznej przed zatopieniem materiału. Wykonanie reakcji przed zatopieniem materiału w plastikach ma szcze-



gólnie dużą wartość w przypadku wykrywania antygenów na powierzchni komórek lub bakterii [20]. Metoda ta może dać dobre wyniki przy wykrywaniu antygenów rozproszonych w cytoplazmie [97], ale nie gdy występują one w strukturach obłonionych, np. wewnątrz mitochondriów lub ziaren wydzielniczych [122]. W reakcji przed zatopieniem nie należy zapomnieć o trudnościach związanych z penetracją przeciwciał i znaczników i dlatego najlepiej stosować zawiesinę komórek np. z hodowli, leukocyty, czy komórki izolowane lub skrawki tkanek uzyskane na wibratomie. Technika wykonania reakcji polega na umieszczeniu zagęszczonych komórek w odpowiednich płynach zawierających przeciwciała lub znaczniki, a usuwania tych płynów dokonuje się przez dekantowanie supernatantu po wirowaniu. Po zakończonej reakcji komórki zatapiane są w plastikach w sposób typowy, krojone i ewentualnie kontrastowane. Szczegóły tej metody opisane są w wielu pracach (m. in. [32, 70, 122, 125]).

Skrawki ultracienkie mrożone wprowadzone zostały do immunocytochemii niedawno [10, 11, 44, 121]. Metoda ta daje nowe możliwości w immunocytochemii, ale wiąże się z dużymi trudnościami metodycznymi zarówno w otrzymaniu skrawków, jak i specyficznością reakcji immunocytochemicznej. Ogólna technika reakcji jest podobna do wykonywania reakcji na skrawkach ultracienkich plastikowych [121].

Najczęściej do mikroskopii elektronowej stosuje się skrawki ultracienkie z tkanek zatapianych w plastiku. Wykonanie reakcji jest podobne jak na skrawkach parafinowych. Ze względu na kontakt z metalami ciężkimi skrawki powinny być umieszczone na siatkach niklowych lub złotych. Inkubację prowadzi się najczęściej umieszczając siatki na powierzchni kropli. Po wykonaniu reakcji immunocytochemicznej skrawki mogą być normalnie kontrastowane. Grubość skrawków nie odgrywa roli dla intensywności znakowania, gdyż — jak to wykazali Bendayan i Zollinger [16] — reakcja między przeciwciałem i antygenem zachodzi jedynie na powierzchni skrawków. W technice tej istnieją pewne trudności polegające na słabszej czułości metod związane z ograniczoną penetracją przeciwciał, a przede wszystkim z licznie pojawiającymi się strąkami. W celu zwiększenia penetracji przeciwciał próbowano częściowo usuwać plastik za pomocą nasyconego roztworu NaOH w alkoholu, 10% nadtlenu wodoru lub metanolanu sodu [23, 79], jednak większość autorów wskazuje na bezcelowość tego postępowania [14, 16, 17, 104]. Powstające strąty są wynikiem nieswoistego wiązania przeciwciał i dużego zanieczyszczenia odczynników i surowic. Odpowiednie postępowanie prowadzi do całkowitego ich usunięcia. Wszystkie płyny do płukania, jak i surowice muszą zawierać dodatek albuminy (0,1-1%) i muszą być filtrowane przez ultrafiltry (0,22  $\mu\text{m}$  lub 0,45  $\mu\text{m}$ ). Płukania między ko-



lejnymi surowicami lub znacznikami powinny być bardzo dokładne i często powtarzane. Szczegóły przeprowadzania reakcji zależą od stosowanej metody i podane są w licznych pracach (m.in. [14, 29, 30, 68, 70, 104, 107, 116, 117, 122, 125, 127, 128]).

Z innych ciekawszych technik wymienić należy użycie reakcji immunocytochemicznych do mikroskopu skaningowego, szczególnie w celu lokalizacji antygenów na powierzchni komórek [42, 60, 61, 82, 113]. Istnieją też próby ilościowej oceny nasilenia reakcji immunocytochemicznej ze złotem koloidalnym polegające na liczeniu ziaren złota [14] lub analizie rentgenowskiej [119].

#### 4.3. WYBÓR METODY I ZNAKOWANIA

Najczęściej stosowanymi znacznikami w reakcjach immunocytochemicznych dla potrzeb mikroskopii elektronowej są złoto koloidalne, ferrytyna i peroksydaza. Zaletą peroksydazy jest możliwość zastosowania jej w bardzo czułych metodach PAP i ABC. Powstający w wyniku wykrywania peroksydazy wyosmowany polimer DAB daje w mikroskopie elektronowym stosunkowo duże, mało ostre, elektronowo gęste konglomeraty. Powoduje to, że otrzymujemy dobre znakowanie komórek, w których zlokalizowany jest antygen (ryc. 23 i 24). Jednak stosunkowo duży produkt reakcji i brak możliwości dodatkowego kontrastowania skrawków utrudniają subkomórkową lokalizację antygenów.

Ferrytyna, a szczególnie złoto koloidalne, dają w mikroskopie elektronowym stosunkowo drobne, ostre i bardzo silnie elektronowo gęste ziarna. Znakowanie to jest słabiej zauważalne na małych powiększeniach, co utrudnia ogólną ocenę znakowanych komórek. Jednakże znaczniki te umożliwiają bardzo dokładną lokalizację subkomórkową tym łatwiej, że w przypadkach tych stosować można dodatkowe kontrastowanie (octanem uranylu i cytrynianem ołowiu). Należy jednak pamiętać, że zarówno ferrytyna, jak i złoto koloidalne są używane w mniej czułych metodach niż PAP i ABC. Metoda proteina A—złoto koloidalne daje stosunkowo silne znakowanie (ryc. 26), ale trudno jest wyeliminować

---

Ryc. 21. Skrawek tarczycy szczura inkubowany z przeciwciałami przeciw kalcytoninie (1:150 000). Utrwalanie w płynie Bouina, metoda ABC, 500 ×

Ryc. 22. Skrawek trzustki królika inkubowany z przeciwciałami przeciw somatostatynie (1:1 000). Utrwalanie w płynie Bouina, metoda PAP, 500 ×

Ryc. 23-26. Skrawki ultracienkie tarczycy szczura utrwalonej w 2,5% glutaraldehydzie i zatopionej w Eponie. Inkubacje z przeciwciałami przeciw kalcytoninie w rozcieńczeniu 1:10 000, metoda PAP) (ryc. 23, 3750 ×), w rozcieńczeniu 1:100 000, metoda ABC (ryc. 24, 11 300 ×), w rozcieńczeniu 1:3 000, metoda znakowanego antygeny — kalcytonina zaadsorbowana na złotcie koloidalnym (ryc. 25, 20 000 ×), i w rozcieńczeniu 1:3 000, metoda proteina A—złoto koloidalne (ryc. 26, 11 800 ×)

słabe znakowanie nieswoiste [14, 70]. Z kolei w metodzie antygenu znakowanego złotem koloidalnym znakowanie jest słabsze [ryc. 25], ale o dużej specyficzności [70]. Ze względu na te duże różnice zależne od stosowanej metody i znacznika proponuje się, aby do immunocytochemicznej lokalizacji antygenów na poziomie ultrastrukturalnym stosować różne metody, a także różne techniki ich wykonywania [22].

## LITERATURA

- [1] ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D., *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publ. New York, London 1983.
- [2] AVRAMEAS S., TERNYNCK T., GUESDON J. L., Coupling enzymes to antibodies and antigens, *Scand. J. Immunol.*, 8: (Suppl. 7), 7-18, 1978.
- [3] BASKIN D. G., MAR H., GORRAY K. C., FUJIMOTO W. Y., Electron microscopic immunoperoxidase staining of insulin using 4-chloro-1-naphthol after osmium fixation, *J. Histochem. Cytochem.*, 30: 710-712, 1982.
- [4] BATTEN T. F. C., HOPKINS C. R., Use of protein A-coated colloidal gold particles for immunoelectron microscopic localization of ACTH on ultrathin sections, *Histochemistry*, 60: 317-320, 1979.
- [5] BAYER E. A., SKUTELSKY E., WILCHEK M., The avidin-biotin complex in affinity cytochemistry, *Methods in Enzymology*, 62: 308-315, 1979.
- [6] BAYER E. A., SKUTELSKY E., WYNNE D., WILCHEK M., Preparation of ferritin-avidin conjugates by reductive alkylation for use in electron microscopy cytochemistry, *J. Biochem. Cytochem.*, 24: 933, 939, 1976.
- [7] BAYER E. A., WILCHEK M., The avidin-biotin complex as a tool in molecular biology, *Trends Biochem. Sci.*, 3: 257-259, 1978.
- [8] BAYER E. A., WILCHEK M., SKUTELSKY E., Affinity cytochemistry: the localization of lectin and antibody receptors of erythrocytes via avidin-biotin complex, *FEBS Letters*, 68: 240-244, 1976.
- [9] BÄCHI T., DORVAL G., WIGZELL H., BINZ H., Staphylococcal protein A in immunoferritin techniques, *Scand. J. Immunol.*, 6: 241-246, 1977.
- [10] BEESLEY J. E., ADLAM C., The protein A-Gold technique: A comparison between the staining mechanisms on methacrylate and cryosections [w] *Electron Microscopy 1982*, vol. 3, Hamburg 1982, 265-266.
- [11] BEESLEY J. E., ORPIN A., ADLAM C., A comparison of immunoferritin, immunoenzyme and gold labelled protein A methods for the localization of capsular antigen on frozen thin sections of the bacterium *Pasteurella haemolytica*, *Histochem. J.*, 14: 803-810, 1982.
- [12] BENDAYEN M., Protein A-gold and enzyme-gold: two novel affinity techniques for the ultrastructural localization of macromolecules, [w] *Electron Microscopy 1982*, vol. 3, Hamburg 1982, 427-439.
- [13] BENDAYAN M., Enzyme-gold cytochemical technique: conditions for optimal labelling, [w] *Electron Microscopy 1982*, vol. 3, Hamburg 1982, 271-272.
- [14] BENDAYAN M., ROTH J., PERRELET A., ORCI L., Quantitative immunocytochemical localization of pancreatic secretory proteins in subcellular compartments of the rat acinar cell, *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 149-160, 1980.
- [15] BENDAYAN M., SHORE G. C., Immunocytochemical localization of mitochondrial proteins in the rat hepatocyte, *J. Histochem. Cytochem.*, 30: 139-147, 1982.

- [16] BENDAYAN M., ZOLLINGER M., Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissue applying the protein A—gold technique, *J. Histochem. Cytochem.*, **31**: 101-109, 1983.
- [17] BENDAYAN M., ZOLLINGER M., Protein A—gold immunocytochemical technique: ultrastructural localization of antigens on postosmicated tissue, [w] *Electron Microscopy 1982*, vol. 3, Hamburg 1982, 267-268.
- [18] BERGH O. J., SOLHEIM B. G., Detection of thrombocyte antibodies by  $^{125}\text{J}$  labeled protein A, *Tissue Antigens*, **12**: 189-194, 1978.
- [19] BOER G. J., Development of a specificity test for immunocytochemistry of neuropeptides using high-voltage electrofocusing in polyacrylamide micro-slab gels, *J. Endocrinol.*, **80**: 54P-55P, 1979.
- [20] BOOYSE F. M., STERNBERGER L. A., ZSCHOCKE D., RAFELSON M. E., Ultrastructural localization of contractile protein (Thrombosthenin) in human platelets using an unlabeled antibody-peroxidase staining technique, *J. Histochem. Cytochem.*, **19**: 540-550, 1971.
- [21] CAMMISULI S., WOFYSY L., Hapten-sandwich labelling. III. Bifunctional reagents for immunospecific labelling of cell surface antigens, *J. Immunol.*, **117**: 1695-1704, 1976.
- [22] CHILDS G. V., The use of multiple methods to validate immunocytochemical stains, *J. Histochem. Cytochem.*, **31**: 1A, 168-176, 1983.
- [23] CHILDS G. V., UNABIA G., Application of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method to the light microscopic localization of pituitary hormones, *J. Histochem. Cytochem.*, **30**: 713-716, 1982.
- [24] CHILDS G. V., UNABIA G., Application of a rapid avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) technique to the localization of pituitary hormones at the electron microscopic level, *J. Histochem. Cytochem.*, **30**: 1320-1324, 1982.
- [25] CLARK Ch. A., DOWNS E. C., PRIMUS F. J., An unlabelled antibody method using glucose oxidase-antiglucose oxidase complexes (GAG): a sensitive alternative to immunoperoxidase for the detection of tissue antigens, *J. Histochem. Cytochem.*, **30**: 27-33, 1982.
- [26] COONS A. H., CREECH H. J., JONES R. N., Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **47**: 200-202, 1941.
- [27] COSTELLO S. M., FELIX R. T., GIESE R. W., Enhancement of immune cellular agglutination by use of an avidin-biotin system, *Clin. Chem.*, **25**: 1572-1580, 1979.
- [28] CURRAN R. C., GREGORY J., The unmasking of antigens in paraffin sections of tissue by trypsin, *Experientia (Basel)*, **33**: 1400-1401, 1977.
- [29] De GRANDI P. B., KRAEHENBUHL J. P., CAMPICHE M. A., Ultrastructural localization of calcitonin in the parafollicular cells of pig thyroid gland with cytochrom-C-labelled antibody fragments, *J. Cell Biol.*, **50**: 446-456, 1971.
- [30] De MEY J., Colloidal Gold Probes, [w] *Immunocytochemistry*, red. J. M. Polak, S. V. Noorden, Wright PSG, London 1983, 82-112.
- [31] De MEY J., MOEREMANS M., De WAELE M., GEUENS G., De BRABANDER M., The IGS (Immuno-Gold Staining) method used with monoclonal antibodies, *Proceedings of Colloquium on the Proteides of the Biological Fluids*, red. M. Peeters, Pergamon Press, Oxford 1981, 943-947.
- [32] De MEY J., MOEREMANS M., GEUENS G., NUYDENS R., De BRABANDER M., High resolution light and electron microscopic localization of tu-

- bulin with the IGS (immuno-gold staining) method, *Cell Biol. Int. Rep.*, **5**: 889-899, 1981.
- [33] DENK H., RADASZKIEWICZ T., WEIRICH E., Pronase pretreatment of tissue sections enhances sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP technique), *J. Immunol. Meth.*, **15**: 163-167, 1977.
- [34] De WAELE M., De MEY J., MOEREMANS M., Van CAMP B., The immuno-gold staining method: an immunocytochemical procedure for leukocyte characterization by monoclonal antibodies, [w] *Leukemia Markers*, red. W. Knapp, Academic Press London 1981, 173-176.
- [35] DROESSLER K., *Immunologie*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1982.
- [36] DUBOIS-DALCQ M., McFARLAND H., McFARLIN D., Protein A—peroxidase: a valuable tool for the localization of antigens, *J. Histochem. Cytochem.*, **25**: 1201-1206, 1977.
- [37] FALINI B., De SOLAS I., HALVERSON C., PARKER J. W., TAYLOR C. R., Double labelled-antigen method for demonstration of intracellular antigens in paraffin-embedded tissues, *J. Histochem. Cytochem.*, **30**: 21-25, 1982.
- [38] FAULK W. P., TAYLOR G. M., An immunocolloid method for the electron microscope, *Immunochemistry*, **8**: 1081-1083, 1971.
- [39] FINLEY J. C. W., GROSSMAN G. H., DIMEO P., PETRUS P., Somatostatin-containing neurons in the rat brain. Widespread distribution revealed by immunocytochemistry after pretreatment with pronase, *Amer. J. Anat.*, **153**: 483-488, 1978.
- [40] FRENS G., Controlled nucleation for the regulation of particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature, Phys. Sci.*, **241**: 20-22, 1973.
- [41] GARAUD J. C., ELOY R., MOODY A. J., STOCK C., GRENIER J. F., Glucagon and glicentinimmunoreactive cells in the human digestive tract, *Cell Tissue Res.*, **213**: 121-136, 1980.
- [42] GEOGHEGAN W. D., ACKERMAN G. A., Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immuno-globulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutination and goat anti-human immuno-globulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application, *J. Histochem. Cytochem.*, **25**: 1187-1200, 1977.
- [43] GEOGHEGAN W. D., SCILLIAN J. J., ACKERMAN G. A., The detection of human B-lymphocytes by both light and electron microscopy utilizing colloidal gold-labelled anti-immuno-globulin, *Immunol. Commun.*, **7**: 1-12, 1978.
- [44] GEUZE H., SLOT J., Van der LEY P., SCHUFFER R., GRIFFITH J., Use of colloidal gold particles in double labelling immuno-electron microscopy of ultrathin frozen tissue sections, *J. Cell Biol.*, **89**: 653-665, 1981.
- [45] GOODMAN S. L., HODGES G. M., LIVINGSTON D. C., A review of the colloidal gold marker system, [w] *Scanning Electron Microscopy II*, red. O. Johari, AWF O'Hare, Illinois, SEM Inc., 1981, 133-145.
- [46] GOODMAN S. L., HODGES G. M., TREJDOSIEWICZ L., LIVINGSTON D. C., Colloidal gold markers and probes for routine application in microscopy, *J. Microsc.*, **123**: 201-213, 1981.
- [47] GRAHAM R. C., KARNOWSKY M. J., The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique, *J. Histochem. Cytochem.*, **14**: 291-302, 1966.

- [48] GRAHAM R. C., Jr., LUDHOLM U., KARNOVSKY M. J., Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole, *J. Histochem. Cytochem.*, **13**: 150-152, 1965.
- [49] GRUBE D., Immunoperoxidase methods: increased efficiency using fluorescence microscopy for 3,3-diaminobenzidine (DAB) stained semithin section, *Histochemistry*, **70**: 19-22, 1980.
- [50] GRUBE D., ALBERT H., Immunocytochemical investigations of the gastroenteropancreatic endocrine cells using semithin and thin serial sections, [w] *Cellular Basis of Chemical Messengers in the Digestive System*, red. M. I. Grossman, M. A. B. Brazier, J. Lechaga, UCLA Forum in Medical Sciences, vol. 23, Academic Press, New York 1981, 83-95.
- [51] GU J., De MEY J., MOEREMANS M., POLAK J., Sequential use of the PAP and immuno-gold staining methods for the light microscopical double staining of tissue antigens. Its applications to the study of regulatory peptides in the gut, *Regulat. Pept.*, **1**: 365-374, 1981.
- [52] GUESDON J. L., TERNYNCK T., AVRAMEAS S., The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques, *J. Histochem. Cytochem.*, **27**: 1131-1139, 1979.
- [53] HABEEB A. F. S. A., HIRAMOTO R., Reactions of proteins with glutaraldehyde, *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**: 16-26, 1968.
- [54] HANKER J. S., YATES P. E., METZ C. B., RUSTIONI A., A new specific sensitive and noncarcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase, *Histochem. J.*, **9**: 789-792, 1977.
- [55] HEITZMANN H., RICHARDS F. M., Use of the avidin-biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 3537-3541, 1974.
- [56] HEYDERMAN E., Immunoperoxidase techniques in histopathology: applications, methods and controls, *J. Clin. Pathol.*, **32**: 971-978, 1979.
- [57] HOPWOOD D., Fixatives and fixation: a review, *Histochem. J.*, **1**: 323-360, 1969.
- [58] HORISBERGER M., Evaluation of colloidal gold as a cytochemical marker for transmission and scanning electron microscopy, *Biol. Cellul.*, **36**: 253-258, 1979.
- [59] HORISBERGER M., Colloidal gold: a cytochemical marker for light and fluorescent microscopy and for transmission and scanning electron microscopy, [w] *Scanning Electron Microscopy II*, red. O. Johari, AMF O'Hare, Illinois, SEM Inc., 1981, 9-31.
- [60] HORISBERGER M., ROSSET J., BAUER H., Colloidal gold granules as markers for cell surface receptors in the scanning electron microscope, *Experientia*, **31**: 1147-1149, 1975.
- [61] HORISBERGER M., ROSSET J., Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, **25**: 295-305, 1977.
- [62] HORISBERGER M., VONLANTHEN M., Localization of mannan and chitin on thin sections of budding yeasts with gold markers, *Arch. Microbiol.*, **115**: 1-7, 1977.
- [63] HOU-YU A., EHRLICH P. H., VALIQUETTE G., ENGELHARDT D. L., SAWYER W. H., NILAVER G., ZIMMERMAN E. A., A monoclonal antibody to vasopressin: preparation, characterisation, and application in immunocytochemistry, *J. Histochem. Cytochem.*, **30**: 1249-1260, 1982.

- [64] HSU S., RAINE L., FANGER H., Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures, *J. Histochem. Cytochem.*, **29**: 577-580, 1981.
- [65] HUANG S. N., MINASSIAN H., MORE J. D., Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion, *Lab. Invest.*, **35**: 383-390, 1976.
- [66] JASANI B., WYNFORD D., WILLIAMS E. D., Use of monoclonal antibodies for immunolocalization of tissue antigens, *J. Clin. Pathol.*, **34**: 1000-1002, 1981.
- [67] KING J. C., LECHAN R. M., KUGEL G., ANTHONY E. L. P., Acrolein: a fixative for immunocytochemical localization of peptides in the central nervous system, *J. Histochem. Cytochem.*, **31**: 62-68, 1983.
- [68] KRISCH B., Immunocytochemistry of neuroendocrine system, *Progress Histochem. Cytochem.*, vol. 12,2, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1980.
- [69] KLARESKOG L., FORSUM U., WIGREN A., WIGZELL H., Spatial relationships between HLA-DR expressing cells and T-lymphocytes of different subsets in the rheumatoid sinovail tissue, *Scand. J. Immunol.*, **15**: 501-507, 1982.
- [70] LARSSON L. I., Peptide immunocytochemistry, *Progr. Histochem. Cytochem.*, **13**, 4 Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1981.
- [71] LARSSON L. I., Simultaneous ultrastructural demonstration of multiple peptides in endocrine cells by a novel immunocytochemical method, *Nature*, **282**: 743-746, 1979.
- [72] LARSSON L. I., SCHWARTZ T. W., Radioimmunocytochemistry — a novel immunocytochemical principle, *J. Histochem. Cytochem.*, **25**: 1140-1146, 1977.
- [73] LEWIS R. E., JOHNSON W. W., CRUSE J. M., Pitfalls and caveats in the methodology for immunoperoxidase staining in surgical pathologic diagnosis, *Surv. Synth. Path. Res.*, **1**: 134-152, 1983.
- [74] LIU F. T., LEONARD N. J., Avidin-biotin interaction, synthesis, oxidation, and spectroscopic properties of linked models, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**: 996-1005, 1979.
- [75] MASON D. Y., ABDULAZIZ Z., Double Immunoenzymatic labelling, [w] Immunocytochemistry, red. J. M. Polak, S. Van Noorden, Wright PSG, London 1983, 113-128.
- [76] MASON D. Y., CORDELL J. L., ABDULAZIZ Z., NAIEM M., BORDENAVE G., Preparation of peroxidase : antiperoxidase (PAP) complexes for immunohistological labeling of monoclonal antibodies, *J. Histochem. Cytochem.*, **30**: 1114-1122, 1982.
- [77] MASON T. E., PHIFER R. F., SPICER S. S., SWALLOW R. A., DRESKIN R. B., An immunoglobulin-enzym bridge method for localizing tissue antigens, *J. Histochem. Cytochem.*, **17**: 563-569, 1969.
- [78] MASON D. Y., SAMMONS R. E., Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents, *J. Clin. Pathol.*, **31**: 454-462, 1978.
- [79] MAYOR H. D., HAMPTON J. C., ROSARIO B., A simple method for re-



- moving the resin from epoxy-embedded tissue, *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, **9**: 901-910, 1961.
- [80] McLEAN I., NAKANE P. K., Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixative for immunoelectron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, **22**: 1077-1083, 1974.
- [81] MEIER K. E., RUCHO E., An avidin-biotinyl-propranolol complex for beta-adrenergic receptor characterization, *J. Supramol. Struct.*, **9**: 243-252, 1978.
- [82] MOLDAY R., MOHER P., A review of cell surface markers and labelling techniques for scanning electron microscopy, *Histochem. J.*, **12**: 273-315, 1980.
- [83] NAIRN R. C., *Fluorescent Protein Tracing*, 4th. Churchill Livingstone, New York 1976.
- [84] NAKANE P. K., Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labelled antibody method: a study in pituitary glands of the rat, *J. Histochem. Cytochem.*, **16**: 557-560, 1968.
- [85] NAKANE P. K., KAWAOI A., Peroxidase labelled antibody. A new method of conjugation, *J. Histochem. Cytochem.*, **16**: 557-561, 1974.
- [86] NAKANE P. K., PIERCE G. B. Jr., Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigen, *J. Histochem. Cytochem.*, **14**: 929-933, 1966.
- [87] NOTANI G. W., PARSONS J. A., ERLANDSEN S. L., Versatility of *Staphylococcus aureus* protein A in immunocytochemistry, *J. Histochem. Cytochem.*, **27**: 1438-1444, 1979.
- [88] ORDRONNEAU P., PETRUSZ P., Immunocytochemical demonstration of anterior pituitary hormones in the pars tuberalis of long-term hypophysectomised rats, *Am. J. Ant.*, **18**: 141-158, 1980.
- [89] OHKAWA K., SUZUKI Y., SHINDO T., HIKIMA K., KANAI M., NAKAZORA M., A new cytochemical substrate for peroxidase activity, *Electron Microscopy 1982*, vol. 3, Hamburg 1982, 259-260.
- [90] PAIEMENT J. M., KOPRIWA B. M., Use of two different methods for the electron microscope radioautographic detection of labeled antibodies bound to thin sections, *J. Histochem. Cytochem.*, **26**: 765-771, 1978.
- [91] PAIEMENT J., LEBLOND C. P., Localization of thyroglobulin antigenicity in rat thyroid sections using antibodies labeled with peroxidase or <sup>125</sup>I-radioiodine, *J. Cell Bioll.*, **74**: 992-1015, 1977.
- [92] PEARSE A. G. E., *Histochemistry, Theoretical and Applied*, vol. 1, Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York 1980.
- [93] PETRUSZ P., Essential requirements for the validity of immunocytochemical staining procedures, *J. Histochem. Cytochem.*, **31**: 1A 177-179, 1983.
- [94] PETRUSZ P., DIMEO P., ORDRONNEAU P., WEAVER C., KEEFER D. A., Improved immunoglobulin enzyme bridge method for light microscopic demonstration of hormone-containing cells of rat adenohypophysis, *Histochemie*, **46**: 9-26, 1975.
- [95] PETRUSZ P., ORDRONNEAU P., FINLEY C. W., Criteria of reliability for light microscopic immunocytochemical staining. *Histochem. J.*, **12**: 333-352, 1980.
- [96] PETRUSZ P., SAR M., ORDRONNEAU P., DIMEO P., Specificity in immunocytochemical staining. *J. Histochem. Cytochem.*, **24**: 1110-1120, 1976.
- [97] PICKEL V. M., JOH T. J., REIS D. J., Ultrastructural localization of thyro-

- sine hydroxylase in noradrenergic neurons of brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 659-663, 1975.
- [98] PROBERT L., De MEY J., POLAK J., Distinct subpopulations of enteric p-type neurons containing substance P and vasoactive intestinal polypeptide, *Nature*, **294**: 470-471, 1981.
- [99] RAPPAY Gy., KARTESZI M., MAKARA G. B., ACTH radiomunocytochemistry (RICH) on rat anterior pituitary cells, *Histochemistry*, **59**: 207-213, 1979.
- [100] RIGGS J. L., SEIWALD R. J., BURCKHALTER J. H., DOWNS C. M., METCALF T. G., Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum, *Am. J. Pathol.*, **34**: 1081-1097, 1958.
- [101] ROMANO E. L., ROMANO M., *Staphylococcus* protein A bound to colloidal gold: a useful reagent to label antigen-antibody sites in electron microscopy, *Immunochemistry*, **14**: 711-715, 1977.
- [102] ROMANO E. L., STOLINSKI C., HUGHES-JONES N. C., An antiglobulin reagent labelled with colloidal gold for use in electron microscopy, *Immunochemistry*, **11**: 521-522, 1974.
- [103] ROTH J., Applications of immunocolloids in light microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, **30**: 691-696, 1982.
- [104] ROTH J., The preparation of protein A—golds complexes with 3 nm and 15 nm gold particles and their use in labelling multiple antigens on ultra-thin sections, *Histochem. J.*, **14**: 791-801, 1982.
- [105] ROTH J., New Approaches for in situ localization of antigens and glycoconjugates on thin sections: the protein A — gold (PAG) technique and the lectin-colloidal gold marker system, [w] *Electron Microscopy 1982*, vol. 3, Hamburg 1982, 245-252.
- [106] ROTH J., BENDAYAN M., CARLEMALM E., VILLIGER W., GARAVITO M., The enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded tissue, *J. Histochem. Cytochem.*, **29**: 663-671, 1981.
- [107] ROTH J., BENDAYAN M., ORCI L., Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A—gold complex, *J. Histochem. Cytochem.*, **26**: 1074-1081, 1978.
- [108] ROTH J., BENDAYAN M., ORCI L., FITC-protein A-gold complex for light and electron microscopic immunocytochemistry, *J. Histochem. Cytochem.*, **28**: 55-57, 1980.
- [109] ROTH J., BINDER M., Colloidal gold, ferritin and peroxidase as markers for electron microscopic double labeling lectin techniques, *J. Histochem. Cytochem.*, **26**: 163-169, 1978.
- [110] ROUSLAHTI E., Antigen-antibody interaction, antibody affinity and dissociation of immune complexes, *Scand. J. Immunol.*, **20**: Suppl. 3, 3-7, 1975.
- [111] SCHIPPER J., TILDERS J. H., A new technique for studying specificity of immunocytochemical procedures: specificity of serotonin immunostaining, *J. Histochem. Cytochem.*, **31**: 12-18, 1983.
- [112] SCHRELL U., SOFRONIEW M. V., Use of serial 1-2  $\mu$ m paraffin sections in neuropeptide immunocytochemistry for sequential analysis of different substances contained within the same neurons, *J. Histochem. Cytochem.*, **30**: 512-516, 1982.

- [113] SIEBER-BLUM M., SIEBER F., YAMADA K., Cellular fibronectin promotes adrenergic differentiation of quail neural crest cells in vitro, *Exp. Cell Res.*, **193**: 285-195, 1981.
- [114] SINGER S. J., Preparation of an electron-dense antibody conjugate, *Nature*, **183**: 1523-1524, 1959.
- [115] SOFRONIEW M. V., SCHRELL U., Long-term storage and regular use of diluted antisera in glass staining jars for increased sensitivity, reproducibility and convenience of single- and two-color light microscopic immunocytochemistry, *J. Histochem. Cytochem.*, **30**: 504-511, 1982.
- [116] STERNBERGER L., *Immunocytochemistry*, 2nd ed., John Wiley, New York, 1979.
- [117] STERNBERGER L. A., HARDY P. H., CUCULIS J. J. Jr., MEYER H. G., The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry, *J. Histochem. Cytochem.*, **18**: 315-333, 1970.
- [118] STERNBERGER L. A., CUCULIS J. J., Method for enzymatic intensification of the immunocytochemical reaction without use of labeled antibodies, *J. Histochem. Cytochem.*, **17**: 190-199, 1969.
- [119] STOLS A. L. H., Van de VORSTENBOSCH R. A., STADHOUDERS A. M., Quantitation with X-ray microanalysis of colloidal gold particles used as markers in immuno electron microscopy, [w] *Electron Microscopy 1982*, vol. 3, Hamburg 1982, 409-410.
- [120] SUROLIA, PAIN D., KHAN M. I., Protein A: nature's universal antibody, *Trends Biochem. Sci.*, **7**: 74-76, 1982.
- [121] TOKUYASU K. T., Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections, *Histochem. J.*, **12**: 381-403, 1980.
- [122] TOUGARD C., PICART R., TIXIER-VIDAL A., Electron-microscopic cytochemical studies on the secretory process in rat prolactin cells in primary culture, *Am. J. Anat.*, **158**: 471-490, 1980.
- [123] TRAMU G., PILLEZ A., LEONARDELLI J., An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry, *J. Histochem. Cytochem.*, **26**: 322-324, 1978.
- [124] VACCA L. L., ROSARIO S. L., ZIMMERMAN E. A., TOMASHEFSKY P., NG P. Y., HSU K. C., Application of immunoperoxidase techniques to localize horseradish peroxidase tracer in the central nervous system, *J. Histochem. Cytochem.*, **23**: 208-215, 1975.
- [125] Van NOORDEN S., POLAK J. M., *Immunocytochemistry today*, [w] *Immunocytochemistry*, red. J. M. Polak, S. Van Noorden, Wright PSG, London 1983, 11-42.
- [126] WALLACE E. F., WOFSY L., Hapten-sandwich labelling. IV. Improved procedures and non-cross-reacting hapten reagents for double-labeling cell surface antigens, *J. Immunol. Methods*, **25**: 283-289, 1979.
- [127] ZABEL M., Ultrastructural immunocytochemical localization of calcitonin in the C cells of the rat thyroid, *Histochemistry*, **75**: 419-424, 1982.
- [128] ZABEL M., Ultrastructural localization of calcitonin in control and stimulated thyroid C cells of the rat using protein A—gold immunocytochemical technique, *Histochemistry*, **77**: 269-273, 1983.

- [129] ZABEL M., Ultrastructural localization of calcitonin, somatostatin and serotonin in parafollicular cells of rat thyroid, *Histochem. J.*, 1984 (w druku).
- [130] ŻEROMSKI J., Podstawy immunofluorescencji, [w] *Topochemiczne Metody Badań Komórek i Tkanek*, PWN, Warszawa 1982, 135-177.

*Nadesłano: 30 marca 1984.*

*Przyjęto: 25 kwietnia 1984.*

*Adres autora: ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań.*

## MECHANIZMY REGULUJĄCE AKTYWNOŚĆ NEURONÓW HIPOKAMPA

### MECHANISMS REGULATING THE ACTIVITY OF HIPPOCAMPAL NEURONS

Grzegorz HESS

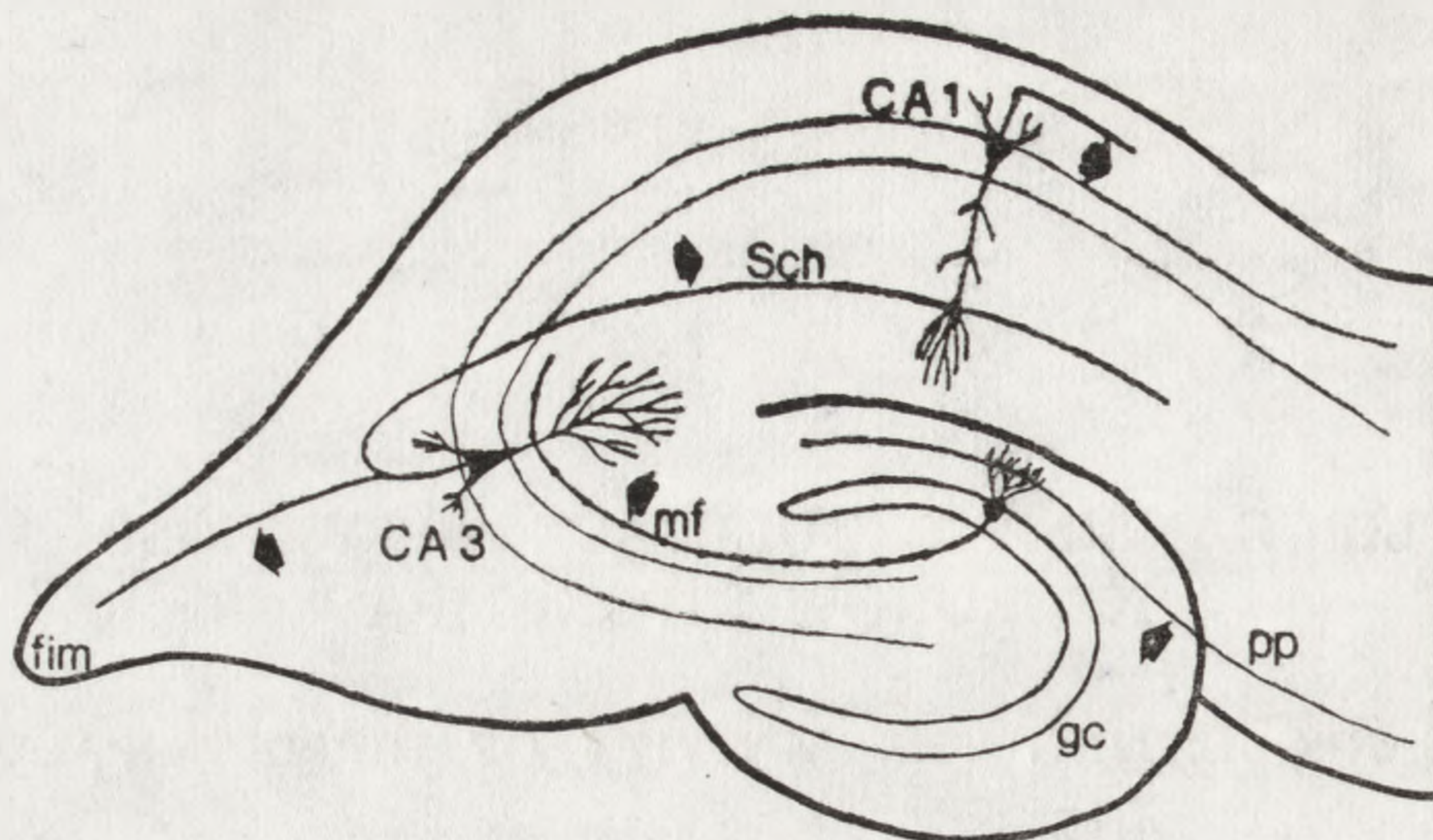
Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

*Streszczenie.* Komórki nerwowe hipokampa, jednej z najszerzej zbadanych części kory mózgowej ssaków, podlegają działaniu złożonych mechanizmów, wpływających na ich aktywność. Na transmisję potencjałów czynnościowych w obrębie hipokampa silny wpływ modulujący wywierają neuroprzekaźniki aminowe: acetylocholina i noradrenalina. Na poziomie synapsy, przy intensywnej stymulacji, dochodzi do długotrwałego wzmocnienia (torowania) w przekazywaniu impulsu.

*Summary.* Nervous cells of the hippocampus, one of the most extensively explored parts of the brain cortex of mammals, are influenced by complex mechanisms regulating their activity. Amine neurotransmitters: acetylcholine and noradrenaline exert strong modulatory influence on the transmission of the action potential inside the hippocampus. During repetitive stimulation, the long-term potentiation (enhancement) of the transmission takes place at the level of the synapse.

Hipokamp jest wyraźnie wyodrębnioną, wydłużoną, obustronnie symetryczną strukturą, ogólnym kształtem przypominającą literę C, zwinętą wokół rogu dolnego komory bocznej mózgu. Stanowi część kory mózgowej o stosunkowo prostej budowie histologicznej. Uważa się, że poznanie mechanizmów działania hipokampa może rzucić światło na zasady działania całej kory mózgowej.

Pomimo że w skład tzw. formacji hipokampalnej wchodzi kilka pól kory mózgowej, ze względów anatomicznych i strukturalnych najwięcej uwagi poświęcono dwóm z nich: rogowi Ammona i zakrętowi zębatemu. Główny trójsynaptyczny wewnętrzny obwód neuronalny przebiega w hipokampie w płaszczyźnie prostopadłej do jego długiej osi, dlatego też mówi się o „lamellarnej” budowie tej struktury [1]. Cecha ta została



Ryc. 1. Przekrój poprzeczny hipokampa szczura. gc — komórki granularne zakrętu zębatego, CA1, CA3 — komórki piramidowe pola CA1 i CA3, pp — aksony neuronów kory śródwęchowej, mf — aksony komórek granularnych, Sch — kolaterale aksonów komórek piramidowych pola CA3, fim — strzępek hipokampa. Strzałki wskazują kierunek przewodzenia impulsów nerwowych. Według [7], zmodyfikowane

wykorzystana do opracowania techniki skrawków hipokampa inkubowanych *in vitro*. W skrawkach tych, o grubości 400-500  $\mu\text{m}$ , ulegają zachowaniu połączenia synaptyczne, a zarazem morfologia i metabolizm pozostają nie zmienione [42]. Szereg aksonów biegnie jednakże w innych kierunkach i istnieje również dywergencja w przebiegu niektórych szlaków [4]. Poprzeczny przekrój hipokampa przedstawia ryc. 1.

Komórki piramidowe rogu Ammona i komórki granularne zakrętu zębatego stanowią 96-98% wszystkich neuronów hipokampa [11]. Wykazano, że neuroprzekaźnikiem (mediatorem) pośredniczącym pomiędzy tymi neuronami jest glutaminian lub asparaginian [41]. Pozostałą część komórek nerwowych hipokampa stanowią interneurony (neurony pośredniczące), głównie o charakterze hamującym, wydzielające na swoich zakończeniach kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) [41].

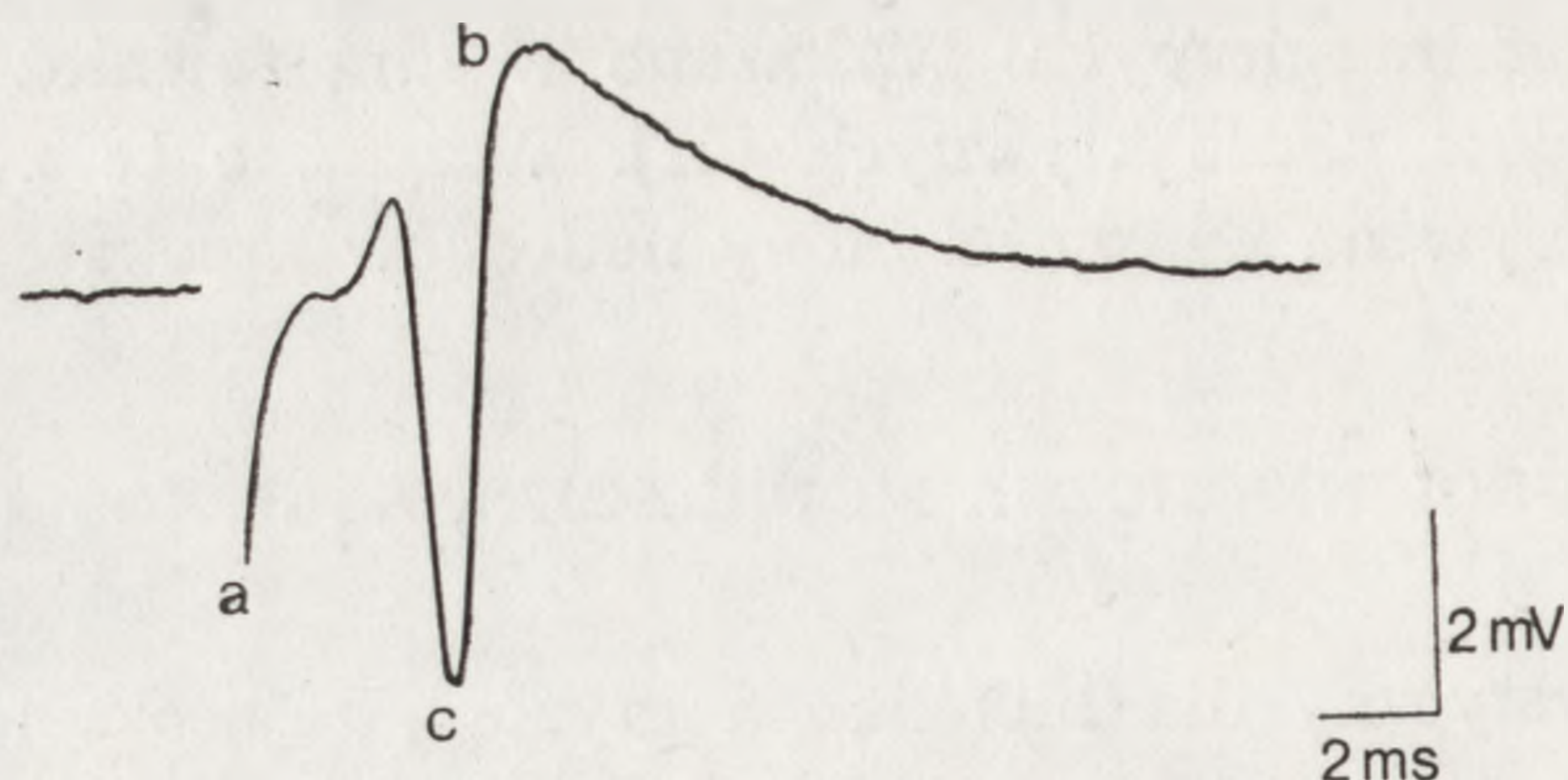
Pomimo dużej ilości prac, wykonanych na hipokampie, szczególnie u gryzoni, nie jest dotychczas wyjaśniona rola i miejsce hipokampa w ogólnej działalności mózgu. Istnieje szereg teorii, dotyczących roli tej struktury (krótki przegląd [21]). Większość badaczy jednakże wskazuje na kluczową rolę w procesach uczenia się i zapamiętywania nowej informacji. Nie oznacza to jednak, że magazynowanie informacji musi zachodzić w hipokampie. Posiada on bardzo bogatą sieć połączeń aferentnych i eferentnych z wieloma korowymi i podkorowymi obszarami mózgu. W obrębie hipokampa znajduje się szereg zakończeń włókien cholinergicznym, noradrenergicznym, dopaminergicznym, serotonergicznym-

nych oraz histaminergicznych. Wykazano w nim również obecność rozmaitych peptydów neuroaktywnych [41]. Wszystkie te związki wywierają istotny wpływ na własności błony neuronów hipokampa.

#### CHOLINERGICZNA MODULACJA AKTYWNOŚCI

Charakterystyczny dla hipokampa gryzoni, zająkowształtnych i kota jest rytm aktywności elektroencefalograficznej, tzw. rytm theta. Rytm ten, w przybliżeniu sinusoidalny, mieszczący się w zakresie częstotliwości 3-12 Hz, może być rejestrowany w określonych stanach behawioralnych u ssaków nie należących do naczelnych [44]. Istnieją obserwacje wskazujące, że pojawianie się rytmu theta jest związane z procesami uczenia się i zapamiętywania. Wykazano, że stymulacja struktur mózgu, biorących udział w synchronizacji rytmicznej aktywności hipokampa, ułatwia zapamiętywanie. Jest to związane ze specyficzną aktywacją szlaku przegrodowo-hipokampalnego w czasie uczenia się i krótko potem [16]. Lezje w okolicy jądra przyśrodkowego przegrody, eliminujące całkowicie rytm theta, powodują poważne zaburzenia pamięci dotyczącej konfiguracji otoczenia [46]. Przypuszcza się [12], że „rozzrusznikowe” neurony przyśrodkowego jądra przegrody rytmicznie pobudzają komórki piramidowe hipokampa i powstałe w ten sposób synchroniczne pobudzeniowe potencjały postsynaptyczne są źródłem pozakomórkowo rejestrowanych fal theta. Nowsze badania sugerują rolę komórek granularnych i interneuronów w generacji rytmu theta. Istnieje także pogląd, że zasadniczą rolę grają tu szlaki hamującego sprzężenia zwrotnego lub bezpośrednio pobudzanie interneuronów hamujących przez „rozzrusznikowe” aksony z przegrody [12].

Faza rytmu theta wywiera wpływ na częstotliwość spontanicznych wyładowań pojedynczych neuronów hipokampa [6, 25], a także na amplitudę potencjałów polowych (ang. field potentials), wywołanych stymulacją elektryczną [38]. Przykład przebiegu potencjału polowego przedstawia ryc. 2. Zależność amplitudy zbiorczego potencjału czynnościowego (ang. population spike) od fazy rytmu theta oznacza, że impuls docierający we właściwym momencie podlega „uprzywilejowanej” transmisji poprzez trójsynaptyczny obwód hipokampa. Rytm theta mógłby więc grać istotną rolę w ustalaniu odstępów czasowych pomiędzy kolejnymi impulsami, a tym samym w selekcji informacji [38]. Stwierdzono, że stymulacja elektryczna jądra przyśrodkowego przegrody, nie wywołująca odpowiedzi w obrębie zakrętu zębatego, powoduje wzrost amplitudy zbiorczego potencjału czynnościowego wywołanego stymulacją odpowiedniego szlaku aferentnego, gdy oba bodźce następują w krótkim



Ryc. 2. Potencjał polowy (ang. field potential) rejestrowany zewnątrzkomórkowo w warstwie komórek piramidowych pola CA1 w odpowiedzi na stymulację szlaku aferentnego. *a* — artefakt stymulacji, *b* (fala dodatnia) — złożony postsynaptyczny potencjał pobudzeniowy (ang. population EPSP), *c* (szybka fala ujemna) — złożony potencjał czynnościowy (ang. population spike), reprezentujący synchroniczne potencjały czynnościowe wielu pobudzonych komórek piramidowych. Podobne potencjały polowe można rejestrować w warstwie komórek piramidowych pola CA3 i komórek granularnych zakrętu zębatego

odstępem czasowym [20]. Wykazano również modulujący wpływ stymulacji jądra przysrodkowego przegrody na amplitudę wywołanego w krótkim odstępie czasowym potencjału polowego rejestrowanego w polu CA1 hipokampa. Analogicznie jak w przypadku zakrętu zębatego, modulacji ulegała amplituda zbiorczego potencjału czynnościowego, lecz nie zbiorczego EPSP (population EPSP) [26]. Sugeruje się, że pojedynczy bodziec stymulujący jądro przegrody powoduje zmiany pobudliwości komórek piramidalnych, analogiczne do 1 cyklu rytmu theta. W odróżnieniu od komórek granularnych, w przypadku komórek piramidalnych pola CA1 wykazano, że modulacja zachodzi za pośrednictwem aksonów cholinergicznym [28, 37]. Należy dodać, że wykryto także drugi szlak „rozzrusznikowy” rytmu theta, nie mający charakteru cholinergicznego [43].

W obrębie pola CA1 hipokampa acetylocholina (ACh) działa w dwójaki sposób. Po pierwsze, zmniejszeniu ulega wydajność hamowania synaptycznego komórek piramidowych [5, 27]. Sugeruje się, że ACh powoduje zmniejszenie ilości GABA, uwalnianego z interneuronów hamujących, a więc jest to presynaptyczne działanie odhamowujące. Drugi sposób działania ACh to efekt postsynaptyczny [36]. Badania farmakologiczne wykazały, że główną rolę w postsynaptycznym oddziaływaniu ACh na komórki piramidowe odgrywają receptory muskarynowe. Jednakże istnieje możliwość uczestniczenia w tym procesie receptorów nikotynowych lub receptorów o własnościach mieszanych [36].

Wewnątrzkomórkowe badania neuronów piramidowych pola CA1 wykazały istnienie zjawiska powolnego pobudzenia (ang. slow excitation) jako odpowiedzi na jontoforetyczne podanie ACh, oddziałującej za po-



średnictwem receptorów muskarynowych [4]. Stwierdzono, że aktywacja cholinergiczných włókien aferentnych z jądra przyśrodkowego przegrody powoduje nasilenie tendencji komórek piramidowych do odpowiadania na stymulację serią potencjałów czynnościowych, bez istotnej zmiany potencjału spoczynkowego [23]. Efekt działania ACh polega na blokowaniu tzw. prądu M (M od muskaryna), czyli specyficznej klasy błonowych kanałów potasowych, odpowiedzialnych za przewodnictwo M. Przewodnictwo M, pierwotnie odkryte w neuronach zwojów współczulnych żaby i szczura istnieje także w błonach komórek piramidowych pola CA1 hipokampa [9]. W stanie spoczynku neuronu jedynie niewielka liczba kanałów tych jest otwarta. W wyniku depolaryzacji komórki i powstania potencjału czynnościowego kanały odpowiedzialne za przewodnictwo M otwierają się ze stałą czasową ok. 150 msek, stosunkowo dużą w porównaniu do kanałów odpowiedzialnych za powstanie i rozprzestrzenianie się potencjału czynnościowego (rzędu 1 msek). Kanały błonowe, przez które zachodzi przewodnictwo M, otwierają się znacznie wolniej. W wyniku ich otwarcia wzrasta prąd wypływający poprzez błonę neuronu na zewnątrz, co powoduje zbliżenie potencjału wnętrza neuronu do wartości spoczynkowej. Równocześnie wzrasta przewodnictwo przez błonę, co jest przyczyną podniesienia progu pobudliwości komórki [33]. Komórka odpowiada niewielką liczbą (1-3) potencjałów czynnościowych, jedynie bezpośrednio po zaistnieniu depolaryzacji. Istnienie przewodnictwa M pozwala więc neuronowi na przerwanie serii potencjałów czynnościowych, pomimo trwania depolaryzacji. ACh za pośrednictwem receptorów muskarynowych blokuje przewodnictwo M. W ten sposób adaptacyjny wpływ tego przewodnictwa przestaje oddziaływać na błonę neuronu, która zachowuje się pasywnie w odpowiedzi na depolaryzację. W wyniku tego seria potencjałów czynnościowych trwa tak długo, jak długo utrzymuje się depolaryzacja. W rezultacie odpowiedź na pobudzenie komórki za pośrednictwem konwencjonalnego neuroprzekaźnika pobudzającego (glutaminianu) jest znacznie silniejsza [33].

Omówione zjawisko jest przykładem na to, że neuroprzekaźniki mogą oddziaływać nie tylko na kanały błonowe reagujące na bodziec chemiczny (efekt „klasyczny”), lecz również na kanały błonowe, których stan jest określony przez różnicę potencjałów na obu stronach błony neuronu. Wydaje się, że efekt ten zachodzi przy udziale „drugiego pośrednika”, substancji aktywowanej poprzez interakcję przekaźnika z receptorem, powodującej zmiany własności komórki postsynaptycznej [3]. Jednakże molekularny mechanizm blokady prądu M jest jak dotąd nieznaną. Wykluczono rolę cyklicznego GMP w tym procesie [33]. Istnieją sugestie, że także inne przewodnictwa (klasy kanałów błonowych) mogą być modulowane przez ACh, lecz główny efekt działania ACh na komórkę piramidową to blokada przewodnictwa M [9].

## NORADRENERGICZNA MODULACJA AKTYWNOŚCI

Wykazano istnienie zależności transmisji impulsów nerwowych w obrębie hipokampa od stanu behawioralnego zwierzęcia doświadczalnego [47]. Ilość komórek granularnych zakrętu zębatego, mierzona amplitudą zbiorczego potencjału czynnościowego, odpowiadających na stymulację elektryczną była niewielka w czasie gdy zwierzę w stanie wzbudzenia nie poruszało się. Odpowiedź ta była jednakże znacznie silniejsza podczas snu, zarówno wolnofalowego, jak i paradoksalnego (REM). W przeciwieństwie do tego, odpowiedź rejestrowana w polu CA1 była znacznie silniejsza podczas snu REM i wzbudzenia niż w czasie snu wolnofalowego. Zmiany te interpretuje się jako wyraz dostosowania funkcjonowania hipokampa do określonego stanu behawioralnego zwierzęcia. Dalsze badania [40] wskazały na rolę neuronów serotonergicznym w behawioralnej modulacji wywołanego potencjału polowego. Oprócz systemu serotonergicznego, także system noradrenergiczny [14] wywiera istotny wpływ na transmisję. Aktywacja noradrenergicznych neuronów w jądrze miejsca sinawego (locus coeruleus) w czasie stanu wzbudzenia powoduje utrudnienie transmisji impulsu poprzez zakręt zębaty.

Na mechanizm oddziaływania noradrenaliny na neurony hipokampa rzuciły światło doświadczenia z zastosowaniem techniki skrawków [19, 31, 32]. Wykazano, że egzogennie podana noradrenalina (NA) wchodzi w interakcję z receptorami alfa i beta adrenergicznymi. Efektem podania NA jest zmiana amplitudy zbiorczego potencjału czynnościowego, rejestrowanego w polu CA1, przy czym aktywacja receptorów alfa obniża pobudliwość komórek piramidowych, zaś aktywacja receptorów beta tę pobudliwość zwiększa. Sugeruje się, że uwalnianie endogennej NA za pośrednictwem receptorów beta powoduje wzrost pobudliwości komórek piramidowych.

Wykryto istnienie specyficznego przewodnictwa przez błonę komórki piramidowej pola CA1, na które oddziałuje noradrenalina [22, 33]. Jest to aktywowane jonami  $Ca^{++}$  przewodnictwo potasowe [10]. W nieobecności NA przewodnictwo to służy jako hamulec, przerywający serię potencjałów czynnościowych podobnie jak przewodnictwo M. NA ułatwia pobudzenie komórki piramidowej poprzez blokowanie kanałów błonowych, odpowiedzialnych za aktywowane jonami  $Ca^{++}$  przewodnictwo potasowe. Efekt ten, podobnie jak blokowanie przez ACh przewodnictwa M, jest przykładem zjawiska powolnego pobudzenia. Jednakże blokowane w tym przypadku kanały błonowe to niewrażliwe na różnicę potencjałów kanały potasowe (prąd M przepływa za pośrednictwem klasy kanałów potasowych, których stan zależy od stopnia polaryzacji błony). Istnieją pewne dane, dotyczące molekularnego przebiegu tego procesu

[9]. Przyjmuje się, że obecność NA powoduje, za pośrednictwem receptorów beta, zmniejszenie ilości dostępnych wewnątrz neuronu jonów  $Ca^{++}$ . Wydaje się prawdopodobne, iż powoduje to nasilenie syntezy cyklicznego AMP i zmiany w poziomie ufosforylowania białek błonowych, co w efekcie prowadzi do zablokowania aktywowanych jonami  $Ca^{++}$  kanałów potasowych. Interpretację tę potwierdza możliwość imitowania działania NA czynnikami zwiększającymi ilość wewnątrzkomórkowego cAMP.

Jednakże obecnie trudno jest powiązać efekty obserwowane na poziomie funkcjonującego mózgu ze zjawiskami modulacji noradrenergicznej zachodzącymi na błonie pojedynczego neuronu.

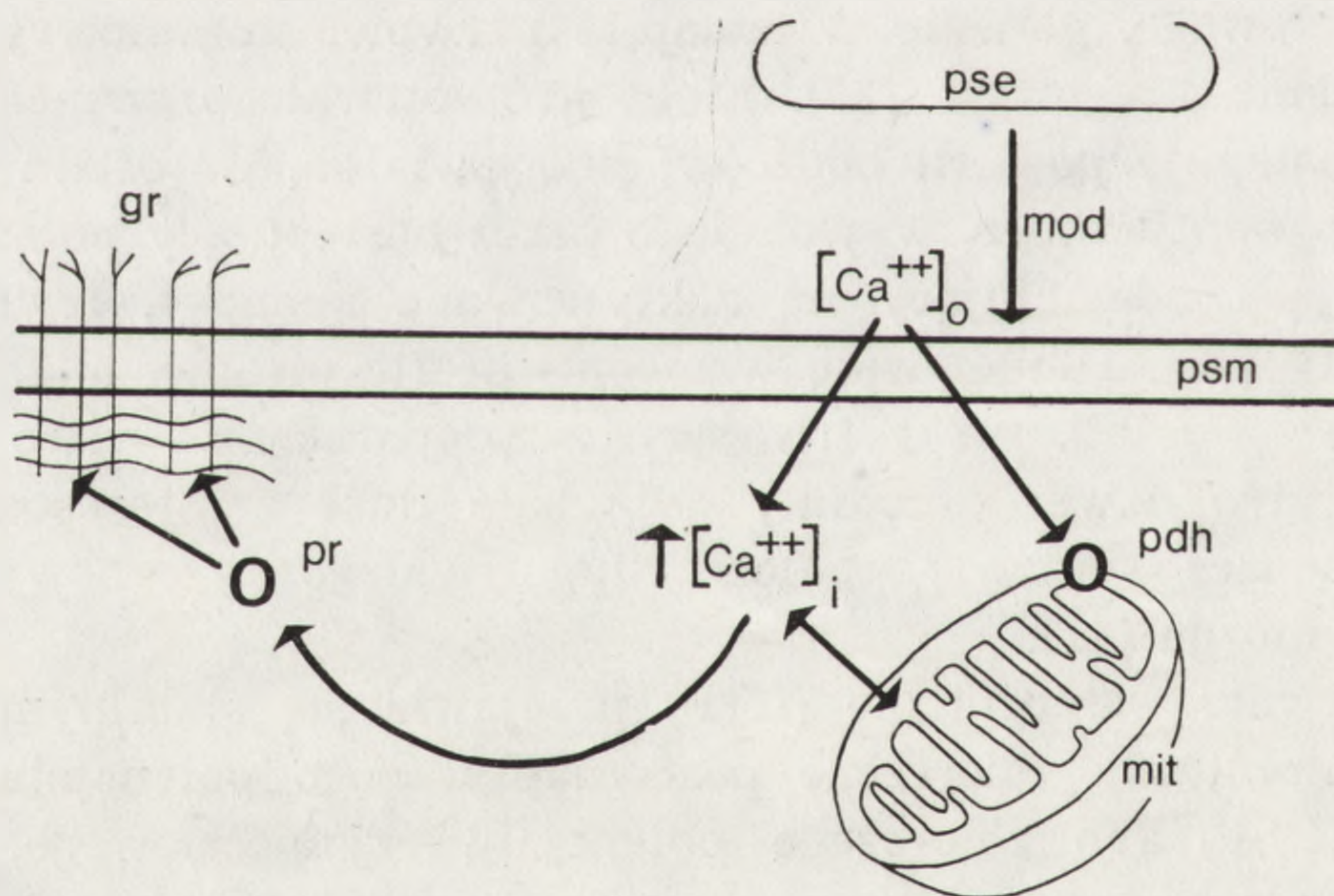
#### MODULACJA TRANSMISJI SYNAPTYCZNEJ

Odpowiedź neuronów hipokampa na stymulację elektryczną wskazuje na istnienie kilku mechanizmów plastyczności [41], określanej również jako zjawisko wzmocnienia postaktywacyjnego. Ogólnie efekty te dzieli się na wzmocnienie krótko- i długotrwałe, w zależności od czasu, w jakim następuje ich zanik. Zjawiska krótkotrwałego wzmocnienia postaktywacyjnego są obserwowane na różnych poziomach obwodowego układu nerwowego, głównie w synapsie nerwowo-mięśniowej, jak również w rdzeniu kręgowym [34]. Efekt krótkotrwałego wzmocnienia odpowiedzi następuje po serii bodźców; przejawia się wzrostem amplitudy potencjału synaptycznego, wywołanego przez następujący pojedynczy bodziec testujący oddziałujący na zaktywowane synapsy, trwającym do ok. 1 minuty [41]. Długotrwałe wzmocnienie (torowanie, ang. long-term potentiation — LTP), efekt trwający w preparacie *in vitro* kilka godzin, a *in vivo* nawet tygodnie, wzbudziło duże zainteresowanie jako zjawisko mogące stanowić podłoże długotrwałego przechowywania informacji w mózgu [41].

Długotrwałe wzmocnienie (LTP) przejawia się stabilnym, trwałym wzrostem amplitudy zbiorczego postsynaptycznego potencjału pobudzeniowego (EPSP) lub zbiorczego potencjału czynnościowego, przy niezmienionej sile bodźca, po uprzednim zastosowaniu serii bodźców o dużej częstotliwości. Zachodzenie LTP stwierdzono we wszystkich składowych wewnętrznych hipokampalnego obwodu trójsynaptycznego. Wykazano również możliwość wywołania LTP w innych szlakach układu limbicznego [35].

Amplituda zbiorczego EPSP po wywołaniu LTP wzrasta średnio o 50% w stosunku do wartości kontrolnej, a wzrost amplitudy zbiorczego potencjału czynnościowego wynosi średnio 250% [41].

Istnieje kilka teorii dotyczących mechanizmu zjawiska. Przyjmuje się, że LTP zachodzi na poziomie synaps, jakkolwiek szeroko dyskutowany jest problem pre- lub postsynaptycznej jego lokalizacji [7, 13]. Bezsprzecznie stwierdzono wzrost ilości neuroprzekaźnika (glutaminianu), uwalnianego do szczeliny synaptycznej z zakończeń presynaptycznych w wyniku pobudzenia, po wywołaniu LTP [41, 18]. Wykazano również powstawanie znacznych zmian morfologicznych w zaktywowanym regionie. Stwierdzono powstawanie zmian, polegających na wzroście rozmiarów kolców dendrytycznych (elementy postsynaptyczne) [41], jak również na zwiększeniu ilości dużych synaps posiadających duże zagęszczenia postsynaptyczne. W sąsiedztwie strefy zaktywowanej zaobserwowano zwiększenie ilości małych synaps, będących prawdopodobnie w stanie „wzrostu” [15]. Istnieją obserwacje wskazujące, że do wywołania LTP musi zostać pobudzonych wiele włókien, prowadzących do danej okolicy hipokampa, co oznacza konieczność „koaktywacji” neuronów przez więcej niż jedno włókno aferentne [29, 30]. Sugeruje się również uczestnictwo tzw. obwodów lokalnych, układów sprzężeń zwrotnych, działających za pośrednictwem interneuronów hamujących lub pobudzających [11, 39, 41]. Zaproponowano biochemiczny model LTP [41] (ryc. 3).



Ryc. 3. Hipotetyczny mechanizm powstawania LTP. Powtarzalna stymulacja powoduje uwalnianie neuroprzekaźnika (mod) z zakończeń presynaptycznych (pse) i zwiększenie wnikania jonów wapnia do wnętrza dendrytu przez błonę postsynaptyczną (psm). Powoduje to fosforylację dehydrogenazy pirogronianowej (pdh), enzymu mitochondrialnego (mit), co prowadzi pośrednio do wzrostu stężenia wapnia w dendrycie, a w rezultacie do aktywacji proteiny aktywowanej jonami  $\text{Ca}^{++}$  (pr), trawiącej białka strukturalne błony postsynaptycznej. Efektem jest wyeksponowanie dodatkowych receptorów neuroprzekaźnika (gr). Według [41], zmodyfikowane

Autorzy sugerują, że w wyniku powtarzalnej stymulacji, znaczna ilość jonów wapnia ze szczeliny synaptycznej wnika do wnętrza elementów postsynaptycznych. Zwiększone wewnątrz dendrytyczne stężenie jonów  $\text{Ca}^{++}$  wywołuje w efekcie fosforylację dehydrogenazy pirogronianowej, jednego z enzymów oddechowych, które poprzez generację potencjału błonowego regulują transport  $\text{Ca}^{++}$  przez błonę mitochondrium. W wyniku tego następuje przejściowe zwiększenie stężenia  $\text{Ca}^{++}$  wewnątrz dendrytu. Wywołuje to z kolei aktywację dotąd nieaktywnego enzymu proteolitycznego, związanego z wewnętrzną powierzchnią błony komórki nerwowej. Zaktywowana proteinaza trawi związane z błoną neurofilamenty i inne białka strukturalne, co powoduje lokalne zmiany w budowie błony, a w efekcie wyeksponowanie dotychczas ukrytych receptorów glutaminianu na powierzchni błony postsynaptycznej.

Jakkolwiek niektóre elementy tej teorii mają charakter spekulatywny, to jednak fakty zwiększania się ilości receptorów glutaminianu, a zwłaszcza krytyczna rola jonów wapnia w wywołaniu LTP są bezsporne. Wykazano, że samo zwiększenie ilości zewnątrzkomórkowego wapnia wystarcza do wywołania LTP [17]. Stwierdzono ponadto zdolność neuroprzekaźników aminowych: serotoniny (5-HT) i NA do modulacji wielkości LTP [8]. Długotrwałe wzmocnienie transmisji w hipokampie jest więc zjawiskiem bardzo złożonym. Przypuszcza się nawet, że LTP posiada dwie komponenty. Osobne mechanizmy leżałyby u podstaw długotrwałego wzmocnienia mierzonego wzrostem amplitudy zbiorczego potencjału czynnościowego — odzwierciedlenia pobudliwości neuronów, inne zaś u podstaw długotrwałego wzmocnienia mierzonego amplitudą zbiorczego postsynaptycznego potencjału pobudzeniowego — odzwierciedlenia prądów synaptycznych [7, 8].

#### UWAGI KOŃCOWE

Opisane przykłady wskazują jak skomplikowane są zjawiska regulacyjne, zachodzące w hipokampie na poziomie komórkowym; wspomniano tylko niektóre, najszerszej opisane w literaturze. Pomimo intensywnie prowadzonych badań daleko jeszcze do pełnego zrozumienia własności błony pojedynczego piramidowego neuronu hipokampa, jak również innych komórek nerwowych tej struktury. Bez znajomości zasad funkcjonowania neuronów i ich wzajemnych interakcji niemożliwe jest wyjaśnienie podstaw działania hipokampa jako całości. Co więcej, odkrywane są wciąż nowe sposoby modulacji aktywności hipokampa. Przykładem może być wykrycie rytmu dobowego pobudliwości komórek granularnych zakrętu zębatego u szczura [45, 2], a także rytmu dobowego LTP [24].

## LITERATURA

- [1] ANDERSEN P., BLISS T. V. P., SKREDE K. K., Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways, *Exp. Brain Res.*, **13**: 222-238, 1971.
- [2] BARNES C. A., McNAUGHTON B. L., GODDARD G. V., DOUGLAS R. H., ADAMEC R., Circadian rhythm of synaptic excitability in rat and monkey central nervous system, *Science*, **197**: 91-92, 1977.
- [3] BENARDO L. S., PRINCE D. A., Cholinergic excitation of mammalian hippocampal pyramidal cells, *Brain Res.*, **249**: 315-331, 1982.
- [4] BENARDO L. S., PRINCE D. A., Ionic mechanisms of cholinergic excitation in mammalian hippocampal pyramidal cells, *Brain Res.* **249**: 333-344, 1982.
- [5] BEN-ARI Y., KRNJEVIC K., REINHARDT W., ROPERT N., Intercellular observations on the disinhibitory action of acetylcholine in the hippocampus, *Neuroscience*, **6**: 2475-2484, 1981.
- [6] BLAND B. H., SETO M. G., ROWNTREE C. I., The relation of multiple theta cell discharge rates to slow wave theta frequency, *Physiol. Behav.*, **31**: 111-117, 1983.
- [7] BLISS T. V. P., DOLPHIN A. C., What is the mechanism of long-term potentiation in the hippocampus? *Trends Neurosci.*, **5**: 289-290, 1982.
- [8] BLISS T. V. P., GODDARD G. V., RIIIVES M., Reduction of long-term potentiation in the dentate gyrus following selective depletion of monoamines, *J. Physiol.*, **334**: 475-491, 1983.
- [9] BROWN D. A., Slow cholinergic excitation — a mechanism for increasing neuronal excitability, *Trends Neurosci.*, **6**: 302-307, 1983.
- [10] BROWN D. A., GRIFFITH W. H., Calcium-activated outward current in voltage-clamped hippocampal neurons of the guinea-pig, *J. Physiol.*, **337**: 287-301, 1983.
- [11] BUZSAKI G., EIDELBERG E., Direct afferent excitation and long-term potentiation of hippocampal interneurons, *J. Neurophysiol.*, **48**: 597-607, 1982.
- [12] BUZSAKI G., EIDELBERG E., Phase relations of hippocampal projection cells and interneurons to theta activity in the anesthetized rat, *Brain Res.*, **266**: 334-339, 1983.
- [13] CHIRWA S. S., GOH J. W., MARETIC H., SASTRY B. R., Evidence for a presynaptic role in LTP in the rat hippocampus, *J. Physiol.*, **339**: 41P, 1983.
- [14] DAHL D., BAILEY W. H., WINSON J., Effect of norepinephrine depletion of hippocampus on neuronal transmission from perforant pathway through dentate gyrus, *J. Neurophysiol.*, **49**: 123-133, 1983.
- [15] DESMOND N. L., LEVY W. B., Synaptic correlates of associative potentiation/depression: an ultrastructural study in the hippocampus, *Brain Res.*, **265**: 21-30, 1983.
- [16] DESTRADE C., Two types of diencephalically driven RSA (theta) as a means of studying memory formation in mice, *Brain Res.*, **234**: 486-493, 1982.
- [17] DOLPHIN A. C., The adenosine agonist 2-chloroadenosine inhibits the induction of LTP of the perforant path, *Neurosci. Lett.*, **39**: 83-89, 1983.
- [18] DOLPHIN A. C., ERRINGTON M. L., BLISS T. V. P., Long-term potentiation of the perforant path in vivo is associated with increased glutamate release, *Nature*, **297**: 496-498, 1982.
- [19] DUNWIDDIE T., MUELLER A., BASILE A., The use of brain slices in central nervous system pharmacology, *Fed. Proc.*, **42**: 2891-2898, 1983.

- [20] FANTIE B. D., GODDARD G. V., Septal modulation of the population spike in the fascia dentata produced by perforant path stimulation in the rat, *Brain Res.*, **252**: 227-237, 1982.
- [21] GRAY J. A., *Precis of the neurophysiology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*, *Behav. Brain Sciences*, **5**: 469-534, 1982.
- [22] HAAS H. L., KONNERTH A., Histamine and noradrenaline decrease calcium-activated potassium conductance in hippocampal pyramidal cells, *Nature*, **302**: 432-434, 1983.
- [23] HALLIWELL J. V., ADAMS P. R., Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons, *Brain Res.*, **250**: 71-92, 1982.
- [24] HARRIS K. M., TEYLER T. J., Age differences in a circadian influence on hippocampal LTP, *Brain Res.*, **261**: 69-73, 1983.
- [25] HOLSHEIMER J., STOK C. J., LOPES DA SILVA F. H., Theta rhythm related hippocampal cell discharges in the urethane anaesthetized rat: evidence for a predominant entorhinal input. *Electroenceph. Cli. Neurophysiol.*, **55**: 464-467, 1983.
- [26] JEANTET Y., JAFFARD R., Influence of the medial septal nucleus on the excitability of the commissural path — CA 1 pyramidal cell synapse in the hippocampus of freely moving mice, *Neuroscience*, **8**: 291-297, 1983.
- [27] KRNJEVIĆ K., REIFFENSTEIN R. J., ROPERT N., Disinhibitory action of acetylcholine in the rat's hippocampus: extracellular observations, *Neuroscience*, **6**: 2465-2474, 1981.
- [28] KRNJEVIĆ K., ROPERT N., Electrophysiological and pharmacological characteristics of facilitation of hippocampal population spikes by stimulation of the medial septum, *Neuroscience*, **7**: 2165-2183, 1982.
- [29] LEE K. S., Cooperativity among afferents for the induction of long-term potentiation in the CA 1 region of the hippocampus, *J. Neurosci.*, **3**: 1369-1372, 1983.
- [30] LEVY W. B., STEWARD O., Temporal continuity requirements for long-term associative potentiation/depression in the hippocampus, *Neuroscience*, **8**: 791-797, 1983.
- [31] MUELLER A. L., DUNWIDDIE T. W., Anticonvulsant and proconvulsant actions of alpha- and beta-noradrenergic agonists on epileptiform activity in rat hippocampus in vitro, *Epilepsia*, **24**: 57-64, 1983.
- [32] MUELLER A. L., KIRK K. L., HOFFER B. J., DUNWIDDIE T. V., Noradrenergic responses in rat hippocampus: electrophysiological actions of direct- and indirect-acting sympathomimetics in the in vitro slice, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, **223**: 599-605, 1982.
- [33] NICOLL R. A., Neurotransmitters can say more than just „yes” or „no”, *Trends Neurosci.*, **5**: 269-274, 1982.
- [34] RACINE R. J., MILGRAM N. W., Short-term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain, *Brain Res.*, **260**: 201-216, 1983.
- [35] RACINE R. J., MILGRAM N. W., Long-term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain, *Brain Res.*, **260**: 217-231, 1983.
- [36] ROPERT N., KRNJEVIĆ K., Pharmacological characteristics of facilitation of hippocampal population spikes by cholinomimetics, *Neuroscience*, **7**: 1963-1977, 1982.
- [37] ROVIRA C., BEN-ARI Y., CHERUBINI E., Dual cholinergic modulation of

- hippocampal somatic and dendritic field potentials by the septo-hippocampal pathway, *Exp. Brain Res.*, **49**: 151-155, 1983.
- [38] RUDELL A. P., FOX S. E., RANCK J. B., Hippocampal excitability phase-locked to the theta rhythm in walking rats, *Exp. Neurol.*, **68**: 87-96, 1980.
- [39] SCHWARTZKROIN P. A., KNOWLES W. D., Local interactions in the hippocampus, *Trends Neurosci.*, **6**: 88-92, 1983.
- [40] SREBRO B., AZMITIA E. C., WINSON J., Effect of 5-HT depletion of the hippocampus on neuronal transmission from perforant path through dentate gyrus, *Brain Res.*, **235**: 142-147, 1982.
- [41] SWANSON L. W., TEYLER T. J., THOMPSON R. F., Hippocampal long-term potentiation: mechanisms and implications for memory, *Neurosci. Res. Prog. Bull.*, **20**: 613-764, 1982.
- [42] TEYLER T. J., The brain slice preparation: hippocampus, *Brain Res. Bull.*, **5**: 391-403, 1980.
- [43] VANDERWOLF C. H., Neocortical and hippocampal activation in relation to behavior: effects of atropine, eserine, phenothiazines and amphetamine, *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **88**: 300-326, 1975.
- [44] VERTES R. P., Brain stem generation of the hippocampal EEG, *Prog. Neurobiol.*, **19**: 159-186.
- [45] WEST M. O., DEADWYLER S. A., Circadian modulation of granule cell response to perforant path synaptic input in the rat, *Neuroscience*, **5**: 1597-1601, 1980.
- [46] WINSON J., Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat, *Science*, **201**: 160-163, 1978.
- [47] WINSON J., ABZUG C., Gating of neuronal transmission in the hippocampus: efficacy of transmission varies with behavioral state, *Science*, **196**: 1223-1225, 1977.

*Nadestano: 17 marca 1984.*

*Przyjęto: 25 kwietnia 1984.*

*Adres autora: ul. Karasia 6, 30-060 Kraków.*

Artykuł ten, kładący silniejszy akcent na aspekt neurofizjologiczny niż cytologiczny, został umieszczony w *Postęпах Biologii Komórki* z myślą o wzbudzeniu szerszego zainteresowania biologów komórki neuronami i ich specyfiką.

Redakcja



## INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem histologicznym, anatomicznym i embriologicznym.

Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

Prace należy przysyłać w dwu egzemplarzach — zarówno tekst, jak i załączniki. Objętość tekstu (bez rysunków wraz z objaśnieniami) nie powinna przekraczać 20 stron maszynopisu. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie, z podwójną interlinią, marginesem około 4 cm po lewej stronie oraz ponumerowany. W teście nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem.

Na pierwszej stronie należy podać, przed tekstem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, pod nim imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów oraz nazwę zakładu naukowego, w którym autorzy pracują, następnie krótkie streszczenie (ok. 1/2 strony) — również w języku polskim i angielskim. Za streszczeniem, z pozostawieniem około 5 cm odstępu, następuje tekst główny. W teście nie należy zamieszczać żadnych tabel, rysunków, fotografii ani schematów. Dla ustalenia ich lokalizacji należy pozostawić wolny wiersz w żądanym miejscu i odpowiednio zaznaczyć ołówkiem na marginesie: tab. 1, ryc. 1 itp.

Tekst podzielony na rozdziały jest bardziej przejrzysty. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Za tekstem należy dołączyć spis literatury. Powinna być ona ułożona w porządku alfabetycznym. Powoływanie się na cytowaną literaturę następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach prostokątnych, np. [5].

Przykłady cytowania literatury:

- [1] Sachsenmayer W., Remy U., Plattner R., Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, Exptl. Cell. Res., **73**: 41-48, 1972.
- [2] Hnilica L. S., McClure M. E., Speltzberg T. C., Histone biosynthesis and the cell cycle, [w] Histone and Nucleohistones, red. D. M. P. Philips, Plenum Press. London, New York 1977, 60-64.

Bibliografia powinna obejmować głównie piśmiennictwo z ostatnich 5 lat.

Tabele należy dołączyć na oddzielnych kartkach — każda powinna być podpisana. Rysunki, schematy, fotografie należy dołączyć w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Fotografie powinny być na błyszczącym papierze, kontrastowe. Podpisy pod ryciny powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Przy załącznikach powinno być podane ich pochodzenie.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów.

Autor na życzenie Redakcji obowiązany jest dokonać korekty autorskiej, którą powinien zwrócić w ciągu 3 dni. Koszty spowodowane zmianami tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi Autor.

Artykuły honorowane są według ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 nadbitek bezpłatnie.



## 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 półroczu roku następnego i na cały rok następny,

— do dnia 10 czerwca na II półroczu 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 ze 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 ze 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

A.	WOŹNY, Rola cytokinin w ontogenezie plastydów	137
K.	ŁAZOWSKI, Wideomikroskopia — nowa metoda obserwacji i badania ruchów komórkowych i transportu wewnątrzkomórkowego . . . . .	187
B.	KAŁUŻEWSKI, Chromosomy płciowe człowieka. Wybór informacji. Część I — chromosom X . . . .	203
B.	KAŁUŻEWSKI, Chromosomy płciowe człowieka. Wybór informacji. Część II — chromosom Y . . . .	239
M.	ZABEL, Metody immunocytochemicznego wykrywania antygenów . . . . .	263
G.	HESS, Mechanizmy regulujące aktywność neuronów hipokampa . . . . .	299