

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 12 · NR 3-4
1985 (163-338)

Postępy Biologii Komórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,
Maciej KAWALEC — sekretarz

Rada Redakcyjna

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ,
Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Zofia OSUCHOWSKA — przewod-
nicząca, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

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

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Nakład 543 + 97 egz. Ark. wyd. 14,5. Ark. druk. 11. Papier. sat. III kl., 80 g, 70 × 100 cm. Od-
dano do składania w sierpniu 1985 r. Podpisano do druku w grudniu 1985 r. Druk ukończono
w grudniu 1985 r. Zam. 3372/85. Cena zł 200,--

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

<http://rcin.org.pl>

KOMÓRKOWE MECHANIZMY PATOGENEZY MIAŻDŻYCY

Katarzyna Edyta PIROG *

Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Biostruktury,
Akademia Medyczna w Warszawie

Streszczenie. W pracy przedstawiono kilka współczesnych hipotez dotyczących patogenezy miażdżycy, zwracając uwagę na komórkowe i tkankowe mechanizmy patogenetyczne tej choroby.

Summary. In this article they were presented contemporary hypotheses concerning a pathogenesis of atherosclerosis. Special attention was given to the cellular and tissue pathogenetic mechanisms of this disease.

Skróty

CHM	— chylomikrony,
VLDL	— lipoproteiny bardzo niskiej gęstości,
LDL	— lipoproteiny niskiej gęstości,
HDL	— lipoproteiny wysokiej gęstości,
RER	— siateczka śródplazmatyczna ziarnista,
SER	— siateczka śródplazmatyczna gładka,
AG	— aparat Golgiego.

1. WSTĘP

Miażdżycza tętnic (atherosclerosis) jest chorobą, która często prowadzi do powstawania zawału serca lub udaru mózgu. Z tego powodu stanowi ona jedną z głównych przyczyn zgonów w Europie i Ameryce Płn. [80]. Od wielu lat trwają badania czynników, które mogą wywołać proces chorobowy, jednakże śledzenie wczesnych stadiów patogenezy jest

* Autorka jest studentką IV roku II Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie.

niezmiernie utrudnione, ponieważ choroba rozwija się niepostrzeżenie przez wiele lat, zanim wystąpią pierwsze objawy kliniczne.

Na miażdżycę ludzie chorowali już w starożytności. Zmiany miażdżycowe zostały znalezione w tętnicach mumii egipskich, ale wydaje się, że ze względu na ówczesną średnią życia, wynoszącą około 20–30 lat, choroba ta nie stanowiła takiego zagrożenia jak obecnie [40]. W 1856 r. Virchow opublikował pierwszą hipotezę dotyczącą patogenezy miażdżycy [86]. Podobnie jak niektóre współczesne hipotezy, uznaje ona uszkodzenie błony wewnętrznej naczynia (np. przez siłę hemodynamiczną krwi) za pierwotny czynnik zapoczątkowujący rozwój choroby. Obserwowane zmiany zapalne, proliferacja komórek, odkładanie włókniaka i zwapnienie blaszek miażdżycowych miały być, według Virchowa, zmianami wtórnymi, co również jest zgodne z obecnymi poglądami.

Współcześnie prowadzone prace badawcze są reprezentowane przez dwa kierunki badań: epidemiologiczne i podstawowe. Pierwsze ustalają czynniki ryzyka, które zwiększają prawdopodobieństwo wystąpienia choroby. Należy do nich m.in. nadciśnienie, cukrzyca, hipercholesterolemia, zaawansowany wiek, palenie papierosów i otyłość [80]. Równolegle prowadzone badania podstawowe skoncentrowały się na śledzeniu zmian morfologicznych i biochemicznych, jakim podlega ściana tętnicy *in vivo* u osób chorych na miażdżycę i w doświadczalnie indukowanej miażdżycy zwierząt. Do badań wykorzystuje się także hodowle *in vitro* komórek pochodzących z naczyń zdrowych i objętych miażdżycą. Wyniki tych prac posłużyły do sformułowania licznych hipotez dotyczących patogenezy miażdżycy. Najbardziej reprezentatywne z nich chciałabym przedstawić w postaci krótkiego przeglądu. Przegląd ten będzie poprzedzony opisem zmian w ścianach tętnic objętych procesem miażdżycowym. (Budowę ściany tętnicy prawidłowej można znaleźć w podręcznikach histologii [64].)

2. HISTOLOGICZNE ZMIANY OBSERWOWANE W ŚCIANIE TĘTNIC U OSÓB Z MIAŻDŻYCĄ

Zmiany miażdżycowe mają charakter ogniskowy i obejmują przede wszystkim błonę wewnętrzną tętnicy. W warstwie tej rozróżnia się następujące typy ognisk miażdżycowych: plamki żółte, blaszki włókniste, blaszki szkliste, blaszki wapniowe i ogniska kaszowate.

Plamki żółte (ang. fatty streaks) występują bardzo często i przede wszystkim u osób młodych (także u dzieci powyżej 10 lat), charakteryzują się nagromadzeniem niewielkiej liczby miocytów i/lub makrofagów w błonie wewnętrznej tętnicy. Komórki te, tzw. piankowate zawierają

w cytoplazmie liczne krople lipidów, głównie cholesterolu i jego estrów. Tłuszcze występują również w substancji międzykomórkowej. Plamki żółte nieznacznie wpływają na zwężenie światła naczynia, nie dają objawów klinicznych, a ich tworzenie się jest odwracalne.

Błaszki włókniste (ang. fibrous plaques) są zmianami nieodwracalnymi, charakterystycznymi dla zaawansowanej miażdżycy. Utworzone są przez komórki piankowe i miofibroblasty intensywnie syntetyzujące włókna kolagenowe, sprężyste i proteoglikany. Powstanie blaszki włóknistej w naczyniu małego kalibru często prowadzi do zamknięcia światła naczynia. Błaszki włókniste mogą rozwinąć się z plamek żółtych, albo powstają w wyniku miejscowej proliferacji miocytów gładkich, początkowo nie gromadzących lipidów [72].

Plamki żółte i blaszki włókniste mogą ulegać szkliwieniu: komórki tworzące te zmiany obumierają, a włókna międzykomórkowe ulegają depolimeryzacji. Powstają w ten sposób blaszki szkliste. W martwych masach białkowych blaszek szklistych często odkładają się sole wapnia, prowadząc do powstania blaszek wapniowych.

Ogniska kaszowate tworzone są przez masy szkliste, złogi wapnia i lipidów, głównie cholesterolu, który odkłada się w postaci romboidalnych kryształów. Często od strony światła naczynia ognisko pokryte jest zakrzepem [40].

Powstanie opisanych tu zmian zainicjowane jest przez następujące procesy: 1) proliferację i migrację miocytów, 2) migrację makrofagów, 3) intensywną syntezę substancji międzykomórkowej — włókien kolagenowych, sprężystych i proteoglikanów, 4) zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe gromadzenie lipidów, głównie cholesterolu i jego estrów. Powstawanie podobnych zmian można indukować u zwierząt doświadczalnych i badać etapy rozwoju miażdżycy w zwierzęcym układzie doświadczalnym. Trudno jednak ocenić, czy wyniki badań prowadzonych na szczurach, królikach i małpach odpowiadają temu, co w rzeczywistości dzieje się w tętnicach ludzi.

2.1. KOMÓRKI WYSTĘPUJĄCE W ZMIANACH MIAŻDŻYCOWYCH

Poza trudnością wskazania czynników wpływających na rozwój choroby, innym nie rozwiązany dotąd zagadnieniem jest określenie, które z komórek biorą główny udział w tworzeniu zmian miażdżycowych. Powstanie zmian można indukować przez mechaniczne złuszczenie śródbłonka, np. przez wprowadzenie do naczynia balonu kateterowego [73], nakłucie lub zeszkrobanie igłą komórek [77], albo przez podanie homocysteiny powodującej złuszczenie się śródbłonka [47]. W miejscu uszkodzenia, w błonie wewnętrznej, gromadzą się proliferujące miocyty. Komórki te

intensywnie syntetyzują substancję międzykomórkową i określane są jako miocyty syntetyzujące lub miofibroblasty [11, 23]. Ich fenotyp jest odmienny od typowych kurczliwych miocytów naczyniowych. Zawierają niewiele miofilamentów, natomiast mają dobrze rozwinięty aparat Golgiego (AG) i siateczkę śródplazmatyczną ziarnistą (RER). W komórkach tych katalaza i lizosomalne hydrolazy mają wyższe aktywności od miocytów kurczliwych. W warunkach prawidłowego stężenia lipidów w osoczu miocyty syntetyzujące na ogół ich nie gromadzą. Wyjątkowo obserwowano gromadzenie lipidów w miocytach blaszek miażdżycowych u królików z normolipemicznym osoczem, u których miażdżyca była indukowana immunologicznym uszkodzeniem śródbłona (przez podanie przeciwciał skierowanych przeciwko komórkom śródbłonkowym) [30].

Powstawanie blaszek włóknistych w naczyniach zwierząt można indukować przez długotrwałe stosowanie diety o wysokiej zawartości cholesterolu. Zmiany rozwijają się bardziej dynamicznie, gdy dodatkowo śródbłonek naczyń jest uszkodzany w sposób mechaniczny [83]. Peterson [67] wyróżniła trzy typy komórek występujących w blaszkach miażdżycowych królików karmionych dietą cholesterolową. Ponad połowę stanowiły komórki kulistego kształtu, zawierające bardzo duże wakuole lipidowe, dobrze rozwiniętą RER, słabo rozwinięty AG i SER. W cytoplazmie tych komórek występowały nieliczne miofilamenty. Dużo rzadziej były spotykane komórki pośrednie — z niewielką ilością wakuoli lipidowych, dobrze rozwiniętą RER, SER i AG. Komórki te zawierały liczne miofilamenty, a niektóre z nich były otoczone fragmentami błony podstawnej, charakterystycznej dla komórek mięśniowych. Trzecią, najmniej liczną grupę komórek w blaszkach stanowiły miocyty z bardzo dobrze rozwiniętymi miofilamentami i SER, otoczone wyraźną błoną podstawną. Autorka uważa, opierając się na tych obserwacjach, że komórki piankowate powstają w wyniku przekształcenia miocytów naczyniowych i jest to opinia przyjmowana przez wielu badaczy [11, 39, 66, 67, 73]. W innych badaniach wykazano, że w blaszkach miażdżycowych mogą występować makrofagi. Fowler [28] opisał dwa rodzaje komórek piankowatych znajdujących się w blaszkach miażdżycowych. Jedne z nich miały mniejszą gęstość optyczną, zawierały dużo wakuoli z cholesterolem i jego estrami, i wykazywały niektóre cechy makrofagów: receptory dla fragmentu F_c przeciwciał oraz wysoką aktywność enzymów — kwaśnych hydrolaz i katalazy. Jedna trzecia tych komórek miała również receptory dla składnika dopełniacza C_3 . Komórki drugiego typu, liczniejsze, charakteryzowały się większą gęstością optyczną, zawierały mniej wakuoli lipidowych, a w ich cytoplazmie występowały filamenty aktynomiozynowe. Podobnych obserwacji dokonali Gaton i Wolman [34], którzy stwierdzili występowanie

nie w blaszkach dwóch rodzajów komórek — miocytów o słabej aktywności kwaśnych hydrolaz i makrofagów o bardzo silnej aktywności tych enzymów. Barbolini i wsp. [4], którzy badali aktywność enzymatyczną komórek pochodzących z blaszek miażdżycowych, twierdzą, że komórki piankowate wykazywały silną aktywność niespecyficzných esteraz (A, B i C), słabą aktywność ATP-azową i brak aktywności fosfatazy zasadowej. Miocyty naczyniowe, których użyto jako kontrolę, miały silną aktywność ATP-azową, słabą aktywność niespecyficzných esteraz i fosfatazy zasadowej. Po dożylnym podaniu zwierzęciu błękitu trypanu zaobserwowano bardzo silny wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej i niespecyficzných esteraz w komórkach piankowatych oraz nieznaczne zmniejszenie aktywności wszystkich badanych enzymów w miocytach. Ponieważ błękit trypanu jest aktywatorem enzymów histiocyty, autorzy uważają więc, że komórki piankowate powstają z histiocyty, a nie miocytów. Schaffner [76] opisuje, że 80–90% komórek piankowatych (hodowanych *in vitro*) pochodzących z blaszek miażdżycowych małp i królików karmionych 3–6 miesięcy dietą miażdżycogenną miało cechy charakterystyczne dla makrofagów. Komórki te miały receptory dla fragmentu F_c przeciwciał i składnika C_3 dopełniacza, fagocytowały erytrocyty i wykazywały wysoką aktywność kwaśnej lipazy i lizozymu. Pozostałą część hodowli stanowiły komórki pochodzenia miocytarnego, zawierające nieznaczne miofilamenty i nie wykazujące żadnej z wymienionych tu cech makrofagów. Autor uważa, że główną rolę w powstawaniu blaszek pełnią makrofagi pochodzące z krążenia lub z niezróżnicowanych komórek błony wewnętrznej naczynia. Levis [54] i Fischman [26] zauważyli adhezję monocytów w okolicach miejsc, gdzie śródbłonek naczynia został uszkodzony. Vos [87] i Gerrity [35] obserwowali diapedezę monocytów do tkanki podśródbłonkowej przy podwyższonym poziomie cholesterolu w osoczu. Komórki te inicjowały powstawanie blaszek miażdżycowych [5].

Z przedstawionych obserwacji wynika, że przy podwyższonym poziomie cholesterolu w osoczu w powstawaniu zmian miażdżycowych biorą udział co najmniej dwa rodzaje komórek: miocyty gładkie i makrofagi krwiopochodne, a prawdopodobnie również makrofagi tkankowe. Haust [48] opisuje występowanie w blaszkach miażdżycowych ludzi tzw. miohistiocyty — komórek o morfologicznym charakterze miocytów i histiocyty. Komórki te, zdaniem autora, miałyby zdolność różnicowania się w typowe miocyty lub makrofagi, a w szczególnym przypadku — w miażdżycowe komórki piankowate. Inni autorzy sugerują, że komórki piankowate mogą się rozwijać z niezróżnicowanych komórek błony wewnętrznej naczynia. Z tych pierwotnych komórek mogą, w wyniku indukcji, powstawać miocyty, histiocyty i „pseudośródbłonek” [76, 77].

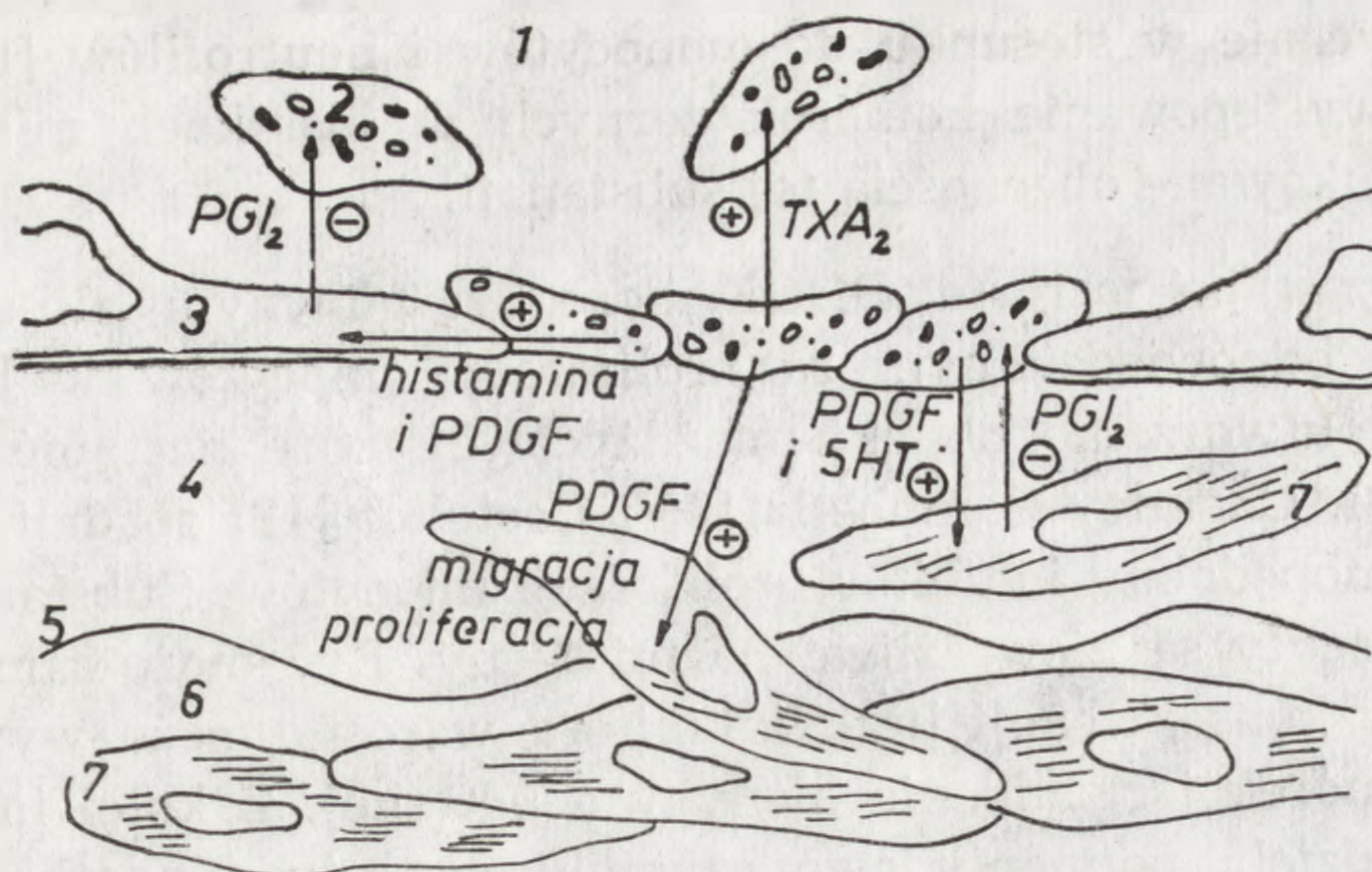
3. USZKODZENIE ŚRÓDBŁONKA JAKO PROCES INICJUJĄCY POWSTAWANIE ZMIAN MIAŻDŻYCOWYCH

3.1. HIPOTEZA ODPOWIEDZI NA USZKODZENIE ŚRÓDBŁONKA

Badania miażdżycy indukowanej u zwierząt doświadczalnych dały podstawę do przedstawienia wielu hipotez dotyczących mechanizmów patogenezy. Najlepiej udokumentowana jest hipoteza zaproponowana przez Rossa i Glomseta, według której proces miażdżycowy miałby być odpowiedzią na uszkodzenie śródbłonka [73], [74].

Po miejscowym uszkodzeniu śródbłonka na odsłoniętej tkance podśródbłonkowej płytki krwi ulegają adhezji. Podczas degranulacji płytek jest uwalniany płytkowo pochodny czynnik wzrostu (Platelet-Derived Growth Factor — PDGF) stymulujący miocyty błony środkowej naczynia do migracji i proliferacji w błonie wewnętrznej. PDGF modyfikuje metabolizm miocytów, w wyniku czego syntetyzują one zwiększoną ilość substancji międzykomórkowej oraz mają predyspozycje do nadmiernej akumulacji lipidów. Procesy te doprowadzają do powstania zmian obserwowanych klinicznie.

Hipoteza ta została oparta na przedstawionych poniżej obserwacjach. Przy doświadczalnym złuszczeniu śródbłonka tętnic (np. przez wprowadzenie balona kateterowego [73], zeszkobanie komórek [26], podanie homocysteiny [47] lub przeciwciał uszkadzających śródbłonek [30], albo długotrwałe stosowanie diety o wysokiej zawartości cholesterolu [3], [73]) obserwowano takie same procesy: skrócony czas krążenia płytek krwi i tworzenie mikrozakrzepów w odsłoniętym miejscu w ciągu 24 godz. od powstania uszkodzenia. Po 3–5 dniach obserwowano rozpoczęcie regeneracji śródbłonka, który w ciągu 7–14 dni pokrywał całkowicie uszkodzenie. Po trzech miesiącach jedynym śladem złuszczenia była zgrubiała błona wewnętrzna, w której migrujące z błony środkowej miocyty w wyniku aktywnej proliferacji utworzyły kilkanaście warstw komórkowych. Jeżeli uszkodzenie było jednorazowe, to zmiany w błonie wewnętrznej cofały się w następnych miesiącach [72]. Podanie dipiridamolu — substancji hamującej degranulację płytek — zapobiegało nagromadzeniu się miocytów i grubieniu błony [47]. Podobny efekt obserwowano po zastosowaniu surowicy antypłytkowej [31]. Na tej podstawie wysnuto wniosek, że płytki, które ulegają adhezji i degranulacji, wydzielają substancję działającą stymulująco na miocyty znajdujące się w sąsiedztwie uszkodzenia. Badania osocza i miocytów naczyniowych *in vitro* pozwoliły na wyizolowanie i zbadanie tej substancji, nazwanej płytkowo pochodnym czynnikiem wzrostu (PDGF).



Rys. 1. Aktywacja miocytów po uszkodzeniu śródbłonna

1. światło naczynia, 2. płytki krwi, 3. komórka śródbłonna, 4. przestrzeń podśródbłonkowa, 5. błona sprężysta wewnętrzna, 6. błona mięśniowa, 7. miocyt gładki. Po uszkodzeniu śródbłonna płytki krwi ulegają adhezji i degranulacji uwalniając min: tromboksan A_2 — TXA_2 , PDGF — płytkowy czynnik wzrostowy, histaminę, serotoninę — 5HT. Histamina i PDGF stymulują komórki śródbłonna do wydzielania prostacykliny PGI_2 , hamującej adhezję i degranulację płytek. Tromboksan A_2 wywiera efekt przeciwny i aktywuje płytki krwi. PDGF i serotonina po przejściu do tkanki podśródbłonkowej pobudzają miocyty naczyniowe do wydzielania PGI_2 . Sam PDGF wpływa na migrację, proliferację i zmianę metabolizmu miocytów (na podstawie opisów: Steinberga 1979 i Antoniadesa 1983)

Płytkowo pochodny czynnik wzrostu. PDGF jest glikoproteina o sekwencji aminokwasów zbliżonej do sekwencji polipeptydu syntetyzowanego przez komórki mięsaka wywoływanego przez wirusa SSV (*simian sarcoma virus*). Na tej podstawie wysnuwa się przypuszczenia, że onkogen wirusa powstał z genu (genów) kodujących PDGF [1, 2, 19, 21, 88]. PDGF powstaje w megakariocytach [16], a następnie jest transportowany przez płytki w α -ziarenkach i uwalniany w trakcie degranulacji. In vitro PDGF stymuluje migrację miocytów gładkich, ich proliferację, pobudza miocyty do syntezy kolagenu, zwiększa dokomórkowy transport aminokwasów i lipoprotein niskiej gęstości (LTD). Dzięki temu wzrasta wewnątrzkomórkowy poziom cholesterolu, fosfolipidów i białek potrzebnych do utworzenia odpowiedniej rezerwy błon przed podziałem [1]. PDGF i serotonina, również uwalniana w czasie degranulacji, pobudzają miocyty do syntezy i wydzielania prostacykliny (PGI_2), która hamuje adhezję i degranulację płytek, co na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego hamuje uwalnianie PDGF [1]. Wykrycie PDGF pozwoliło wytłumaczyć mechanizm nagromadzania się miocytów w błonie wewnętrznej. Stwierdzono, że degranulacja jednej płytki wystarcza do pobudzenia ponad setki miocytów [11]. Ponadto zaobserwowano, że in vitro PDGF działa

chemotaktycznie w stosunku do monocytów i neutrofilów [18]. Prawdopodobnie występowanie komórek żernych w blaszkach miażdżycowych jest uwarunkowane obecnością tej substancji.

Inne czynniki wzrostu. PDGF może być głównym, ale nie jedynym mitogenem odpowiedzialnym za proliferację miocytów w błonie wewnętrznej, a utworzenie blaszki miażdżycowej może nastąpić bez udziału płytek krwi. Chamley-Campbell [13] i Castellot [12] zbadali śródbłonkowy heparynopodobny inhibitor proliferacji miocytów. Substancja ta sprawia, że miocyty są niewrażliwe na mitogeny. Być może sam brak śródbłonka i w konsekwencji brak inhibitora wzrostu może wywołać proliferację komórek i zgrubienie błony wewnętrznej. Z kolei *in vitro* śródbłonek wydziela polipeptydowe czynniki wzrostu (Endothelial-Cell-Derived Growth Factor) stymulujące proliferację miocytów, gdy brakuje innych mitogenów [32, 78]. Jeden z polipeptydów wchodzących w skład ECDGF ma strukturę antygenową identyczną z PDGF [20].

Również czynniki uwalniane przez obumierające lub uszkodzone komórki śródbłonka pobudzają wzrost miocytów. W naczyniach zdrowych zwierząt około 1% komórek śródbłonka jest uszkodzonych lub martwych [33]. Uwalniają one czynniki mitogenne dla miocytów i substancje chemotaktyczne dla monocytów [46] oraz prostacyklinę zabezpieczającą przed adhezją płytek krwi [10]. Proliferację miocytów stymuluje również mitogen uwalniany przez monocyty (makrofagi) tzw. makrofagopochodny czynnik wzrostu (Macrophage-Derived Growth Factor — MDGF) [53, 58]. Lipoproteiny LDL z hiperlipemicznego osocza wpływają na 25–50% wzrostu proliferacji miocytów. HDL i VLDL z osocza hiperlipemicznego i LDL z osocza normolipemicznego mają tylko niewielki efekt stymulujący [13, 15, 25, 82]. Jeżeli więc u człowieka lub zwierzęcia doświadczalnego z podwyższonym poziomem lipidów w osoczu śródbłonek zostanie uszkodzony w tak niewielkim stopniu, że nawet nie nastąpi aktywacja płytek krwi, to i tak wiele mitogenów może zadziałać na miocyty: lipoproteiny przenikające przez uszkodzony śródbłonek, mitogeny z cytoplazmy uszkodzonego śródbłonka i MDGF uwalniany przez monocyty przyciągane do miejsc uszkodzeń.

3.2. HIPOTEZA INICJACJI PRZEZ MAKROFAGI

Według Vosa powstanie blaszki miażdżycowej jest inicjowane przez makrofagi, które przechodzą z naczynia do tkanki podśródbłonkowej w miejscu uszkodzenia bariery śródbłonkowej. Komórki te wydzielają MDGF, który przyciąga miocyty z błony środkowej i pobudza je do proliferacji i wzrostu w błonie wewnętrznej.

Vos i wsp. [87] badali powstawanie blaszek miażdżycowych w tętnicy szyjnej królików naświetlanych promieniami X (500 i 1000 radów) z normalnym i podwyższonym poziomem cholesterolu w osoczu. 8 godz. po naświetleniu obserwowano przechodzenie monocytów krwi do przestrzeni podśródbłonkowej. U królików z normalnym poziomem cholesterolu komórki te znikaly 10 dni po naświetleniu, natomiast u królików z podwyższonym poziomem cholesterolu już następnego dnia po naświetleniu zamieniały się w komórki piankowate. Liczba komórek piankowatych rosła z czasem, tworząc po 20 dniach ogniska zbudowane z 5–10 warstw komórkowych. W tym czasie można było zaobserwować początek zmian nekrotycznych, a także migrację miocytów gładkich z błony środkowej do wewnętrznej. Miocyty, podobnie jak makrofagi, zaczęły gromadzić lipidy, ale w znacznie mniejszej ilości. 30 dni po naświetleniu miocyty utworzyły kilka warstw, otaczając od strony światła naczynia komórki piankowate i materiał nekrotyczny. U królików naświetlanych z prawidłowym poziomem cholesterolu i królików nie naświetlanych z podwyższonym poziomem cholesterolu w osoczu nie obserwowano tworzenie się blaszek w czasie doświadczenia.

Zdaniem autora, główną rolę w inicjacji powstawania blaszek miażdżycowych mają makrofagi krwiopochodne. Promieniowanie X lub inny czynnik uszkodzający barierę śródbłonkową umożliwia zwiększoną diapedezę makrofagów do przestrzeni podśródbłonkowej. Osiadające w błonie wewnętrznej komórki proliferują i wydzielają MDGF. W wyniku działania tego mitogenu do rozwoju blaszki miażdżycowej włączają się miocyty z błony środkowej. Miocyty mogą również migrować i proliferować w błonie wewnętrznej pod wpływem LDL występujących w wyższym stężeniu i łatwiej przenikających przez uszkodzony śródbłonek.

3.3. CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA USZKODZENIE ŚRÓDBŁONKA

W hipotezie Rossa-Glomseta i Vosa krytyczną rolę w zapoczątkowaniu procesu miażdżycowego odgrywa uszkodzenie śródbłonka. W warunkach naturalnych śródbłonek może ulec złuszczeniu np. pod wpływem siły hemodynamicznej krwi. Miejscami najbardziej narażonymi na działanie prądu krwi są rozdwojenia tętnic i tam też najczęściej powstają zmiany miażdżycowe. Obserwuje się również korelację powstawania miażdżycy z istnieniem nadciśnienia tętniczego, sprzyjającego złuszczeniu śródbłonka [80]. Innymi przyczynami uszkodzenia śródbłonka mogą być: hipercholesterolemia [50], niedotlenienie [80], działanie toksyn oraz reakcje autoimmunoagresji (w blaszkach miażdżycowych można czasem wykryć kompleksy antygen-przeciwciało) [22]. Specyficznymi substancjami

uszkadzającymi funkcję śródbłonna są nadtlenki wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Związki te hamują syntezę prostacykliny, przez co wpływają na patologiczną aktywację płytek krwi w naczyniu i na tworzenie zakrzepów [42].

3.4. HIPOTEZA ZABURZENIA RÓWNOWAGI TROMBOKSANOWO-PROSTACYKLINOWEJ

Według Gryglewskiego, zmiany miażdżycowe powstają na skutek zaburzenia wewnątrznaczyniowej równowagi tromboksan (TXA_2) — prostacyklina (PGI_2). Tromboksan A_2 , produkowany przez płytki krwi, wpływa pobudzająco na ich agregację i degranulację oraz powoduje zwężenie naczynia. Prostacyklina, produkowana przede wszystkim przez komórki śródbłonna, działa antagonistycznie w stosunku do TXA_2 . Przy zmniejszonej produkcji PGI_2 następuje zaburzenie równowagi TXA_2 - PGI_2 na korzyść tromboksanu, co powoduje nadmierną aktywację płytek w naczyniu. Płytki ulegają adhezji na komórkach śródbłonna, a uwalniane przez nie enzymy niszczą tkankę naczynia powodując rozwój ogniska miażdżycowego [42].

Komórki śródbłonna i miocyty pochodzące ze zmian miażdżycowych syntetyzują mniej prostacykliny niż komórki pochodzące ze zdrowych części naczynia [41, 52, 79]. Stwierdzono przy tym, że produkcja PGI_2 jest tak samo niska w rozwiniętej blaszce miażdżycowej, jak w świeżo powstałej plamce żółtej [79]. Zmniejszona produkcja PGI_2 jest wynikiem zmniejszonej aktywności enzymu syntetazy prostacyklinowej. Aktywność tego enzymu może być modyfikowana przez wiele czynników. Najważniejszymi, z punktu widzenia patogenezy miażdżycy, są nadtlenki wielonienasyconych kwasów tłuszczowych — swoiste inhibitory syntetazy PGI_2 . Wysokie stężenie tych związków wykryto we fragmentach naczyń objętych miażdżycą [60]. Wyjściowym substratem do syntezy nadtlenców może być kwas arachidonowy, z którego w warunkach prawidłowych powstaje TXA_2 i PGI_2 . Przykładem nadtlencu powstałego z kwasu arachidonowego może być kwas 15-hydroksyperoksyarachidonowy, który aktywuje płytki krwi [60]. Peroksydacja kwasów tłuszczowych jest indukowana przez wolne rodniki, m.in. w stanach niedoboru witaminy E.

Witamina E jako antyoksydant zapobiega powstawaniu nadtlenców, dzięki czemu pozwala na zachowanie stałego poziomu produkcji prostacykliny [63]. Jednakże próby leczenia miażdżycy witaminą E nie powiodły się, ponieważ dawki, jakich wymagało leczenie, wywoływały hiperwitaminozę.

Do innych substancji wpływających na syntezę PGI_2 należą lipoproteiny. Lipoproteiny niskiej gęstości LDL hamują syntezę PGI_2 , a lipoproteiny wysokiej gęstości HDL stymulują syntezę [6, 62]. Obserwacje te

są potwierdzeniem wyników badań epidemiologicznych, zgodnie z którymi wysoki poziom LDL w osoczu jest dodatnim czynnikiem ryzyka w chorobie miażdżycowej, a wysoki poziom HDL — ujemnym czynnikiem ryzyka. Syntetaza prostacyklinowa w ścianie tętnicy u starszych szczurów ma niższą aktywność w porównaniu ze szczurami młodymi [14]. U ludzi zwiększa się ryzyko choroby wraz z wiekiem, co może być spowodowane zmianą aktywności syntetazy prostacyklinowej.

Aspiryna jest trwałym inhibitorem cyklooksygenazy płytkowej, dzięki czemu blokuje ona produkcję TXA_2 . Jednakże stwierdzono, że substancja ta zmniejsza aktywność cyklooksygenazy w śródbłonku, hamując syntezę PGI_2 , co wykluczyło możliwość zastosowania jej w terapii.

4. HIPOTEZA MONOKLONALNEGO CHARAKTERU ROZWOJU MIAŻDŻYCY

Ekscytującą hipotezę dotyczącą rozwoju miażdżycy zaproponowali Bendittowie, którzy wykazali, że miocyty tworzące płytki miażdżycowe stanowią klon komórkowy. Ponieważ wzrost monoklonalny jest charakterystyczny dla guzów nowotworowych, Bendittowie sugerują więc, że zmiany miażdżycowe powstają na skutek transformacji nowotworowej miocytów.

Do wykrycia monoklonalnego wzrostu komórek wykorzystano zjawisko losowej supresji jednego z chromosomów X u kobiet, czego skutkiem jest mozaikowa ekspresja genów tych chromosomów. Jeżeli kobieta jest heterozygotyczna pod względem genu chromosomów X, kodującego syntezę różnych izoenzymów, to komórki jej organizmu będą stanowiły mozaikę aktywności jednego albo drugiego izoenzymu. Bendittowie badając aktywność izoenzymów dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej stwierdzili, że ponad 90% miocytów blaszki miażdżycowej wykazuje aktywność tylko jednego z izoenzymów [7], co przemawia za wzrostem monoklonalnym. Podobne wyniki otrzymali Pearson i wsp. [65], którzy badali te same izoenzymy w blaszkach włóknistych i plamkach żółtych. Okazało się, że w blaszkach średnio 96% komórek ma aktywność tego samego izoenzymu, natomiast w plamkach zaobserwowano wzrost poliklonalny. Jeżeli plamki są prekursorami blaszek, to między komórkami plamek musiałaby następować jakaś selekcja prowadząca do wzrostu monoklonalnego.

Hipoteza Bendittów była inspiracją do badań nad właściwościami komórek pochodzących z blaszki miażdżycowej. Okazało się, że komórki te nie mają cech komórek transformowanych; ich budowa nie różni się zasadniczo od normalnych miocytów naczyniowych i zdolność podziałowa tych komórek jest ograniczona.

Pietila i wsp. [68] oraz Friedman [29] opisują, że w blaszkach miażdżycowych królików karmionych dietą wysokocholesterolową, miocyty po 6 miesiącach aktywnej proliferacji wchodzą w stadium stacjonarne i przestają się dzielić. Thomas [83] w opozycji do monoklonalnej hipotezy Bendittów opisuje poliklonalny wzrost miocytów w blaszkach miażdżycowych świń karmionych dietą aterogenną. Zaobserwował on, że do utworzenia wielu warstw komórek w blaszce potrzeba niewielu generacji komórek. Autor uważa, że nie jest możliwe, aby tak duża ilość miocytów mogła powstać w kilku generacjach z jednej tylko komórki.

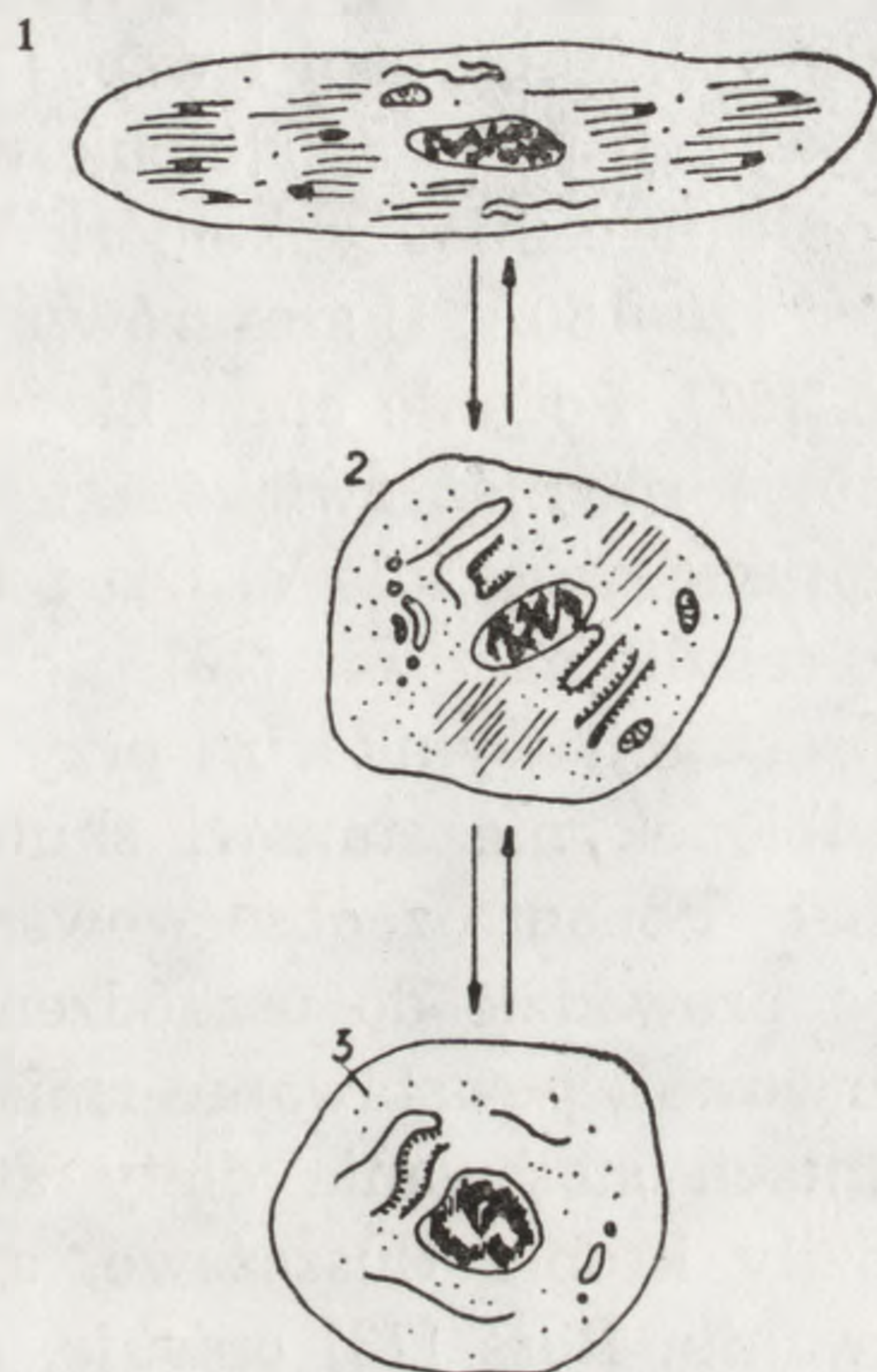
5. HIPOTEZA KLONÓW KOMÓREK NIEZRÓŻNICOWANYCH

Inną hipotezę próbującą tłumaczyć monoklonalny wzrost miocytów zaproponowali Martin i Sprague [59]. Zgodnie z tą hipotezą w błonie środkowej naczynia istnieje pewna pula nie zróżnicowanych komórek, które nie przeszły tylu podziałów mitotycznych co sąsiadujące komórki i mają w związku z tym duży potencjał proliferacyjny. Dojrzałe miocyty błony środkowej produkują chalony hamujące cykl tych komórek w fazie G_2 [11].

Spadek stężenia chalonów lub migracja komórek do błony wewnętrznej, gdzie ich brak, pozwala na rozpoczęcie podziałów, czego rezultatem jest utworzenie ogniska miażdżycowego. Z czasem, gdy liczba miocytów w błonie wewnętrznej wzrośnie i komórki te po całkowitym zróżnicowaniu zaczną wydzielać chalony, następuje spadek ilości mitoz, a potem zupełny zanik aktywności proliferacyjnej w blaszce [59].

Hipoteza Martina i Sprague'a jest zbieżna z obserwacjami Daouda i wsp. [17] oraz Thyberga [84], którzy badali eksplanty miocytów z błony wewnętrznej naczynia. Okazało się, że w pierwszym tygodniu hodowli miocyty odróżnicowywały się. Początkowo w komórkach zmniejszała się ilość miofilamentów na korzyść rozwoju innych organelli komórkowych. Potem obserwowano zupełną utratę miofilamentów i powstawały komórki określone przez autorów jako fibroblastyczne (fibroblast-like cells). Część z tych komórek, uboga w organelle, stanowiła tzw. komórki pierwotne (primitive cells). Przez pierwsze trzy tygodnie liczba komórek w eksplancie rosła z dużą dynamiką, po czym aktywność proliferacyjna zmalała, a prawie wszystkie komórki uległy ponownemu zróżnicowaniu w dojrzałe miocyty gładkie. Po podaniu trytowanej tymidyny zaobserwowano, że mitozie ulegały tylko komórki pierwotne i fibroblastyczne. Prawdopodobnie miocyty przechodzące z błony środkowej do wewnętrznej mogą ulegać podobnemu odróżnicowaniu i rozpocząć proliferację,

jak to obserwowano *in vitro*. Niezróżnicowane komórki prymitywne i fibroblastyczne mogłyby w warunkach hipercholesterolemii zmieniać się w komórki piankowate, gromadzące lipidy.



Rys. 2. Zwrotne odróżnicowywanie się miocytów naczyniowych

1 — miocyt naczyniowy, 2 — tzw. komórka fibroblastyczna,
3 — tzw. komórka prymitywna (na podstawie Daoud 1973)

6. UDZIAŁ TŁUSZCZÓW W ROZWOJU MIAŻDŻYCY

Dieta z wysoką zawartością cholesterolu jest rutynowo wykorzystywana do wywoływania zmian miażdżycowych u zwierząt doświadczalnych [44], [71]. Do tej pory jednak nie wiadomo, czy podwyższony poziom lipidów w osoczu może wywołać miażdżycę, czy też jest potrzebny jakiś dodatkowy czynnik, np. uszkodzenie śródbłonna. Thomas [83], który badał miażdżycę u świń karmionych dietą aterogenną stwierdził, że zmiany mogą powstać w wyniku działania samych lipidów, ale powstają po wielu latach. Mechaniczne uszkodzenie śródbłonna balonem kateterynym ogromnie przyspieszyło powstawanie zmian.

6.1. LIPOPROTEINY OSOCZA I BARIERA ŚRÓDBŁONKOWA

W warunkach prawidłowych CHM i VLDL nie mogą przenikać przez barierę śródbłonkową. Przez śródbłonek transportowane są LDL (powstające w wyniku wewnątrznaczyniowej delipidacji VLDL) — główne noś-

niki cholesterolu w osoczu oraz HDL odpowiedzialne za zwrotny transport cholesterolu do wątroby. Vasile [85] badając proces transportu LDL przez śródbłonek stwierdził, że zwiększenie poziomu LDL w osoczu wpływa liniowo na zwiększenie przenikania tych lipoprotein i ich gromadzenie w tkance podśródbłonkowej. Robertson i wsp. [70] zaobserwowali, że lipoproteiny mogą pokonywać barierę śródbłonkową przechodząc między komórkami. Średnia odległość między komórkami śródbłonka w naczyniu rozszerzonym wynosi 120–160Å. U szczurów z nadciśnieniem odległości te wynoszą 200–500Å [81]. Podanie amin biogennych (angiotensyny II, noradrenaliny, serotoniny) również zwiększa te odległości do 750Å, a nawet do 2000Å. Przez takie szczeliny VLDL i LDL przechodzą bez trudności i gromadzą się w ścianie naczynia [70].

Z przedstawionych obserwacji wynika, że przy hipercholesterolemii, nadciśnieniu i stresie śródbłonek nie stanowi skutecznej zapory przed napływem lipidów do tkanek. Ponadto zaobserwowano, że czasami hipercholesterolemia może sama prowadzić do uszkodzenia śródbłonka. Kritchevski i wsp. [50] zaobserwowali powstawanie zmian w śródbłonku tętnic królików po 5 tygodniach stosowania diety aterogennej. Komórki zmieniały kształt, gromadziły krople tłuszczowe, a połączenia międzykomórkowe ulegały przerwaniu. Ross [73] opisuje, że makaki karmione dietą hipercholesterolemiczną w ciągu 18 miesięcy utraciły 70% śródbłonka. Vasile podaje również, że endocytoza LDL przez komórki śródbłonka jest w odróżnieniu od transcytozy procesem wysoce specyficznym i ulega wysyceniu przy wysokich stężeniach lipoprotein. Dlatego też komórki śródbłonka nie gromadzą cholesterolu.

6.2. GROMADZENIE LIPIDÓW PRZEZ KOMÓRKI JAKO PRZYCZYNA ROZWOJU MIAŻDŻYCY

LDL transportujące cholesterol i fosfolipidy wchłaniane są przez komórki w procesie endocytozy za pośrednictwem receptora. Wewnątrz komórki LDL ulegają degradacji w lizosomach — apoproteiny degradowane są do aminokwasów, a estry cholesterolu ulegają hydrolizie. Uwolniony do cytoplazmy cholesterol jest reestryfikowany i razem z fosfolipidami wbudowywany do błon komórkowych. Poza wątrobą i komórkami syntetyzującymi hormony sterydowe inne komórki organizmu nie są zdolne do metabolizmu cholesterolu, dlatego jego nadmiar jest odprowadzany z komórek do wątroby. W procesie zwrotnego transportu biorą udział HDL produkowane przez wątrobę [9].

W komórkach istnieją mechanizmy zabezpieczające przed nadmiernym gromadzeniem cholesterolu: po endocytozie LDL zahamowaniu ule-

ga synteza receptorów dla LDL, oraz wewnątrzkomórkowa synteza cholesterolu, natomiast pobudzeniu ulega estryfikacja cholesterolu znajdującego się w cytoplazmie.

Miocyty hodowane *in vitro* przy wysokim stężeniu natywnego LDL nie gromadzą cholesterolu w cytoplazmie, ponieważ dokomórkowy transport lipoprotein ulega wysyceniu na skutek ograniczonej liczby receptorów dla LDL. Miocyty gromadzą cholesterol dopiero po chemicznej modyfikacji LDL przez DMPA (NN-dwumetylo-1,3-propanodiamina). Połączenie z DMPA nadaje lipoproteinie dodatni ładunek, dzięki czemu może niespecyficznie wiązać się z ujemnie naładowanymi cząsteczkami błony komórkowej [36]. Hodowane *in vitro* makrofagi również nie gromadzą cholesterolu pochodzącego z natywnego LDL. Komórki te gromadzą cholesterol po acetylacji [57] lub sprzężeniu LDL z DMPA, albo modyfikacji lipoproteiny przez malonodialdehyd uwalniany z ziarenek płytek krwi w trakcie degranulacji [27].

Dieta o dużej zawartości cholesterolu wywołuje zmiany w składzie lipoprotein osocza [55, 57]. Zaobserwowano m.in. pojawienie się nie występujących fizjologicznie β -VLDL bogatych w cholesterol. β -VLDL są to lipoproteiny o gęstości VLDL, ale migrujące z elektroforetyczną frakcją β -lipoprotein, czyli LDL. Makrofagi inkubowane z β -VLDL gromadziły cholesterol w cytoplazmie i zamieniały się w komórki piankowe [38, 56]. Gromadzenie cholesterolu indukowane przez β -VLDL lub acetylowane LDL jest częściowo regulowane, ale na bardzo wysokim poziomie — endocytoza tych lipoprotein jest 20–160-krotnie większa niż natywnych LDL [56].

Według Goldsteina i Browna [37] gromadzenie cholesterolu przez miocyty może być spowodowane brakiem dostatecznej liczby receptorów dla LDL na komórkach tkanki łącznej, przede wszystkim fibroblastach. Defekt taki występuje np. w genetycznie uwarunkowanej hipercholesterolemii typu II. Ograniczona endocytoza LDL przez fibroblasty powoduje podniesienie się poziomu cholesterolu w osoczu i nadmierne obciążenie tłuszczami innych komórek, np. miocytów gładkich, które stają się oczyszczalniami osocza z cholesterolu.

Gromadzenie cholesterolu w komórkach może występować na skutek obniżonej aktywności hydrolazy estrów cholesterolowych [34], [45]. Estry, które ulegają endocytozie, ulegają hydrolizie w lizosomach i dopiero wolny cholesterol aktywuje mechanizm zabezpieczający przed jego gromadzeniem [36]. Słaba aktywność hydrolazy powoduje zaleganie estrów w lizosomach, co morfologicznie daje obraz komórki piankowej. Od aktywności hydrolazy zależy również odpływ cholesterolu z komórki, ponieważ HDL odpowiedzialne za zwrotny transport do wątroby może wiązać tylko wolny cholesterol [69]. Nadmierne obciążenie komó-

rek estrami cholesterolu jest, według wymienionych autorów, przyczyną powstawania zmian miażdżycowych.

Gromadzenie cholesterolu i fosfolipidów na substancji międzykomórkowej blaszek miażdżycowych jest uwarunkowane jej zmienionym składem i budową. Miocyty syntetyzujące produkują dwukrotnie więcej kolagenu I typu niż III (zwykle proporcje te są odwrotne) [49]. Część włókien kolagenowych wykazuje prążkowanie co 90–120 nm, a nie co 64 nm, i wiążą one lipidy [61]. Powstająca w blaszce miażdżycowej elastyna zawiera mało aminokwasów tworzących wiązania krzyżowe i znaczną część aminokwasów polarnych o dużym powinowactwie do jonów Ca^{2+} , a przez to wiąże się z nią duża część lipidów blaszki (około 1/3 wszystkich lipidów). Podobnie jak elastyna, proteoglikany wiążą cholesterol, fosfolipidy oraz fibrynogen [49].

7. ZAKOŃCZENIE

Przedstawione tu hipotezy nie wykluczają się wzajemnie, ale raczej dopełniają. Ich wspólnym założeniem jest to, że proces miażdżycowy rozpoczyna się od naruszenia bariery śródbłonkowej (złuszczenia, uszkodzenia komórek, zwiększenia ich przepuszczalności i zwiększenia odległości między komórkami). Przez tę nieszczelność do błony wewnętrznej i środkowej dostają się monocyty krwi i substancje zdolne pobudzić miocyty naczyniowe do proliferacji. Substancje te mogą mieć różny charakter — mogą być lipoproteinami, czynnikami produkowanymi przez makrofagi lub megakariocyty. Prawdopodobnie wszystkie biorą udział w inicjacji powstawania blaszek miażdżycowych. Zgodnie z hipotezami Bendittów i Martina, niewiele komórek błony wewnętrznej jest zdolnych do proliferacji pod wpływem zewnętrznych mitogenów. Spośród wielu miocytów które migrują z błony środkowej, proliferują tylko nieliczne, prawdopodobnie te słabiej zróżnicowane i dają początek monoklonalnym populacjom komórek blaszek włóknistych.

Przedstawione hipotezy opisywały powstawanie miażdżycy na poziomie komórkowym. Nie można jednak zapominać, że opisane procesy są wynikiem nieprawidłowości ogólnoustrojowych. Rozwój miażdżycy zależy od funkcjonowania układu współczulnego — przez regulację hemodynamicznych i metabolicznych właściwości naczyń, nerek — przez regulację ciśnienia krwi, jelita i wątroby — przez produkcję lipoprotein i metabolizm cholesterolu. Ogromną funkcję zabezpieczającą przed rozwojem miażdżycy pełnią płuca, w których powstaje duża część ustrojowej prostacykliny. Synteza PGI_2 przez śródbłonek płuc jest pobudzana przez hiperwentylację [43]. Prawdopodobnie jest to jeden z powodów, dla których aktywność ruchowa jest ujemnym czynnikiem ryzyka w miażdżycy.

Być może opisane hipotezy zostaną za kilka lat całkowicie uznane i potwierdzone, ale możliwe jest, że wszystkie te modele staną się nieaktualne. Fabricant [24] opisuje, że wirus MDV (Marek's disease herpesvirus) wywołuje zmiany w metabolizmie lipidowym miocytów naczyńowych. Zmiany te objawiają się gromadzeniem cholesterolu, fosfolipidów i wolnych kwasów tłuszczowych. Z 8% blaszek miażdżycowych badanych tętnic ludzkich wyizolowano wirusa *herpes simplex* [8]. Być może badania patogenezy miażdżycy, podobnie jak wielu innych chorób, zakończą się uznaniem jej za chorobę wirusową.

LITERATURA

- [1] ANTONIADES H. N., WILLIAMS L. T., Human platelet-derived growth factor: structure and function, *Fed. Proc.*, **42**: 2630-2634, 1983.
- [2] ANTONIADES H. N., HUNKAPILLER M. W., Human platelet-derived growth factor (PDGF): aminoterminal amino acid sequence. *Science*, **220**: 963-965, 1983.
- [3] ARMSTRONG M. L., PETERSON R. E., HOAK J. C., MEGAN M. B., CHENG F., CLARKE W. R., Arterial platelet accumulation in experimental hipercholesterolemia, *Atherosclerosis*, **36**: 89-100, 1980.
- [4] BARBOLINI G., SCILBRA G. A., BOTTICELLI A., BOTTICELLI S., On the origin of foam cells in cholesterol-induced atherosclerosis of the rabbit, *Virchows Arch (Abt.B)*, **3**: 24-32, 1969.
- [5] BAYLISS HIGH O. B., ADAMS C. W., The role of macrophages and giant cells in advanced human atherosclerosis, *Atherosclerosis*, **36**: 441-448, 1980.
- [6] BEITZ W., FOSTER W., Influence of human low density and high density lipoprotein cholesterol on the in vitro prostaglandin synthetase activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **620**: 332-335, 1980.
- [7] BENDITT E. P., BENDITT J. M., Evidence for monoclonal origin of human atherosclerotic plaques, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 1753-1756, 1973.
- [8] BENDITT E. P., Viruses in the etiology of atherosclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 6386-6390, 1983.
- [9] BONDJERS G., BJÖRKERUND S., Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. VI. Cholesterol elimination in vitro from experimental atherosclerotic lesions, *Exp. Mol. Pathol.* **26**: 341-349, 1977.
- [10] BROX J. H., NORDØY A., Prostacyclin and ⁵¹Cr release in cultured human endothelial cells, *Haemostasis*, **12**: 345-352, 1982.
- [11] CAMPBELL G. R., CHAMLEY-CAMPBELL J. H., Invited review: the cellular pathobiology of atherosclerosis, *Pathology*, **13**: 423-440, 1981.
- [12] CASTELLOT J., ADDONIZIO M., ROSENBERG R., KARNOVSKY M. J., Cultured endothelial cells produce a heparin-like inhibitor of smooth muscle cell growth, *J. Cell. Biol.*, **90**: 372-379, 1981.
- [13] CHAMLEY-CAMPBELL J. H., CAMPBELL G. R., ROSS R., Smooth muscle cell in culture, *Phys. Rev.*, **59**: 1-61, 1979.
- [14] CHANG W. C., MUROTA S. I., NAKAO J., ORIMO H., Age-related decrease in prostacyclin biosynthetic activity in rat aortic smooth muscle cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **620**: 159-166, 1980.

- [15] CHEN R. M., GETZ G. S., The role of hyperlipemic serum on the proliferation and necrosis of aortic medial cells in vitro, *Exp. Mol. Pathol.*, **26**: 359-374, 1977.
- [16] CHERNOFF A., LEVINE R. F., GOODMAN D. S., Origin of platelet-derived growth factor in megakaryocytes in guinea pigs, *J. Clin. Invest.*, **65**: 926-930, 1980.
- [17] DAOUD A. S., FRITZ K. S., JARMOLYCH J., AUGUSTYN J. M., Use of aortic medial explants in the study of atherosclerosis, *Exp. Mol. Pathol.*, **18**: 177-189, 1973.
- [18] DEUEL T. F., SENIOR R. M., Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet derived growth factor, *J. Clin. Invest.*, **69**: 1046-1049, 1982.
- [19] DEUEL T. F., HUANG J. S., Platelet derived growth factor. Structure, function and roles in normal and transformed cells, *J. Clin. Invest.*, **74**: 669-676, 1984.
- [20] DI CORLETO P. E., BOWEN-POPE D. F., Cultured endothelial cells produce platelet derived growth factor-like protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1919-1923, 1983.
- [21] DOOLITTLE R. F., HUNKAPILLER M. W., HOOD L. E., DEVARE S. G., ROBBINS K. C., AARONSON S. A., ANTONIADES H. N., Simian sarcoma oncogene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet derived growth factor, *Science*, **221**: 275-277, 1983.
- [22] ELENDET D., MALBERG K., Immunopathogenesemodelle der Arteriosclerose, *Allergie und Immunologie*, **28**: 36-46, 1982.
- [23] ESKIN S. G., Tissue-cultured smooth muscle cells from normal and atherosclerosis arteries, *Cardiovascular Res. Cent. Bull.*, **18**: 85-92, 1980.
- [24] FABRICANT C. G., HAJJAR D. P., MINICK C. R., Lipid accumulation in cultured vascular smooth muscle cells infected with Marek's disease herpesviruses, *Fed. Proc.*, **29**: 1110, 1980.
- [25] FISCHER-DZOGA K., FRASER R., Stimulation of proliferation in stationary primary cultures of monkey and rabbit aortic smooth muscle cells. I. Effects of lipoprotein fractions of hyperlipemic serum and lymph, *Exp. Mol. Pathol.*, **24**: 346-459, 1976.
- [26] FISCHMAN J. A., RYAN G. B., KARNOVSKY M. J., Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening, *Lab. Invest.*, **30**: 339-451, 1975.
- [27] FOGELMAN A. M., SNECHTER I., SEAGER J., HOKOM M., CHILD J., EDWARDS P., Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **20**: 2214-2218, 1977.
- [28] FOWLER S., Characterization of foam cells in experimental atherosclerosis, *Acta Med. Scand. (Suppl.)*, **642**: 151-158, 1980.
- [29] FRIEDMAN M., BYERS S. O., Observations concerning the evolution of atherosclerosis in the rabbit after cessation of cholesterol feeding, *Atherosclerosis*, **43**: 349-358, 1963.
- [30] FRIEDMAN R. J., MOORE S., SINGAL D. P., Repeated endothelial injury and induction of atherosclerosis in normolipemic rabbits by human serum, *Lab. Invest.*, **30**: 404-417, 1975.
- [31] FRIEDMAN R. J., STERMAN M. B., The effect of thrombocytopenia on experimental arteriosclerotic lesion formation in rabbits. Smooth muscle cell proliferation and re-endothelization, *J. Clin. Invest.*, **60**: 1191-1201, 1977.

- [32] GAJDUSEK C., DI CORLETO P., ROSS R., An endothelial cell derived growth factor, *J. Cell. Biol.*, **85**: 467-472, 1980.
- [33] GAJDUSEK C., SCHWARTZ S. M., Clonal endothelial growth, *Fed. Proc.*, **41**: 493, 1982.
- [34] GATON E., WOLMAN M., The role of smooth muscle cells and hematogenous macrophages in atheroma, *J. Pathology*, **123**: 123-129, 1977.
- [35] GERRITY R. G., The role of monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions, *Am. J. Pathol.*, **103**: 181-190, 1981.
- [36] GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S., Low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis, *Ann. Rev. Biochem.*, **46**: 897-930, 1977.
- [37] GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S., Atherosclerosis: the low density lipoprotein receptor, *Metabolism*, **26**: 1257-1275, 1977.
- [38] GOLDSTEIN J. L., HO Y. K., BROWN M. S., Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic canine β -VLDL, *J. Biol. Chem.*, **255**: 1839-1848, 1980.
- [39] GOTLIEB A. I., Smooth muscle and endothelial cell function in the pathogenesis of atherosclerosis, *Can. Med. Ass. J.*, **126**: 903-908, 1982.
- [40] GRONIOWSKI J., *Patomorfologia*, PZWL, Warszawa 1981.
- [41] GRYGLEWSKI J. R., DEMBIŃSKA-KIEĆ A., ŻMUDA A., GRYGLEWSKA T., Prostacyclin and tromboxane A₂ biosynthesis capacities of heart, arteries and platelets at various stages of experimental atherosclerosis in rabbits, *Atherosclerosis*, **31**: 385-394, 1978.
- [42] GRYGLEWSKI J. R., Prostacyclin and atherosclerosis, *Trends Pharmacol. Sci.*, **1**: 164-166, 1980.
- [43] GRYGLEWSKI J. R., KORBUT R., SPŁAWIŃSKI J., Prostacyclin a hormone released from the lungs into circulation, *Materia Medica Polona*, **2**: 154, 1978.
- [44] GUPTA P. P., TANDON H. D., Experimental atherosclerosis in swine: effect of dietary protein and high fat. *Exp. Mol. Pathol.*, **20**: 115-131, 1974.
- [45] HAJJAR D. P., Cholesteryl ester metabolism in re-endothelialized and de-endothelialized aorta, *Fed. Proc.*, **29**: 1109, 1980.
- [46] HANSON G. K., BJORNHEDEN T., Fc dependent binding of monocytes to areas with endothelial injury in the rabbit aorta, *Exp. Mol. Pathol.*, **34**: 264-280, 1981.
- [47] HARKER L. A., ROSS R., Homocysteine induced atherosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis, *J. Clin. Invest.*, **58**: 731-741, 1976.
- [48] HAUST M. D., The nature of bi- and trinuclear cells in atherosclerotic lesions in man, *Atherosclerosis*, **36**: 356-377, 1980.
- [49] HINEK A., Miocyty naczyniowe — komórki wieloczynnościowe, *Postępy Biologii Komórki*, **9**: 401-420, 1982.
- [50] INGERMAN-WOJEŃSKI C. M., SEDAR A. W., NISSENBAUM M., SILVER M. J., KLURFELD D. M., KRITCHEVSKY D., Early morphological changes in the endothelium of a peripheral artery of rabbits feed an atherogenic diet, *Exp. Mol. Pathol.*, **38**: 48-60, 1983.
- [51] KING G. L., Characterisation and partial purification of an endothelial cell growth factor from human platelets, *J. Clin. Invest.*, **73**: 392-396, 1984.
- [52] LARRNE I., Prostacyclin production by cultured smooth muscle cells from atherosclerotic rabbit aorta, *Nature*, **285**: 480-482, 1980.

- [53] LEIBOVICH S. J., ROSS R., A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro, *Am. J. Pathol.*, **84**: 501-513, 1976.
- [54] LEVIS J. C., Endothelial damage and thrombocyte adhesion in pigeon atherosclerosis, *Science*, **196**: 1007-1009, 1977.
- [55] MAHLEY R. W., WEISGRABER K. H., Swine lipoproteins and atherosclerosis: changes in the plasma lipoproteins and apoproteins induced by cholesterol feeding, *Biochemistry*, **14**: 2817-2823, 1975.
- [56] MAHLEY R. W., INNERITY T. L., BROWN M. S., HO Y. K. GOLDSTEIN J. L., Cholesteryl ester synthesis in macrophages: stimulation by β -VLDL from cholesterol feed animals of several species, *J. Lipid. Res.*, **21**: 970-980, 1980.
- [57] MAHLEY R. W., Development of accelerated atherosclerosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **107**: 393-399, 1983.
- [58] MARTIN B. M., GIMBORNE M. A., UNANUE E. R., COTRAN R. S., Macrophage-derived growth factor stimulates vascular smooth muscle cell growth, *Fed. Proc.*, **39**: 1109, 1980.
- [59] MARTIN G. H., SPRAGUE C. A., Symposium on in vitro studies related to atherogenesis life stories of hiperplastoid cell lines from aorta and skin, *Exp. Mol. Pathol.*, **18**: 125-141, 1973.
- [60] MONCADA S., Biological importance of prostacyclin, *Br. J. Pharmac.*, **76**: 3-31, 1982.
- [61] MORRIS C. J., BRADBY G. V. M., WALTON K. W., Fibrous long spacing collagen in human atherosclerosis, *Atherosclerosis*, **31**: 345-354, 1978.
- [62] NORDØY A., Lipoproteins and the inhibitory effect of human endothelial cell on platelet function, *Circ. Res.*, **43**: 4-9, 1978.
- [63] OKUMA M., TAKAYAMA H., UCHINO H., Generation of prostacyclin-like substance and lipid peroxidation in vitamin E deficient rats, *Prostaglandins*, **19**: 527-536, 1980.
- [64] PAWLIKOWSKI T., *Podręcznik histologii*, PZWL, Warszawa 1981.
- [65] PEARSON T. A., DILLMAN J. M., SOLEZ K., HEPTINSTALL R. H., Clonal markers in the study of the origin and growth of human atherosclerotic lesions, *Circ. Res.*, **43**: 10-18, 1978.
- [66] PETERS T. J., de DUVE C., Lysosomes of the arterial wall. II. Subcellular fractionation of aortic cells from rabbits with experimental atheroma, *Exp. Mol. Pathol.* **20**: 228-256, 1974.
- [67] PETERSON M., DAY A. J., EISENBERG E., Ultrastructure, fatty acid content and metabolic activity of foam cells and other fractions separated from rabbit atherosclerotic lesions, *Exp. Mol. Pathol.*, **15**: 157-169, 1971.
- [68] PIETILÄ K., YLÄ-HERTTUALA S., RANTALA J., NIKKARI T., Characterization of cells cultured from advanced atherosclerotic lesion of the rabbit, *Med. Biol.*, **60**: 221-225, 1982.
- [69] PHILLIPS M. S., MCLEAN L. R., STOUT G. W., ROTHBLAT G. H., Mechanism of cholesterol efflux from cells, *Atherosclerosis*, **36**: 409-422, 1980.
- [70] ROBERTSON A. L., KHAIRALLAH A., Arterial endothelial permeability and vascular disease. The "Trap Door" effect, *Exp. Mol. Pathol.*, **18**: 241-260, 1973.
- [71] ROBINSON J., Effect of dietary fat and cholesterol on circulating lipids and aortic ultrastructure of squirrel monkeys, *Exp. Mol. Pathol.*, **15**: 281-304, 1971.
- [72] ROSS R., GLOMSET J. A., Atherosclerosis and arterial smooth muscle cell, *Science*, **180**: 1332-1339, 1973.
- [73] ROSS R., GLOMSET J. A., Pathogenesis of atherosclerosis, *N. Engl. J. Med.*, **295**: 369-377, 1976.

- [74] ROSS R., Platelets, smooth muscle cell proliferation and atherosclerosis, *Acta Med. Scand. (Suppl.)*, **642**: 49-54, 1980.
- [75] SAUNDERS R. N., Evaluation of platelet-inhibiting drugs in models of atherosclerosis, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**: 279-295, 1982.
- [76] SCHAFFNER T., TAYLOR K., BARTUCCI E. J., FISCHER-DZOGA K., BEESON J. K., GLAGOV S., WISSLER R. W., Arterial foam cells with a distinctive immunomorphologie and histochemical features of macrophages, *Am. J. Pathol.*, **100**: 57-80, 1980.
- [77] SCHWARTZ S. H., STERMAN M. B., BENDITT E. P., The aortic intima. II. Repair of the aortic lining after mechanical denudation, *Am. J. Pathol.*, **81**: 15-42, 1975.
- [78] SCHWARTZ S. H., Cellular proliferation in atherosclerosis and hypertension, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **173**: 1-13, 1983.
- [79] SINZINGER H., FEIGL W., SILBERBAUER K., Prostacyclin (PGI₂) generation by different types of human atherosclerotic lesions, *Exp. Mol. Pathol.*, **18**: 175-180, 1980.
- [80] STEINBERG D., Research related to underlying mechanisms in atherosclerosis, *Circulation*, **7**: 1559-1565, 1979.
- [81] SUZUKI K., OOKAWARA S., OONEDA G., Increased permeability of the arteries in hypertensive rats. An electron microscopic study, *Exp. Mol. Pathol.*, **15**: 198-208, 1971.
- [82] THOMAS W. A., FLORENTIN R. A., NAM S. C., REINER J. M., LEE K., Alterations in population dynamics of arterial smooth muscle cells during atherogenesis, *Exp. Mol. Pathol.*, **15**: 245-267, 1971.
- [83] THOMAS W. A., REINER J. M., Population dynamics of arterial smooth muscle cells, *Exp. Mol. Pathol.*, **24**: 360-374, 1976.
- [84] THYBERG J., PALMBERG L., NILSSON J., KSIAŻEK T., Phenotype modulation in primary cultures of arterial smooth muscle cells, *Differentiation*, **25**: 143-149, 1983.
- [85] VASILE E., Visualisation of the binding endocytosis and transcytosis of LDL in the arterial endothelium in situ, I. *Cell. Biol.*, **26**: 1677-1689, 1983.
- [86] VIRCHOW R., *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin* (Meindinger Sohn, Frankfurt-am-Mein, 1856) str. 458.
- [87] VOS J., AARNOUDSE M. W., DIJH F., LAMBERTS H. B., On the cellular origin and development of atheromatous plaques, *Virchows Archiv (Cell Pathol)*, **43**: 1-16, 1983.
- [88] WAERFIELD M. D., SCRACE G. T., WHITTLE N., STROBANT P., JOHNSSON A., WASTESON, A., WESTERMARK B., HELDIN C. H., HUANG J. S., DEUEL T. F., Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p²⁸sis of simian sarcoma virus, *Nature*, **304**: 35-39, 1983.

Otrzymano: 26 wrzesień 1984.

Przyjęto: 20 luty, 1985.

Adres: Zakład Histologii i Embriologii AM, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa.

ROLA MAKROFAGÓW, MONOCYTÓW I GRANULOCYTÓW W ZWALCZANIU NOWOTWORÓW

THE ROLE OF MACROPHAGES, MONOCYTES AND GRANULOCYTES IN THE OVERCOMING OF TUMORS

Tomasz SKÓRSKI

Zakład Cytofizjologii Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa,
Marymoncka 99

Streszczenie. Omówiono znaczenie monocytów, makrofagów i granulocytów w zwalczaniu komórek nowotworowych *in vitro* i *in vivo*. Przedstawiono sposoby aktywacji tych komórek, aby wykazywały aktywność antynowotworową oraz mechanizmy odpowiedzialne za zabijanie komórek nowotworowych. Opisano również inne funkcje antynowotworowe makrofagów: prezentację antygenów nowotworowych oraz produkcję monokin.

Summary. The influence of monocytes, macrophages and granulocytes on the *in vitro* and *in vivo* growth of tumor cells was presented. The ways of antitumor activation of these cells and the mechanisms responsible for tumor cell killing were also discussed. The other antitumor functions of macrophages as tumor antigens presentation and monokines production were described.

Monocyty i makrofagi są od wielu lat uznawane za ważne ogniwo w mechanizmie obronnym organizmu przeciwko obcym komórkom, w tym także nowotworowym. Natomiast granulocytom dopiero od niedawna przypisuje się pewne znaczenie w zwalczaniu nowotworów. Celem obecnej pracy jest podsumowanie wiadomości o pozytywnej roli monocytów, makrofagów i granulocytów w zwalczaniu choroby nowotworowej oraz przedstawienie najnowszych faktów z tej dziedziny.

MAKROFAGI I MONOCYTY

1. CYTOTOKSYCZNE I CYTOSTATYCZNE MAKROFAGI I MONOCYTY

Makrofagi i monocyty od osobników zdrowych, jak i z chorobą nowotworową zabijają komórki nowotworowe *in vitro* [14, 16, 20, 78, 82, 86, 117, 166, 178] oraz *in vivo* [31, 112, 154]. Wykonują tę funkcję poprzez

mechanizmy naturalnej cytotoksyczności komórkowej spontanicznej lub aktywowanej, cytotoksyczności „uzbrojonych” makrofagów, cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał oraz fagocytozy i immunofagocytozy.

1.1. Naturalne i indukowane cytotoksyczne makrofagi i monocyty

Makrofagi i monocyty zdolne są do wywierania naturalnego efektu cytotoksycznego, nie należy jednak mylić naturalnych cytotoksycznych makrofagów z komórkami NK [91].

Spoczynkowe makrofagi mogą wywierać nieswoisty efekt cytotoksyczny w stosunku do komórek nowotworowych [87, 113, 164, 169], w tym także przeciwko nieimmunogennym nowotworom [10]. Do wywierania naturalnego efektu cytotoksycznego zdolne są monocyty od zdrowych osobników [11, 81, 114, 164, 169], a także od osób z chorobą nowotworową [182]. Naturalne cytotoksyczne makrofagi i monocyty znajdowano w śledzionie, płucach, jamie otrzewnej, szpiku i w krwi obwodowej [89].

Przypuszcza się, że naturalne cytotoksyczne makrofagi, występujące u normalnych osobników, są rezultatem obecności niepatogennych bakterii i wirusów w przewodzie pokarmowym [140], tym bardziej że takie makrofagi nie występują u myszy hodowanych w jałowych warunkach (germ-free). Naturalna cytotoksyczność komórkowa makrofagów może być znacznie nasiloną przez zakażenie zwierząt wewnątrzkomórkowymi pasożytami, takimi jak *Toxoplasma gondii* czy *Besnoitia jellisoni* [75, 76, 79] lub bakteriami *Mycobacterium bovis* (BCG) [39, 47, 78, 127, 153], albo *Corynebacterium parvum* [21, 62, 97]. Również takie czynniki pochodzenia bakteryjnego, jak endotoksyna [8, 69, 81, 139, 151] i preparat streptokokowy OK-432 [152, 182] aktywują cytotoksyczne makrofagi. Taką własność mają też inne czynniki: poli I : C [139, 153, 171], kopolimer pyranu [149], siarczan dekstranu [153], glukan [153], produkty aktywacji dopełniacza [132], kompleksy antygen-przeciwciało [113] oraz „immunologiczny” RNA [8]. Wydaje się, że kluczową rolę w aktywacji cytotoksycznych makrofagów przez większość z wymienionych tu czynników odgrywa interferon (IFN) [13, 16, 58, 84, 164]. Makrofagi mogą być stymulowane zarówno przez interferon gamma (IFN- γ), beta (IFN- β), jak i alfa (IFN- α).

Cytotoksyczność przeciwnowotworowa makrofagów może być również indukowana limfokinami [17, 58, 102]. Wykorzystywano do tego celu aktywne limfokiny wolne lub zamknięte w liposomach [165]. Limfocyty mogą być stymulowane do wydzielania limfokin przez antygeny nowotworowe lub nienowotworowe [34, 140], albo przez mitogeny, np. konkanawalinę A [56, 94].

Dość dobrze poznaną limfokiną, która aktywuje makrofagi czyniąc

je toksycznymi przeciwko komórkom nowotworowym, jest czynnik aktywujący makrofagi (macrophage activating factor MAF) przez innych, zwany czynnikiem cytotoksyczności makrofagów (macrophage cytotoxicity factor MCF) [56, 76, 93, 94, 102, 110, 142, 165]. MAF jest produkowany przez pobudzone limfocyty T [128]. Inną limfokiną, która silnie pobudza makrofagi do cytotoksyczności przeciwko komórkom nowotworowym, jest IFN- γ [138].

Aktywacja makrofaga do tego, aby stał się cytotoksyczny dla komórek nowotworowych, przebiega w dwóch etapach [16, 127]. Limfokina MAF w początkowym okresie działa w niskim stężeniu przez dłuższy czas [129]. W późniejszym etapie konieczne jest wysokie stężenie limfokiny przy krótkim czasie jej działania. Niektórzy badacze uważają, że sam MAF nie może aktywować makrofagów do zabijania komórek nowotworowych, a tylko zwiększa wrażliwość makrofagów na inny czynnik, którym może być endotoksyna [102, 151, 171] lub endotoksyna i komórki nowotworowe [82]. Początkowy etap przygotowuje makrofagi do wydzielania czynnika cytolitycznego [82] i zwiększa ich zdolność do przyłączania komórek nowotworowych [143], natomiast drugi powoduje wydzielenie czynnika cytolitycznego [82].

MAF działa na makrofagi poprzez inne mechanizmy niż IFN- β [16]. Wykazano, że IFN- β nie może działać jako drugi sygnał w procesie aktywacji makrofaga, zjawisko to więc przebiega innymi drogami. Aktywność cytotoksyczna makrofagów po zadziałaniu MAF osiąga maksimum po 6–12 godz., a po 24 godz. spada do poziomu wyjściowego [15], natomiast po zadziałaniu IFN- β utrzymuje się znacznie dłużej [17].

Istnieją także doniesienia, że niektóre komórki nowotworowe mogą wydzielać czynnik bezpośrednio indukujący cytotoksyczność lub cytostaticzną makrofagów *in vitro* [40]. Czynnik ten jest niskocząsteczkowym peptydem (Mr 650–700), a cytotoksyczność przez niego indukowana nie jest specyficzna dla nowotworu, z którego pochodzi.

Naturalna i aktywowana cytotoksyczność makrofagów jest selektywna, ale nieswoista [76, 109, 113]. Takie makrofagi zabijają niespecyficznie przede wszystkim różne komórki nowotworowe lub transformowane wirusowo oraz w mniejszym stopniu proliferujące komórki prawidłowe. Nieproliferujące komórki prawidłowe nie są zabijane.

Wydaje się, że aktywowane makrofagi rozpoznają a następnie zabijają komórki, które mają zmienioną błonę komórkową w wyniku utraty własności „kontaktowego zahamowania” wzrostu [77].

1.2. Swoiście cytotoksyczne makrofagi i monocyty

Makrofagi wywierają także swoisty efekt cytotoksyczny w stosunku do komórek nowotworowych. Mogą one pochodzić od swoiście uczulonego dawcy [47, 179]. Swoistość ta jest uwarunkowana przez limfokinę o naz-

wie „czynnik swoiście uzbrajający makrofagi” (specific macrophage arming factor SMAF). SMAF jest produkowany przez swoiście uczulone limfocyty T po wtórnym kontakcie tych limfocytów z tym samym antygenem [48, 61]. SMAF prawdopodobnie umiejscowia się na powierzchni makrofaga. Tak „uzbrojone” makrofagi są cytotoksyczne wybiórczo w stosunku do komórek, które służyły do uczulenia limfocytów T i produkcji limfokiny [33, 34]. Należy dodać, że limfocyty produkujące SMAF izolowano także od myszy z rosnącym nowotworem [100, 178].

Monocyty [72, 81, 96, 126, 137] i makrofagi [81, 110, 146, 159, 166] mogą swoiście zabijać komórki nowotworowe poprzez cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ADCC). W tym przypadku swoistość uwarunkowana jest przez przeciwciała, a makrofag lub monocyt działa nieswoiście. Wykazano, że makrofagi biorące udział w cytotoksyczności komórkowej oraz w cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC) działają synergistycznie i mogą hamować wzrost nowotworu [110].

1.3. Mechanizmy efektu cytotoksycznego

W procesie cytotoksyczności komórkowej makrofagów wyodrębniono dwa niezależne od siebie zjawiska [69]: przyłączenie makrofaga do komórki nowotworowej oraz zabicie tej komórki. Wykazano, że do zabicia komórki nowotworowej niezbędny jest bezpośredni kontakt komórki efektorowej (makrofag) z komórką docelową (komórka nowotworowa) [4, 5, 116, 143, 150, 161], trwający 24–72 godz. [116, 169]. Na tym etapie makrofagi selektywnie lub swoiście łączą się z komórkami nowotworowymi [116], a następnie wydzielają substancje zdolne do zabicia komórki nowotworowej, zwane cytotoksynami [116, 119, 120]. Wykazano, że makrofagi mogą wydzielać cytotoksyny dopiero po kontakcie z komórką docelową [142].

Selektywność działania większości tych cytotoksyn zależy od ich wybiórczego przyłączania się do komórek nowotworowych [5, 147] lub działania tylko w najbliższym sąsiedztwie makrofaga, gdzie utrzymuje się odpowiednie stężenie cytotoksyny. Opisano kilka takich substancji. Jedną z nich jest tzw. czynnik cytolityczny (cytolytic factor CF) [7], którym miałyby być obojętna serynowa proteinaza [4–6, 147]. Czynnik ten jest wydzielany już po 30 min od zaistnienia kontaktu między makrofagem i komórką nowotworową. Jest on cytolityczny wtedy, gdy zostanie wydzielony do „przestrzeni kontaktu”, tzn. w miejscu, w którym makrofag bezpośrednio łączy się z komórką nowotworową [6]. Innymi czynnikami cytotoksycznymi są nadtlenek wodoru H_2O_2 i w mniejszym stopniu anion O_2^- [7, 17, 39, 123, 132, 133, 142]. Wykazano, że CF i H_2O_2 mogą działać synergistycznie w procesie cytolizy [7]. Spośród innych czynników

cytolitycznych wydzielanych przez makrofagi można wymienić: (a) wydzielany pod wpływem endotoksyny „czynnik powodujący martwicę nowotworu” (tumor necrosis factor TNF), który działa nieswoiście, ale wybiórczo w stosunku do komórek nowotworowych [118, 124], (b) argininazę [32] rozkładającą argininę — aminokwas niezbędny dla wzrostu komórek nowotworowych, (c) składnik C3a dopełniacza [54] oraz (d) prostaglandyny [60].

Wykazano, że makrofagi mogą bezpośrednio przenosić swoje lizosomy do cytoplazmy komórki nowotworowej, która zostaje zabita przez przeniesione w ten sposób hydrolazy lizosomowe makrofaga [19, 78].

Aktywowane makrofagi mogą także hamować syntezę DNA w komórkach nowotworowych bez zahamowania podziałów tych komórek [85]. W wyniku tego dochodzi do „błędnych podziałów”, tzn. komórki nowotworowe dzielą się bez podwajania ilości DNA, co prowadzi do ich śmierci.

Przypuszcza się, że mogą istnieć różne mechanizmy cytotoxyczności odpowiedzialne za niszczenie przez makrofagi i monocyty nie tylko różnych, ale nawet tych samych komórek nowotworowych [96].

Na podstawie zdjęć z mikroskopu elektronowego stwierdzono, że podczas zabijania komórki nowotworowej przez makrofag zachodzą następujące zjawiska [37]: kontakt → liza → fagocytoza zabitej komórki nowotworowej. Proces cytolityczny rozpoczyna się w momencie powstania bezpośredniego kontaktu między błonami komórkowymi makrofaga i komórki nowotworowej [23]. W miejscu bezpośredniego kontaktu makrofag zawiera pęcherzyki okryte oraz dołki opłaszczone klatryną [37]. Podczas samej lizy zaobserwowano następujące zmiany w komórce nowotworowej: utrata mikrokosmków — miejscowe „spuchnięcie” (swelling) powierzchni — rozpad polirybosomów — zwiększenie objętości całej komórki — tworzenie pęcherzyków i oddzielenie się ich od komórki — degeneracja jądra — wakuolizacja cytoplazmy — fagocytoza martwych fragmentów komórkowych przez makrofag.

1.4. Cytostatyczne makrofagi i monocyty

Jest wiele doniesień o tym, że makrofagi i monocyty mogą mieć również działanie cytostatyczne w stosunku do komórek nowotworowych [88, 97, 101, 144, 152, 175, 181]. Działanie cytostatyczne makrofagów jest niezależne od efektu cytolitycznego oraz jest nieselektywne, tzn. zarówno komórki prawidłowe, jak i nowotworowe są wrażliwe na ten efekt [88, 97]. Cytostatyczne makrofagi lub monocyty można indukować interferonem (IFN- γ lub IFN- β) [152, 164], OK-432 [152], *Corynebacterium parvum* [21, 136] oraz limfokinami (MAF) [164, 175].

1.5. Fagocytoza i immunofagocytoza

Makrofagi mogą fagocytować komórki nowotworowe [24, 25, 84], przy czym zwykle uważa się, że fagocytoza jest w większości przypadkowo inne [23, 24, 150]. Po sfagocytowaniu komórki nowotworowej przez makrofag [37, 78, 161]. Zaobserwowano jednak, że makrofagi mogą fagocytować żywe komórki nowotworowe i jednocześnie zabijać pozakomórkowo inne [23, 24, 150]. Po sfagocytowaniu komórki nowotworowej przez makrofag następuje uwolnienie enzymów lizosomowych do fagosomów, w których są martwe komórki nowotworowe lub ich fragmenty [24, 150]. Wykazano, że interferon [99], BCG [101] oraz lewamisol [104] zwiększają liczbę i aktywność makrofagów fagocytujących.

Podobnym do fagocytozy działaniem, które mogą wywierać makrofagi, jest immunofagocytoza komórek nowotworowych [38, 172]. Jest ona zależna od przeciwciał i/lub składnika C3b dopełniacza oraz od obecności odpowiednich receptorów na powierzchni makrofaga.

2. MONOKINY

Oprócz wywierania bezpośredniego efektu cytotoksycznego lub cytostatycznego na komórki nowotworowe makrofagi mogą wydzielać czynniki zwane monokinami, które biorą czynny udział w rozwoju odpowiedzi immunologicznej przeciwko nowotworom. Do monokin należą omówione już tu cytotoksyny makrofagowe oraz interleukina-1 (IL-1). IL-1, produkowana przez aktywowane makrofagi, wywiera bezpośredni efekt mitogenny na limfocyty B, a także stymuluje limfocyty T pomocnicze (T helper) do produkcji interleukiny-2 (IL-2) [1, 35, 53, 131, 160], pośrednio wpływając na funkcje zależne od IL-2. IL-1 działa chemotaktycznie na limfocyty B i T [130]. Wykazano, że makrofagi mogą stymulować lokalny i ogólny efekt antynowotworowy uczulonych limfocytów [177], prawdopodobnie poprzez wydzielanie czynnika niespecyficznie zwiększającego aktywność antynowotworową tych limfocytów [178]. Dzięki produkcji interferonu makrofagi odgrywają ważną rolę w aktywacji cytotoksycznych komórek NK [148].

3. PREZENTACJA ANTYGENÓW NOWOTWOROWYCH

Makrofagi mogą prezentować antygeny nowotworowe na swej powierzchni limfocytom T i w ten sposób przyczyniać się do indukcji odpowiedzi immunologicznej przeciwko nowotworowi [173]. Immunogenność antygenów jest uzależniona od ich prezentacji na powierzchni makrofaga razem z antygenami zgodności tkankowej, bowiem interakcja

między makrofagiem a limfocytym T wymaga precyzyjnego rozpoznania antygenów zgodności tkankowej przez limfocyt T [174].

Antygeny nowotworowe mogą być prezentowane limfocytom T także przez komórki dodatkowe (accessory cells), mające antygen Ia. Stwierdzono, że komórki dodatkowe, prezentujące antygeny nowotworów indukowanych wirusowo [65, 66] lub chemicznie [141], są niezbędne do indukcji cytotoksycznych limfocytów T.

4. UDZIAŁ MAKROFAGÓW I MONOCYTÓW W ZWALCZANIU NOWOTWORÓW IN VIVO

Wielu badaczy sygnalizowało udział makrofagów w hamowaniu wzrostu nowotworu in vivo [3, 19, 47, 51, 56, 79, 163]. Wykazywano wielokrotnie, że w nowotworach może znajdować się duża liczba makrofagów [31, 46, 71, 167, 176], które pochodzą z populacji monocytów krwi [44]. W nowotworach ludzkich mogą one stanowić 30 czy nawet 60% komórek guza [9, 108], a u szczurów i myszy do 50% [44]. W przypadku czerniaków zaobserwowano, że zawartość makrofagów w ognisku pierwotnym jest wielokrotnie większa niż w przerzutach płucnych [9].

Nagromadzenie makrofagów w miejscu rozwoju nowotworu jest ważnym zdarzeniem w specyficznym zabijaniu komórek nowotworowych in vivo [84] i w hamowaniu powstawania przerzutów [46]. Makrofagi mogą wcześniej naciekać guz nowotworowy [70, 125], a ich liczba jest wprost proporcjonalna do immunogenności komórek nowotworowych [9]. Gromadzenie się makrofagów w obrębie nowotworu jest wynikiem odpowiedzi immunologicznej gospodarza na antygeny nowotworowe, podobnej do reakcji nadwrażliwości typu późnego (delayed type hypersensitivity DTH) [9], która nie występuje w przypadku braku limfocytów T. Wykazano, że reakcja taka w miejscu wzrostu nowotworu może doprowadzić do jego zniszczenia [134] prawdopodobnie w wyniku interakcji między limfocytami T pomocniczymi (T helper) a makrofagami [135, 183]. Zaobserwowano bardzo duży wzrost liczby makrofagów w guzie nowotworowym podczas jego regresji [49, 50] lub zmniejszania się liczby przerzutów [45]. Zawartość procentowa makrofagów w tych nowotworach jest wielokrotnie większa w porównaniu z nowotworami rosnącymi progresywnie [154], a pacjenci, których guzy są nacieczone przez makrofagi mają lepsze rokowanie [12]. Może to być jednak zjawisko spowodowane obumieraniem komórek nowotworowych, a makrofagi byłyby zaangażowane jedynie w usuwanie martwych komórek. Stwierdzono również, że nowotwory dające szybko przerzuty zawierają zwykle mało makrofagów i odwrotnie, te, które nie dają lub dają późno przerzuty są najczęściej nacieczone przez dużą liczbę makrofagów [9, 45, 47, 88, 168].

Wzrost zawartości makrofagów w węzłach chłonnych towarzyszył białaczkom niedającym rozsiewu [22].

Na podstawie badań morfologicznych sugeruje się, że makrofagi mogą odgrywać dużą rolę *in vivo* w niszczeniu komórek nowotworowych [64]. Zaobserwowano po podaniu BCG do guza nowotworowego, że w rejonie podania zwiększa się liczba makrofagów [112] i następuje rozpad nowotworu. W miejscu regresji występuje bezpośrednia interakcja między komórkami nowotworowymi a makrofagami [161]. Po podaniu innego aktywatora makrofagów, kopolimeru pyranu, obserwowano nacieki histiocytarne guza nowotworowego, a makrofagi prawdopodobnie powodowały jego nekrozę [157, 162]. Aktywowane makrofagi mogą także hamować tworzenie się przerzutów [55, 162], prawdopodobnie poprzez zmniejszenie przechodzenia komórek nowotworowych z guza do naczyń krwionośnych [107]. W obrębie nowotworu znajdowano również makrofagi „uzbrojone” przez SMAF [72]. Zaobserwowano, że podawanie *in vivo* takich aktywatorów makrofagów, jak bakterie, pierwotniaki [46, 75] lub innych czynników biologicznych [36, 76, 80, 168], jest związane z większą odpornością gospodarza na rozwój nowotworu, a makrofagi od tych osobników są cytotoksyczne dla komórek nowotworowych *in vivo* i *in vitro*. Cytotoksyczne dla komórek nowotworowych makrofagi izolowano od osobników z nowotworami [20, 114, 182] oraz bezpośrednio z nowotworu [90, 155, 156, 179] ulegającego regresji. Wykazano, że makrofagi izolowane z takich nowotworów są bardziej cytotoksyczne dla komórek nowotworowych niż makrofagi z nowotworów rosnących progresywnie [121, 133]. Makrofagi z guza ulegającego regresji są aktywne również w tekście ADCC i immunofagocytozy [72, 91, 149, 172] oraz hamują wzrost nowotworu w teście Winna [52]. Komórki Kupfera i makrofagi śledzionowe mają zdolność do fagocytowania krążących komórek białaczkowych [25]. Makrofagi o własnościach cytolitycznych znajdowano także u myszy z nowotworem w stanie „uśpienia” (*dormant-state*) [149]. Stwierdzono również, że zniszczenie *in vivo* makrofagów za pomocą środków cytotoksycznych lub blokujących ich funkcje, takich jak surowica antymakrofagowa, karaginan czy cząstki krzemu, ułatwia rozwój nowotworów [87, 98, 111].

GRANULOCYTY

Neutrofile odgrywają istotną rolę w zwalczaniu niektórych nowotworów [42]. Są one cytotoksyczne dla komórek nowotworowych [26, 28, 59, 68, 133]. Mogą zwalczać komórki nowotworowe poprzez naturalny

efekt cytotoksyczny lub cytostatyczny [59, 106], cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał (ADCC) [59, 63, 68, 103, 159] lub fagocytozę [26]. Wykazano, że granulocyty wzięte od myszy z nowotworem są specyficznie cytotoksyczne dla komórek tego nowotworu [59], a neutrofile od pacjentów z nowotworem mają zwiększoną zdolność do fagocytozy i zabijania komórek nowotworowych [18]. Zauważono również, że mogą wcześniej naciekać guzy nowotworowe [70, 125] oraz napływać do płynu wysiękowego pacjentów z białaczką i tworzyć „rozetki” z komórkami nowotworowymi [2].

Również komórki tuczne i eozynofile naciekają wiele nowotworów ludzkich [67, 73] i zwierzęcych [30]. *In vitro* bazofile i eozynofile są cytotoksyczne dla komórek nowotworowych [42, 83]. Stwierdzono, że podczas reakcji immunologicznej odrzucania syngenicznego nowotworu bazofile były w ścisłym kontakcie z żywymi i martwymi komórkami nowotworowymi [43] i były zdegranulowane.

Kontakt granulocyta z komórką nowotworową jest niezbędny do zaistnienia efektu cytotoksycznego [41, 103], który przejawia się w ciągu 24 godz. lizą komórek nowotworowej. Mechanizm zabijania komórek nowotworowych przez granulocyty najprawdopodobniej wymaga tlenu [68, 180] i zależy od systemu mieloperoksydaza — H_2O_2 — halogenki ($-J$, $-Cl$) [26–29, 63, 73]. W wyniku współdziałania mieloperoksydazy i H_2O_2 , wydzielonych z granulocytów z pozakomórkowymi halogenkami, powstają wolne rodniki tlenowe, które niszczą komórki nowotworowe [26, 27, 29]. Proteinazy nie są bezpośrednio zaangażowane w zabijaniu komórek nowotworowych przez granulocyty [63].

PODSUMOWANIE

Powstanie nowotworu w organizmie wyzwała wiele mechanizmów obronnych, których zadaniem jest zniszczenie komórek nowotworowych. Jednym z tych mechanizmów jest układ monocytów — makrofagów i granulocytów. Komórki należące do tych populacji skutecznie „niszczą” komórki nowotworowe. Mogą działać na nie za pośrednictwem różnych mechanizmów efektorowych. Należy pamiętać jednak o tym, że makrofagi i monocyty mogą oddziaływać również niekorzystnie na układ immunologiczny i obniżać odporność przeciwnowotworową m. in. przez: ochronę samych komórek nowotworowych przed mechanizmami cytotoksycznymi [74] oraz supresję przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej [90, 95, 145].

LITERATURA

- [1] AARDEN L. A., Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors, *J. Immunol.*, **123**: 2928-2929, 1979.
- [2] ABELSON H. T., STOSSEL T. P., Neutrophil tumor cell rosettes in ascitic fluid of patient with lymphoma, *Lancet*, **3**: 1217, 1978.
- [3] ADAMS D. O., SYNDERMAN R., Do macrophages destroy nascent tumors? *J. Natl. Cancer Inst.*, **62**: 1341-1345, 1979.
- [4] ADAMS D. O., Effector mechanisms of cytolytically activated macrophages. I. Secretion of neutral proteases and effect of protease inhibitors, *J. Immunol.*, **124**: 286-292, 1980.
- [5] ADAMS D. O., KAO K.-J., Farb R., Pizzo S. V., Effector mechanisms of cytolytically activated macrophages. II. Secretion of a cytolytic factor by activated macrophages and its relationship to secreted neutral proteases, *J. Immunol.*, **124**: 293-300, 1980.
- [6] ADAMS D. O., MARINO P. A., Evidence for a multistep mechanism of cytotoxicity by BCG-activated macrophages: the interrelationship between the capacity for cytotoxicity, target binding, and secretion of cytotoxic factor, *J. Immunol.*, **126**: 981-987, 1981.
- [7] ADAMS D. O., JOHNSON W. J., FIORITO E., NATHAN C. F., Hydrogen peroxide and cytotoxic factor can interact synergistically in effecting cytotoxicity of neoplastic cells, *J. Immunol.*, **127**: 1973-1977, 1981.
- [8] ALEXANDER P., EVANS R., Endotoxins and double-stranded RNA render macrophages cytotoxic, *Nature*, **232**: 76-78, 1971.
- [9] ALEXANDER P., ECCLES S. A., GAUCI C. L. L., The significance of macrophages in human and experimental tumors, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **276**: 124-133, 1976.
- [10] BALDWIN R. W., Role of immunosurveillance against chemically induced rat tumors, *Transplant. Rev.*, **28**: 62-74, 1976.
- [11] BARADA R. A., KAY H. D., EMMONS R., DAVIS J. S. IV, HORWITZ D. A., Natural cytotoxicity of adherent cells from human blood: role of the Fc receptor, *J. Immunol.*, **125**: 865-870, 1980.
- [12] BERG J. W. Inflammation and prognosis in breast cancer: a search for host resistance, *Cancer*, **12**: 714-720, 1959.
- [13] BLASI E., HERBERMAN R. B., VAREGIO L., Requirement for protein synthesis for induction of macrophage tumoricidal activity by IFN α , and IFN β , but not by IFN γ . *J. Immunol.*, **132**: 3226-3228, 1984.
- [14] BLUMENTHAL E. J., ROBERTS W. R., VASIL A., TALMAGE D. W., Macrophage activation: dissociation of cytotoxic activity from Ia-A antigen expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **8**: 2031-2035, 1983.
- [15] BORASCHI D., MELTZER M. S., Defective tumoricidal capacity of macrophages from A/J mice. I. Characterisation of the macrophage cytotoxic defect after in vivo and in vitro activation stimuli, *J. Immunol.*, **122**: 1587-1591, 1979.
- [16] BORASCHI D., TAGLIABUE A., Interferon-induced enhancement of macrophage-mediated tumor cytotoxicity and its difference from activation by lymphokines, *Eur. J. Immunol.*, **11**: 110-114, 1981.
- [17] BORASCHI D., PASQUALETTO E., GHEZZI P., SALMONA M., BARTALINI M., BARBARULLI G., CENSINI S., SOLDATESCHI D., TAGLIBAUE A., Dissociation between macrophage tumoricidal capacity and suppressive acti-

- vity: analysis with macrophage-defective mouse strains, *J. Immunol.*, **131**: 1707-1713, 1983.
- [18] BRUCE L., HANCOCK B. W., RICHMOND J., Proceedings: Neutrophil function in human malignant disease, *J. Physiol.*, **259**: 48P-50P, 1976.
- [19] BUCANA C., HOYER L. C., HOBBS B., BREESMAN S., McDANIEL M., HANNA M. G., Morphological evidence for the translocation of lysosomal organelles from cytotoxic macrophages into the cytoplasm of tumor cells, *Cancer Res.*, **36**: 4444-4458, 1976.
- [20] CAMERON D. J., O'BRIEN P., Cytotoxicity of cancer patients macrophages for tumor cells, *Cancer*, **50**: 498-502, 1982.
- [21] CAMPBELL M. W., SHOLLEY M. M., MILLER G. A., Macrophage heterogeneity in tumor resistance: cytostatic and cytotoxic activity of *Corynebacterium parvum*-activated and proteose peptone-elicited rat macrophages against Moloney sarcoma tumor cells, *Cell. Immunol.*, **50**: 153-168, 1980.
- [22] CARTER R. L., GERSHON R. K., Studies on homotransplantable lymphomas in hamsters. I. Histologic responses in lymphoid tissues and their relationship to metastases, *Am. J. Pathol.*, **49**: 637-655, 1966.
- [23] CHAMBERS V. C., WEISER R. S., The ultrastructure of target cells and immune macrophages during their interaction in vitro, *Cancer Res.*, **29**: 301-317, 1969.
- [24] CHAMBERS V. C., WEISER R. S., The ultrastructure of sarcoma I cells and immune macrophages during their interaction in the peritoneal cavities of immune C57BL/6 mice, *Cancer Res.*, **32**: 413-419, 1972.
- [25] CHO Y., De BRUYN P. P., Destruction of circulating leukemia cells by phagocytosis in rats with myelogenous leukemia, *J. Natl. Cancer Inst.*, **60**: 185-195, 1978.
- [26] CLARK R. A., KLEBANOFF S. J., Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity: Role of the peroxidase system, *J. Exp. Med.*, **141**: 1442-1447, 1975.
- [27] CLARK R. A., KLEBANOFF S. J., EINSTEIN A. B., FEFER A., Peroxidase-H₂O₂-halide system: cytotoxic effect on mammalian tumor cells, *Blood*, **45**: 161, 1975.
- [28] CLARK R. A., KLEBANOFF S. J., Role of the myeloperoxidase-H₂O₂-halide system in concanavalin A-induced cell killing by neutrophils, *J. Immunol.*, **122**: 2605-2610, 1979.
- [29] CLARK R. A., SZOT S., The myeloperoxidase-hydrogen peroxidehalide system as effector of neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity, *J. Immunol.*, **126**: 1295-1301, 1981.
- [30] COMBS J. W., PURNELL D. M., Functional characteristics of mast cells associated with rat mammary tumors induced by 7, 12 dimethylbenz[*a*] anthracene, *J. Natl. Cancer Inst.*, **50**: 1003-1011, 1973.
- [31] CURRIE G. A., Immunological aspects of host resistance to the development and growth of cancer, *Biochem. Biophys. Acta*, **458**: 135-165, 1976.
- [32] CURRIE G. A., Activated macrophages kill tumor cells by releasing arginase, *Nature*, **273**: 758-760, 1978.
- [33] DEN OTTER W., DULLENS H. F. J., des WEGER R. A., Macrophages and antitumor reactions, *Cancer Immunol. Immunother.*, **16**: 67-71, 1983.
- [34] de WEGER R. A., PELS E., den OTTER W., The induction of lymphocytes with the capacity to render macrophages cytotoxic in an allogeneic murine system, *Immunology*, **47**: 541-550, 1982.
- [35] DIAMANTSTEIN T., OPPENHEIM J. J., UNANUE E. R., WOOD D. D.,

- HANDSHUMACHER R. E., ROSENSTREICH D. L., WAKSMAN B. H., Non-specific lymphocyte activating factors produced by macrophages, *Cell. Immunol.*, **46**: 422-425, 1979.
- [36] DiLUZIO N. R., McNAMEE R., BROWDER W. I., WILLIAMS D., Glucan inhibition of tumor growth and enhancement of survival in four syngeneic murine tumor models, *Cancer Treat. Rep.*, **62**: 1857-1866, 1978.
- [37] DINGEMANS K. P., PELS E., DEN OTTER W., Destruction of murine lymphoma cells by allogeneic immune peritoneal macrophages in vitro: an ultra-structure study, *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**: 67-69, 1981.
- [38] DINGEMANS K. P., PELS E., van DONGEN G., den OTTER W., Destruction of murine lymphoma cells by allogeneic peritoneal macrophages in vitro: influence of antiserum, *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**: 181, 192, 1983.
- [39] DiSTEFANO J. F., BECK G., ZUCKER S., Mechanism of BCG-activated macrophage-induced tumor cell cytotoxicity: evidence for both oxygen-dependent and independent mechanisms, *Int. Archs. Allergy appl. Immunol.*, **70**: 252-260, 1983.
- [40] DULLENS H. F. J., den OTTER W., A small-molecular-weight peptide from P815 mastocytoma cells induces macrophage cytotoxicity, *Immunopharmacology*, **3**: 241-251, 1981.
- [41] DVORAK A. M., CONNELL A. B., PROPPE K., DVORAK H. F., Immunologic rejection of mammary adenocarcinoma (TA3-St) in C57BL/6 mice: Participation of neutrophils and activated macrophages with fibrin formation, *J. Immunol.*, **120**: 1240-1248, 1978.
- [42] DVORAK A. M., GALLI S. J., GALLI A. S., MAMMOND E., CHURCHILL W. H., DVORAK H. F., Tumor-basophil interactions in vitro—a scanning and transmission electron microscopic study, *J. Immunol.*, **122**: 2447-2457, 1979.
- [43] DVORAK H. F., DVORAK A. M., CHURCHILL W. H., Immunologic rejection of diethylnitrosoamine-induced hepatomas in strain 2 guinea pigs: participation of basophilic leukocytes and macrophage aggregates, *J. Exp. Med.*, **137**: 751-775, 1973.
- [44] ECCLES S. A., ALEXANDER P., Sequestration of macrophages in growing tumors and its effect on the immunological capacity of the host, *Br. J. Cancer*, **30**: 42-49, 1974.
- [45] ECCLES S. A., ALEXANDER P., Macrophage content in tumours in relation to metastatic spread and host immune reaction, *Nature*, **250**: 667-669, 1974.
- [46] EVANS R., Macrophages in syngeneic animal tumors, *Transplantation*, **14**: 468-473, 1972.
- [47] EVANS R., ALEXANDER P., Mechanisms of immunologically specific killing of tumor cells by macrophages, *Nature*, **236**: 168-170, 1972.
- [48] EVANS R., GRANT C. K., COX H., Thymus-derived lymphocytes produce an immunologically specific macrophage arming factor, *J. Exp. Med.*, **136**: 1318-1322, 1972.
- [49] EVANS R., BOOTH C. G., SPENCER F., Lack of correlation between in vivo rejection of syngeneic fibrosarcomas and nonspecific macrophage cytotoxicity, *Br. J. Cancer*, **38**: 583-590, 1978.
- [50] EVANS R., LAWLER E. M., Macrophage content and immunogenicity of C57BL/6J and BALB/cByJ methylcholanthrene-induced sarcomas, *Int. J. Cancer*, **26**: 831-835, 1980.
- [51] EVANS R., EIDLEN D., Intratumor and peritoneal inflammatory responses in relation to tumor burden and age of mouse, *J. Reticuloendothel. Soc.*, **32**: 101-110, 1982.

- [52] EVANS R., Phenotypes associated with tumor rejection mediated by cyclophosphamide and syngeneic tumor-sensitized T lymphocytes: potential mechanisms of action, *Int. J. Cancer*, **33**: 381-388, 1984.
- [53] FARRAR W. L., MIZEL S. B., FARRAR J. J., Participation of lymphocyte-activating factor (interleukin 1) in the induction of cytotoxic T-cell responses, *J. Immunol.*, **124**: 1371-1377, 1980.
- [54] FERLUGA J., SCHORLEMMER H. U., BAPTISTA L. C., ALLISON A. C., Production of the complement cleavage product C3a by activated macrophages and its tumorolytic effects, *Clin. Exp. Immunol.*, **31**: 512-517, 1978.
- [55] FIDLER I. J., Inhibition of pulmonary metastasis by intravenous injection of specifically activated macrophages, *Cancer Res.*, **34**: 1074-1978, 1974.
- [56] FIDLER I. J., DARNELL J. H., BUDMEN M. B., Tumoricidal properties of mouse macrophages activated with mediators from rat lymphocytes stimulated with concanavalin A, *Cancer Res.*, **36**: 3608-1615, 1976.
- [57] FIDLER I. J., CCHROIT A. J., Synergism between lymphokines and muramyl dipeptide encapsulated in liposomes: in situ activation of macrophages and therapy of spontaneous cancer metastasis, *J. Immunol.*, **133**: 515-418, 1984.
- [58] FISCHER D. G., GOLIGHTLY M. G., KOREN H. S., Potentiation of the cytolytic activity of peripheral blood monocytes by lymphokines and interferon, *J. Immunol.*, **130**: 1220-1225, 1982.
- [59] FISCHER B., SAFFER E. A., Tumor cell cytotoxicity by granulocytes from peripheral blood of tumor-bearing mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, **60**: 687-691, 1978.
- [60] FRIEDMAN S. A., REMOLD-O'DONNELL E., PIESSENS W. F., Enhanced PGE production by MAF-treated peritoneal exsudate macrophages, *Cell. Immunol.*, **42**: 213-218, 1979.
- [61] GALLILY R., ELIAHU H., Mechanism and specificity of macrophage-mediated cytotoxicity, *Cell. Immunol.*, **25**: 245-255, 1976.
- [62] GHAFFAR A., CULLEN R. T., DUNBAR N., WOODRUFF M. F. A., Antitumor effect in vitro of lymphocytes and macrophages from mice treated with *Corynebacterium parvum*, *Br. J. Cancer*, **29**: 199-205, 1974.
- [63] GERRARD T. L., COHEN D., KAPLAN A. M., Human neutrophil-mediated cytotoxicity to tumor cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**: 483-488, 1981.
- [64] GERSHON R. K., CARTER R. L., LANE N. J., Studies on homotransplantable lymphoma in hamsters. IV. Observations on macrophages in expression of tumor immunity, *Am. J. Pathol.*, **51**: 1111-1133, 1967.
- [65] GLASER M., Macrophage requirement for in vitro generation of specific, secondary cell-mediated cytotoxicity against SV40-induced tumor-associated antigens in mice, *Eur. J. Immunol.*, **10**: 342-346, 1980.
- [66] GOMARD E., WYBIER-FRANQUI J., LEVY J. P., Accessory cells in the in vitro generation of type C viruses specific T killer lymphocytes. I. Role of macrophages in primary anti-EMR reaction, *J. Immunol.*, **126**: 891-896, 1981.
- [67] GRAHAM R. M., GRAHAM J. B., Mast cells and cancer of the cervix, *Surg. Gynecol. Obstet.*, **123**: 3-9, 1966.
- [68] HAFEMAN D. G., LUCAS Z. J., Polymorphonuclear leukocyte-mediated, antibody-dependent, cellular cytotoxicity against tumor cells: dependence on oxygen and the respiratory burst, *J. Immunol.*, **123**: 55-62, 1979.
- [69] HAMILTON T. A., FISHMAN M., Characterisation of the recognition of target cells sensitive or resistant to cytolysis by activated rat peritoneal macrophages, *J. Immunol.*, **127**: 1702-1706, 1981.
- [70] HANNA M. G., BUCANA D. C., POLLACK V. A., Immunologic stimulation in

- situ: the acute and chronic inflammatory responses in the induction of tumor immunity, *Contemp. Top. Immunobiol.*, **10**: 267-296, 1980.
- [71] HASKILL J. S., PROCTOR J. W., YAMAMURA Y., Host responses within solid tumors. I. Monocytic effector cells within rat sarcomas, *J. Natl. Cancer Res.*, **54**: 387-393, 1975.
- [72] HASKILL J. S., ADCC effector cells in a murine adenocarcinoma. I. Evidence for blood-borne bone marrow-derived monocytes, *Int. J. Cancer*, **20**: 432-440, 1977.
- [73] HENDERSON W. R., CHI E. Y., JONG E. C., KLEBANOFF S. J., Mast cell-mediated tumor-cell cytotoxicity: role of the peroxidase system, *J. Exp. Med.*, **153**: 520-533, 1981.
- [74] HERSEY P., MACLENNAN I. C. M., Macrophage dependent protection of tumour cells. *Immunology*, **24**: 385-393, 1973.
- [75] HIBBS J. R., LAMBERT L. H., REMINGTON J. S., Resistance to murine tumors conferred by chronic infection with intracellular protozoa, *Toxoplasma gondii*, and *Besnoitia jellisoni*, *J. Infect. Diseases*, **124**: 587-592, 1971.
- [76] HIBBS J. B., LAMBERT L. H., REMINGTON J. S., Possible role of macrophage mediated nonspecific cytotoxicity in tumor resistance, *Nature*, **235**: 48-50, 1972.
- [77] HIBBS J. B., Macrophage nonimmunologic recognition: target cell factors related to contact inhibition, *Science*, **180**: 868-870, 1973.
- [78] HIBBS J. B., Heterocytolysis by macrophages activated by *Bacillus Calmette-Guerin*: lysosome exocytosis into tumor cells, *Science*, **184**: 468-471, 1974.
- [79] HIBBS J. B., TAINTOR R. R., CHAPMAN H. A., WINBERG J. B., Macrophage tumor killing: Influence of the local environment, *Science*, **197**: 279-282, 1977.
- [80] HIRSCH M. F., BLOCK P. S., WOOD M. I., MANACO A. P., Effects of pyran copolymer on oncogenic virus infections in immunosuppressed hosts, *J. Immunol.*, **108**: 1312-1318, 1972.
- [81] HORWITZ D. A., KINHT N., TEMPLE A., ALLISON A. C., Spontaneous and induced cytotoxic properties of human adherent monoclear cells: killing of non-sensitized and antibody-coated non-erythroid cells, *Immunology*, **36**: 221-228, 1979.
- [82] JOHNSON W. J., MARINO P. A., SCHREIBER R. D., ADAMS D. O., Sequential activation of murine monoclear phagocytes for tumor cytotoxicity: differential expression of markers by macrophages in the several stages of development, *J. Immunol.*, **131**: 1038-1043, 1983.
- [83] JONG E. C., KLEBANOFF S. J., Eosinophil-mediated mammalian tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system, *J. Immunol.*, **124**: 1949-1953, 1980.
- [84] JOURNEY L. J., AMOS D. B., An electron microscope study of histiocyte response to ascites tumor homografts, *Cancer Res.*, **22**: 998-1001, 1962.
- [85] KAPLAN A. M., BROWN J., COLLINS J. M., MORAHAN P. S., SNODGRASS M. J., Mechanisms of macrophage-mediated tumor cell cytotoxicity, *J. Immunol.*, **121**: 1781-1798, 1978.
- [86] KAPLAN G., In vitro differentiation of human monocytes. Monocytes cultured on glass are cytotoxic to tumor cells but monocytes cultured on collagen are not, *J. Exp. Med.*, **157**: 2061-2072, 1983.
- [87] KELLER R., Promotion of tumor growth in vivo by anti-macrophage agents, *J. Natl. Cancer Inst.*, **57**: 1355-1361, 1976.
- [88] KELLER R., Susceptibility of normal and transformed cell lines to cytostatic

- and cytotoxic effects exerted by macrophages. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **56**: 369-374, 1976.
- [89] KELLER R., Macrophage-mediated natural cytotoxicity against various target cells in vitro. Macrophages from diverse anatomic sites and from different strains of rats and mice, *Br. J. Cancer*, **37**: 732-741, 1978.
- [90] KENNARD J., ZOLLA-PAZNER S., Origin and function of suppressor macrophages in myeloma. *J. Immunol.*, **124**: 268-273, 1980.
- [91] KEY M., HASKILL S., Macrophage-mediated, antibody-dependent destruction of tumor cells in DBA/2 mice: in vitro identification of an in situ mechanism, *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**: 103-110, 1981.
- [92] KITAGAWA S., TAKAKU F., SAKAMOTO S., Evidence that proteases are involved in superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes, *J. Clin. Invest.*, **65**: 74-81, 1980.
- [93] KLEJNERMAN E. S., HERBERMAN R. B., Tumoricidal activity of human monocytes: evidence for cytolytic function distinct from that of NK cells, *J. Immunol.*, **133**: 4-6, 1984.
- [94] KNIEP E. M., DOMZIG W., LOCHMANN-MATTHES M.-L., KICKHOFEN B., Partial purification and chemical characterization of macrophage cytotoxicity factor (MCF, MAF) and its separation from migration inhibitory factor (MIF), *J. Immunol.*, **127**: 417-422, 1981.
- [95] KOLB J. P., ARRIAN S., ZOLLA-PAZNER S., Suppression of the humoral immune response by plasmacytomas: mediation by adherent mononuclear cells. *J. Immunol.*, **118**: 702-707, 1977.
- [96] KOLLER C. A., LoBUGLIO A. F., Monocyte-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: the role of metabolic burst, *Blood*, **58**: 292-299, 1981.
- [97] KRAHENBUHL J. L., LAMBERT L. H., REMINGTON J. S., The effects of activated macrophages on tumor target cells: escape from cytostasis, *Cell. Immunol.*, **25**: 279-293, 1976.
- [98] KREIDER J. W., BARLETT G. L., DeFREITAS E., Abrogation of tumor rejection by trypan blue, *Cancer Res.*, **38**: 1036-1040, 1978.
- [99] KRIM M., Towards tumor therapy with interferons, part I. Interferons: production and properties, *Blood*, **55**: 711-721, 1980.
- [100] KRIPKE M. L., BUDMEN M. B., FIDLER I. J., Production of specific macrophage activating factor by lymphocytes from tumor-bearing mice, *Cell. Immunol.*, **30**: 341-352, 1977.
- [101] KURLAND J. I., TRAGANOS F., DARZYNKIEWICZ Z., MOORE M. A. S., Macrophage-mediated cytostasis of neoplastic hemopoietic cells: cytofluorometric analysis of the reversible cell cycle block, *Cell. Immunol.*, **36**: 318-330, 1978.
- [102] LEONARD E. J., RUCO L. P., MALTZER M. S., Characterisation of macrophage activation factor, a lymphokine that causes macrophages to become cytotoxic for tumor cells, *Cell. Immunol.*, **41**: 347-357, 1978.
- [103] LEVY P. C., SHAW C. M., LoBUGLIO A. F., Human monocyte, lymphocyte and granulocyte antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity toward tumor cells, I. General characteristics of cytotoxicity. *J. Immunol.*, **123**: 594-599, 1979.
- [104] LEWINSKI U. H., MAVLIGIT G. H., HERSH E. M., Cellular immune modulation after a single high dose of levamisole in patients with carcinoma, *Cancer*, **46**: 2185-2194, 1980.
- [105] LI J., MANSFIELD J. M., WALLACE J. H., Tumorstatic effects of nonim-

- mune BALB/c peritoneal macrophages on syngeneic lymphoma cells in vitro, *Oncology*, **34**: 245-250, 1977.
- [106] LICHTENSTEIN A. K., KAHLE J., BEREK J., ZIGHELBOIM J., Successful immunotherapy with intraperitoneal *Corynebacterium parvum* in a murine ovarian cancer model is associated with the recruitment of tumor-lytic neutrophils into the peritoneal cavity, *J. Immunol.*, **133**: 519-526, 1984.
- [107] LIOTTA L. A., GATTOZZI C., KLEINERMAN J., SAIDEL G., Reduction of tumour cell entry into vessels by BCG-activated macrophages, *Br. J. Cancer*, **36**: 639-641, 1977.
- [108] LIPIŃSKA R., SZYMAŃSKA D., KŁOSIŃSKA-KITA E., ROSZKOWSKI W., Nacieki makrofagów w raku płuc, *Immunol. Polska*, **VII**: 273-279, 1982.
- [109] LOHMAN-MATTHES M. L., KOLB B., MEERPOHL H. G., Susceptibility of malignant and normal target cells to the cytotoxic action of bone marrow macrophages activated in vitro with the macrophage cytotoxicity factor, *Cell. Immunol.*, **41**: 231-239, 1978.
- [110] LOHMANN-MATTHES M.-L., LANG H., SUN D., Macrophages as cytotoxic effector cells, *Immunobiol.*, **161**: 401-407, 1982.
- [111] LOTZOVA E., RICHIE E. R., Promotion of incidence of adenovirus type 12 transplantable tumors by carrageenan, a specific antimacrophage agent, *J. Natl. Cancer Inst.*, **58**: 1171-1172, 1977.
- [112] MANSELL P. W. A., ICHINOSE H., REED J. R., KREMENTZ E. T., McNAMEE R., DiLUZIO N. R., Macrophage-mediated destruction of human malignant cells in vivo, *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**: 571-580, 1975.
- [113] MANTOVANI A., TAGLIBAUE A., DEAN J., JERRELLS T. R., HERBERMAN R. B., Cytolytic activity of circulating human monocytes on transformed and untransformed human fibroblast, *Int. J. Cancer*, **23**: 28-31, 1979.
- [114] MANTOVANI A., POLENTARUTTI N., GIUSEPPE P., SHAVIT Z. Z., VECCHI A., BOLIS G., MANGIONI C., Cytotoxicity on tumor cells of peripheral blood monocytes and tumor-associated macrophages in patients with ascites ovarian tumors, *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**: 1307-1315, 1980.
- [115] MANTOVANI B., RABINOVITCH M., NUSSENZWEIG V., Phagocytosis of immune complexes by macrophages: different roles of the macrophage receptor for complement (C3) and for immunoglobulin (IgG), *J. Exp. Med.*, **135**: 780-792, 1972.
- [116] MARINO P. A., ADAMS D. O., Interaction of Bacillus-Calmette Guerin activated macrophages and neoplastic cells in vitro, I. Condition of binding and its selectivity, *Cell. Immunol.*, **54**: 11-25, 1980.
- [117] MARINO P. A., ADAMS D. O., Interaction of Bacillus Calmette-Guerin activated macrophages and neoplastic cells in vitro. II. Relationship of selective binding to cytotoxicity, *Cell. Immunol.*, **54**: 26-35, 1980.
- [118] MATTHEWS N., Tumour necrosis factor from the rabbit. V. Synthesis in vitro by mononuclear phagocytes from various tissues of normal and BCG-injected rabbits, *Br. J. Cancers*, **44**: 418-424, 1981.
- [119] Matthews N., Effect on human monocyte killing of tumour cells of antibody raised against an extracellular monocyte cytotoxin, *Immunology*, **48**: 321, 327, 1983.
- [120] MATTHEWS N., Anti-tumour cytotoxin from macrophages: no correlation between cytotoxin adsorption by tumor cell lines and their cytotoxin susceptibility, *Immunology*, **53**: 547-543, 1984.
- [121] MATZKU S., OBERNEDER H.-P., KELLER R., ZOOLER M., Natural cyto-

- toxicity in lymphatic metastasis. I. In vitro studies using the rat tumor BSp73 and its variants, *Cancer Immunol. Immunother.*, **17**: 100–105, 1984.
- [122] MATZKU S., Natural cytotoxicity in lymphatic metastasis. II. In vivo studies with BSp73 variants differing in metastatic capacity, *Cancer Immunol. Immunother.*, **17**: 106–111, 1984.
- [123] MAVIER P., EDINGTON T. S., Human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. I. Demonstration of an oxygen-dependent myeloperoxidase-independent mechanism, *J. Immunol.*, **132**: 1980–1986, 1984.
- [124] MÄNNEL D. N., MOORE R. N., MERGENHAGEN S. E., Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect. Immunol.*, **30**: 523–530, 1980.
- [125] McCABE R. P., ONESON R., EVANS C. H., Mechanism of natural delayed-type hypersensitivity reactions to tumor cells in nonimmunized syngeneic guinea pigs, *Cancer Immunol. Immunother.*, **17**: 76–82, 1984.
- [126] McCARLEY D. L., SHAH V. O., WEINER R. S., Purified human monocyte subsets as effector cells in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), *J. Immunol.*, **131**: 1780–1783, 1983.
- [127] MELTZER M. S., RUCO L. P., BORASCHI D., NACY C. A., Macrophage activation for tumor cytotoxicity: analysis of intermediary reactions, *J. Reticuloendothel. Soc.*, **26**: 403–415, 1979.
- [128] MELTZER M. S., BENJAMIN W. R., FARRAR J. J., Macrophage activation for tumor cytotoxicity: induction of macrophage tumoricidal activity by lymphokines from EL-4, a continuous T cell line, *J. Immunol.*, **129**: 2802–2807, 1982.
- [129] MELTZER M. S., Macrophage activation for tumor cytotoxicity: characterization of priming and trigger signals during lymphokine activation, *J. Immunol.*, **127**: 179–183, 1981.
- [130] MIOSSEC P., YU C.-L., ZIFF M., Lymphocyte chemotactic activity of human interleukin-1, *J. Immunol.*, **133**: 2007–2011, 1984.
- [131] MIZEL S. B., Studies on the purification and structure-function relationships of murine lymphocyte-activating factor (interleukin 1), *Mol. Immunol.*, **17**: 571–577, 1980.
- [132] MYTAR B., ZEMBALA M., URACZ W., CZUPRYNA A., Cytostatic activity on tumour cells of monocytes from patients with gastrointestinal cancer, *Cancer Immunol. Immunother.*, **13**: 190–193, 1982.
- [133] NATHAN C. F., SILVERSTEIN S. C., BRUNKNER L. H., COHN Z. A., Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity, *J. Exp. Med.*, **149**: 100–113, 1979.
- [134] NELSON M., NELSON D. S., Macrophages and resistance to tumors. I. Inhibition of delayed-type hypersensitivity reactions by tumor cells and soluble products affecting macrophages, *Immunology*, **34**: 277–290, 1978.
- [135] NELSON M., NELSON D. S., MCKENZIE I. F. C., BLANDEN R. V., Thy and Ly markers on lymphocytes initiating tumor rejection, *Cell. Immunol.*, **60**: 34–42, 1981.
- [136] OLLIVOTTO M., BOMFORD R., In vitro inhibition of tumor cell growth and DNA synthesis by peritoneal and lung macrophages from mice injected with *Corynebacterium parvum*, *Int. J. Cancer*, **13**: 478–488, 1974.
- [137] OHLANDER C., PERLMANN P., Role of IgM in human monocyte-mediated target cell destruction in vitro, *Scand. J. Immunol.*, **15**: 363–370, 1982.

- [138] PACE J. L., RUSSEL S. W., SCHREIBER R. D., ALTMAN A., KATZ D., H., Macrophage activation: priming activity from a T-cell hybridoma is attributable to interferon- γ , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 3782-2786, 1983.
- [139] PARR I., WHELLER E., ALEXANDER P., Similarities of the antitumor actions of endotoxin, lipid A, and double stranded RNA, *Br. J. Cancer*, **27**: 370-389, 1973.
- [140] PELS E., DEN OTTER W., Natural cytotoxic macrophages in the peritoneal cavity of mice, *Br. J. Cancer*, **40**: 856-861, 1979.
- [141] PERRY L. L., DORF M. E., BENACERRAF B., GREEN M. I., Regulation of immune response to tumor antigen: interference with syngeneic tumor immunity by anti-Ia alloantisera, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 920-924, 1979.
- [142] PHILIPPEAUX M.-M., MAUEL J., Extracellular cytolysis by activated macrophages: studies with macrophages on permeable membranes, *Immunobiol.*, **167**: 301-317, 1984.
- [143] PIESENS W. F., Increased binding of tumor cells by macrophages activated in vitro with lymphocyte mediators, *Cell. Immunol.*, **35**: 303-317, 1978.
- [144] PUCETTI P., HOLDEN H. T., Cytolytic and cytostatic anti-tumor activities of macrophages from mice injected with murine sarcoma virus. *Int. J. Cancer*, **23**: 123-133, 1979.
- [145] QUAN P. C., BURTIN P., Demonstration of nonspecific suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients. *Cancer Res.*, **38**: 288-296, 1978.
- [146] RALPH P., WILLIAMS N., NAKOINZ I., JACKSON H., WATSON J. D., Distinct signals for antibody-dependent and non-specific killing of tumor targets mediated by macrophages, *J. Immunol.*, **129**: 427-432, 1982.
- [147] REIDARSON T. H., GRANGER G. A., KLOSTERGAARD J., Inducible macrophage cytotoxins. II. Tumor lysis mechanisms involving target cell-binding proteases, *J. Natl. Cancer Inst.*, **69**: 889-894, 1982.
- [148] REYNOLDS C. W., BRUNDA M. J., HOLDEN H. T., HERBERMAN R. B., Role of macrophages in vitro augmentation of rat, mouse and human natural killer activities, *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**: 837-842, 1981.
- [149] ROBINSON M. K., WHEELCOK E. F., Identification of macrophage mediated cytolytic activity as a tumor suppressive mechanism during maintenance of the L5178Y-tumor dormant state in DBA/2 mice, *J. Immunol.*, **126**: 673-679, 1981.
- [150] ROOS E., DINGEMANS K. P., van de PAVERT I. V., WEERMAN M. A., Mammary-carcinoma cells in mouse liver: infiltration of liver tissue and interaction with Kupffer cells, *Br. J. Cancer*, **38**: 88-99, 1978.
- [151] RUCO L. P., MELTZER M. S., Macrophage activation from tumors cytotoxicity: development of macrophage cytotoxic activity requires completion of a sequence of short-lived intermediary reactions, *J. Immunol.*, **121**: 2035-2042, 1978.
- [152] SAITO M., NANJO M., AONUMA E., NODA T., NAKADATE I., EBINA T., ISHIDA N., Activated macrophages are responsible for the tumor-inhibitory effect in mice receiving intravenous injection of OK-432, *Int. J. Cancer*, **33**: 271-276, 1984.
- [153] SCHULTZ R. M., PAPPAMATHEAKIS J. D., LUETZELER J., CHIRUGOS M. A., Association of macrophage activation with antitumor activity by synthetic and biological agents, *Cancer Res.*, **37**: 3338-3343, 1977.
- [154] RUSSEL S. W., DOE W. F., COCHRANE C. G., Number of macrophages and distribution of mitotic activity in regressing and progressing Moloney sarcomas, *J. Immunol.*, **116**: 164-166, 1976.

- [155] RUSSEL S. W., McINTOSH A. T., Macrophages isolated from regressing Moloney sarcomas are more cytotoxic than those recovered from progressing sarcomas, *Nature*, **268**: 70-71, 1977.
- [156] RUSDEL S. W., GILLESPIE G. Y., McINTOSH A. T., Inflammatory cells in solid murine neoplasms. III. Cytotoxicity mediated regressing Moloney sarcomas, *J. Immunol.*, **118**: 1574-1579, 1979.
- [157] SCHULTZ R. M., PAPAMATHEAKIS J. D., LUETZELER J., RUIZ P., CHIRIGOS M. A., Macrophage involvement in the protective effect of pyran copolymer against the Madison lung carcinoma (M109), *Cancer Res.*, **37**: 358-364, 1977.
- [158] SCHULTZ R. M., PAVILIDIS N. A., CHIRIGOS M. A., Macrophage involvement in the antitumor activity of *Brucella abortus* ether extracts against experimental lung carcinoma metastases, *Cancer Res.*, **38**: 3427-3431, 1978.
- [159] SHIN H. S., HAYDEN M., LANGLEY S., KALISS N., SMITH M. R., Antibody-mediated suppression of grafted lymphoma. III. Evaluation of the role of thymic function, non-thymus-derived lymphocytes, macrophages, platelets, and human polymorphonuclear leukocytes in syngeneic and allogeneic hosts, *J. Immunol.*, **114**: 1255-1263, 1975.
- [160] SMITH K. A., GILBRIDE K. J., FAVATA M. F., Lymphocyte activating factor promotes T-cell growth factor production by cloned murine lymphoma cells, *Nature*, **287**: 853-855, 1980.
- [161] SNODGRASS M. J., HANNA H. G., Ultrastructural studies of histiocyte-tumor cell interactions during tumor regression after intralesional injection of *Mycobacterium bovis*, *Cancer Res.*, **33**: 701-716, 1973.
- [162] SNODGRASS M. J., MORAHAN P. S., KAPLAN A. M., Histopathology of the host response to Lewis lung carcinoma: modulation by pyran, *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**: 455-462, 1975.
- [163] SNYDERMAN R., PIKE M. C., An inhibition of macrophage chemotaxis produced by neoplasms, *Science*, **192**: 370-372, 1976.
- [164] SOLDATESCHI E., CENSINI S., de GORI V., ANTONI G., TAGLIABUE A., BORASCHI D., Macrophage antitumor activity in vitro. Comparative analysis of cytolytic, cytostatic, and cytotoxic activities of mouse macrophages and human monocytes, *Immunobiol.*, **166**: 251-262, 1984.
- [165] SONE S., POSTE G., FIDLER I. J., Rat alveolar macrophages are susceptible to free and liposome-encapsulated lymphokines, *J. Immunol.*, **124**: 2197-2202, 1980.
- [166] STEPLEWSKI Z., LUBECK M. D., KOPROWSKI H., Human macrophages armed with murine immunoglobulin G2a antibodies to tumors destroy human cancer cells, *Science*, **221**: 865-867, 1983.
- [167] SVENNEVIG J. L., LUVIK M., SVAAR H., Isolation and characterisation of lymphocytes and macrophages from solid, malignant human tumours, *Int. J. Cancer*, **23**: 626-631, 1979.
- [168] SZYMAŃSKA D., Ocena powiązań między typem raka oskrzela a obecnością nacieków komórkowych i wokół jego ognisk, *Patologia Polska*, **32**: 373-385, 1981.
- [169] TAGLIABUE A., MANTOVANI A., KILGALLEN M., HERBERMAN R. B., McCOY J. L., Natural cytotoxicity of mouse monocytes and macrophages, *J. Immunol.*, **122**: 2363-2370, 1979.
- [170] TANIYAMA T., TOKUNAGA T., Monoclonal antibodies directed against mouse macrophages in different stages of activation for tumor cytotoxicity, *J. Immunol.*, **131**: 1032-1037, 1983.

- [171] TARAMELLI D., VARESIO L., Activation of murine macrophages. I. Different pattern of activation by poly I:C than by lymphokine or LPS, *J. Immunol.*, **127**: 58-63, 1981.
- [172] THE T. H., EIBERGEN R., LAMBERTS H. B., Immune phagocytosis in vivo of human malignant melanoma cells, *Acta Med. Scand.*, **192**: 141-144, 1972.
- [173] TREVES A. J., In vitro induction of cell-mediated immunity against tumor cells by antigen-fed macrophages, *Immunol. Rev.*, **40**: 205-226, 1978.
- [174] TZEHOVAL E., de BAETSELIER P., FELDMAN M., SEGAL S., The peritoneal antigen-presenting macrophage: control and immunogenic properties of distinct subpopulations, *Eur. J. Immunol.*, **11**: 323-328, 1981.
- [175] INSGAARD G., HAMMERSTRM J., LAMVIK J., Dissociation between tumor cell cytostatic and immunosuppressive capacity of human monocytes activated with lymphokines, *Acta Pathol. Microbiol., Scand. (C)*, **90**: 73-79, 1982.
- [176] van LOVEREN H., den OTTER W., Macrophages in solid tumors. I. X Immunologically specific effector cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**: 1057-1060, 1974.
- [177] van LOVEREN H., de GROOT J. W., KOTEN J. W., PIERSMA A. H., de WEGER R. A., den OTTER W., A macrophage factor enhancing the systemic antitumour effect of T lymphocytes, *Immunobiology*, **166**: 118-130, 1984.
- [179] VOSE B. M., Cytotoxicity of adherent cells associated with some human tumours and lung tissues, *Cancer Immunol. Immunother.*, **5**: 173-179, 1978.
- [180] WEISS S. J., LOBUGLIO A. F., An oxygen-dependent mechanism of neutrophil-mediated cytotoxicity, *Blood*, **55**: 1020-1024, 1980.
- [181] YANAGAWA E., Study on the immunological reactivity of cancer patients. I. Cytostatic activity of peripheral blood monocytes against allogeneic cultured tumor cells in cancer patients, *Jpn. J. Surg. Soc.*, **83**: 27-33, 1982.
- [182] YANAGAWA E., UCHIDA A., KOKOSCHKA E. M., MICKSCHE M., Natural cytotoxicity of lymphocytes and monocytes and its augmentation by OK432 in melanoma patients, *Cancer Immunol. Immunother.*, **16**: 131-136, 1984.
- [183] ZBAR B., WEPSIC H. T., RAPP H. J., STEWART L. C., BORSOS T., Two-step mechanism of tumor graft rejection in syngeneic guinea pigs, *J. Natl. Cancer Inst.*, **44**: 701-708, 1970.

Otrzymano: 2 lutego 1985.

Przyjęte: 23 kwietnia 1985.

Adres: Zakład Cytofizjologii CMKP, ul. Marymoncka 99/103, 01-813 Warszawa.

STRUKTURA I SUBULTRASTRUKTURA CHLOROPLASTÓW GRANOWYCH

THE STRUCTURE AND SUBULTRASTRUCTURE OF GRANAL CHLOROPLASTS

Adam WOŹNY

Zakład Botaniki Ogólnej, Wydziału Biologii U.A.M.

Streszczenie. W pracy przedyskutowano najnowsze wyniki badań nad strukturą i subultrastrukturą: otoczki, stromy (obejmującej rybosomy, DNA, fitoferrytynę i plastoglobule) oraz tylakoidów. Przedstawiono między innymi niektóre modele wyjaśniające organizację i wzajemne układy błon tylakoidowych, a także niektóre modele ilustrujące subultrastrukturalną budowę tych błon. Uwzględniono przede wszystkim wyniki, które zostały otrzymane po ukazaniu się ostatniego polskiego opracowania dotyczącego struktury chloroplastów [172]. Opisano także nowy typ mechanizmu regulującego fotosyntetyczną aktywność błon chloroplastowych, u którego podstaw leżą procesy fosforylacji i defosforylacji białek budujących zbierające energię kompleksy chlorofil a/b białko (= LHC) oraz migracje tzw. mobilnych LHC.

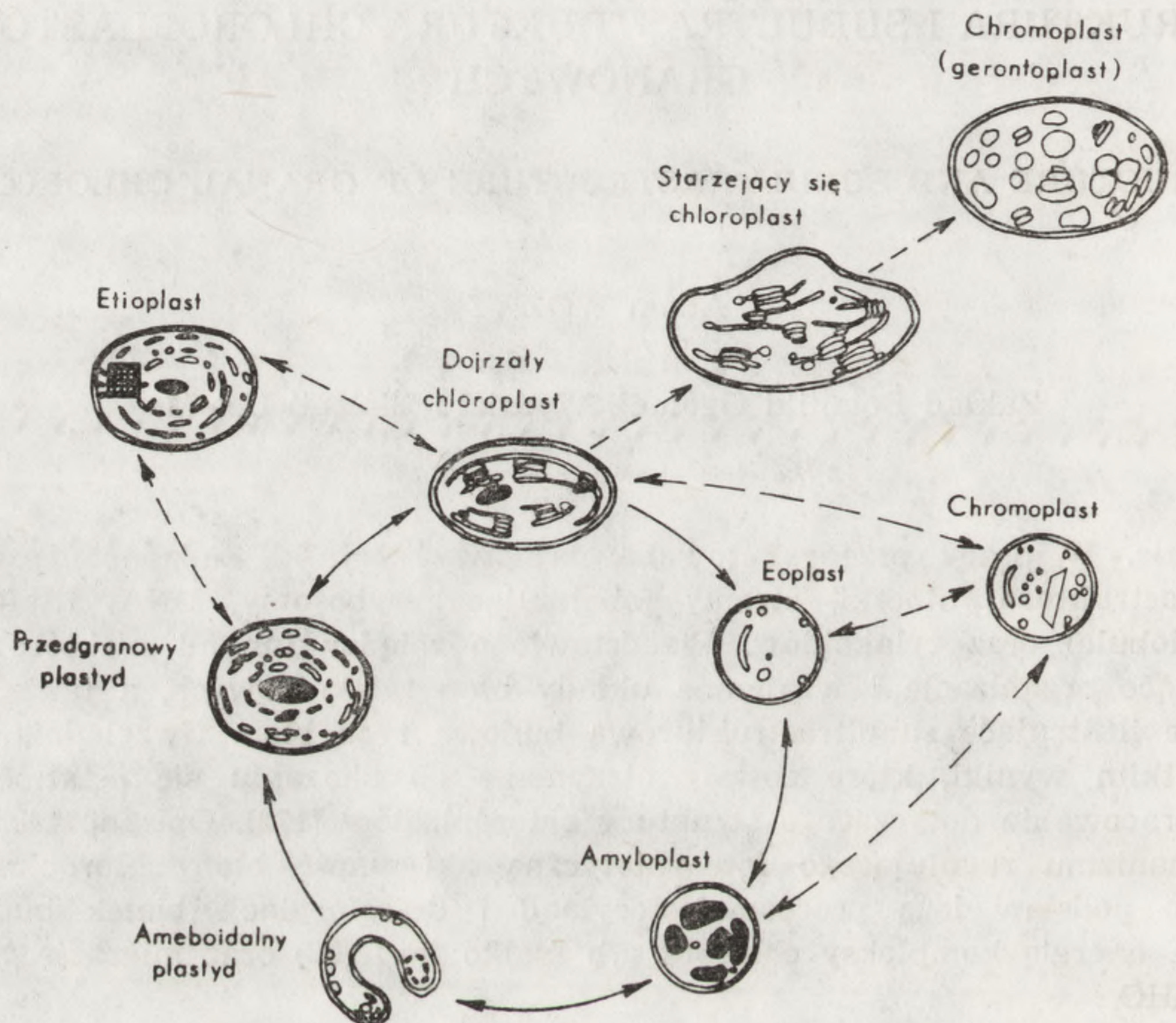
Summary. Since the last (in Polish) review on structure of plastids in higher plants [172], the main progress has shifted further from the pure ultrastructural level to the study of molecular, structural and physiological aspects of plastid subfragments. In the past few years, research in this field has increased exponentially and matches in magnitude that on photosynthesis. In this article a novel type of mechanism for regulating membrane activity in the fundamental process of photosynthesis was also described, using a combination of chemical modification and structural reorganization of membrane components at the supramolecular level.

WSTĘP

Plastydy (termin został użyty po raz pierwszy przez Schimperera [219]) należą do najtrafniej nazwanych organelli. Nazwa ta odzwierciedla bowiem niezwykłą wprost plastyczność zarówno ich struktury, jak i funkcji [np. 135, 263, 271]. Zasadnicza linia rozwojowa plastydów roślin okry-

tożalążkowych przebiega od bardzo prostej struktury, jaką jest proplastyd (eoplast), do bardziej złożonych form (ryc. 1). Jedną z nich są chloroplasty, które reprezentują podstawową i funkcjonalnie najbardziej aktywną formę.

Chloroplasty utworzone są z trzech przedziałów różniących się morfologicznie i funkcjonalnie: otoczki, stromy i tylakoidów.



Ryc. 1. Zależności rozwojowe plastydów [263]

OTOCZKA

U glonów z reguły stanowią ją dwie blisko siebie leżące równoległe błony grubości około 5–6 nm każda. Oddziela je przestrzeń periplastydowa o szerokości około 6 nm. U roślin wyższych błony te mogą być równej lub różnej grubości. Nie zawsze też mają względem siebie równoległy układ.

Otoczkę charakteryzuje selektywna przepuszczalność. Fakt, że chloroplasty otoczone są dwiema błonami bywa wykorzystywany jako jeden z dowodów endosymbiotycznego pochodzenia plastydów. Sugeruje się, że zewnętrzna błona należy do gospodarza, a wewnętrzna do prokariotycznego endosymbionta. Z tego powodu należało oczekiwać istnienia pew-

nych morfologicznych i funkcjonalnych różnic między dwiema błonami otoczki. Ponieważ opublikowano niewiele prac zawierających dosyć szczegółową analizę porównawczą zewnętrznej i wewnętrznej błony [np. 64, 259], dlatego więc wiemy o nich bardzo mało. Pewne różnice wykryto np. w zawartości sterolu między zewnętrzną i wewnętrzną błoną otoczki. I tak, wewnętrzna błona wszystkich przebadanych dotychczas roślin była pozbawiona 3- β -hydroksysteroli [163, 173]. Podobne wyniki otrzymali Melkonian i wsp. [163] także dla zewnętrznych błon chloroplastów szpinaku i grochu oraz mchu *Polytrichum piliferum* (choć w 1982 r. Moeller i Mudd [173] stwierdzili obecność sterolu w zewnętrznej błonie otoczki chloroplastów szpinaku). Wysoką zawartość steroli wykazano natomiast w zewnętrznych błonach plastydów wielu wiciowców: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cryptomonas erosa* i *Euglena gracilis* [163]. Funkcja chloroplastowych steroli jest nieznana, ale obecność sterolu tylko w zewnętrznej błonie, jak również charakterystyczne dla tej błony znaczne ilości fosfatydylocholiny są zgodne z modelem endosymbiotycznego pochodzenia chloroplastów. Oba te lipidy są bowiem bardziej powszechne u eukariontów niż u prokariotów.

Badania nad przepuszczalnością wykazały, że tylko wewnętrzna błona otoczki stanowi rzeczywistą, funkcjonalną barierę między stromą i cytozolem [107]. Błona ta nie jest przepuszczalna dla rozpuszczonych substancji hydrofilnych, jak na przykład sorbitolu. Wyposażona jest jednak w wiele różnych przenośników (carrierów) transportujących określone substraty: fosforan, dikarboksylany, nukleotydy, glukozę i glicerynian [105, 106, 206, 218]. Fosforanowy przenośnik zapewnia główną drogę eksportu węgla związanego w procesie fotosyntezy. Wiadomo bowiem, że produkt fotosyntezy wydostaje się z chloroplastu głównie jako triozyfosforan. Pomimo intensywnych badań nadal bardzo mało wiadomo o polipeptydach, które pośredniczą w tym transporcie. Dotąd zidentyfikowany został tylko jeden polipeptyd. Flügge i Heldt [88, 89, 90] opisali polipeptyd o masie około 30 kilodaltonów (kd) biorący udział w specyficznym transporcie ufosforylowanych cukrów i fosforanu przez wewnętrzną błonę otoczki. Joyard i wsp. [125] uważają, że ten fosforanowy przenośnik odpowiada najprawdopodobniej integralnemu polipeptydowi, który oznaczyli E-30. W roku 1982 Robinson [206] wykazała, że w chloroplastowej otoczce znajduje się również specyficzny przenośnik dla glicerynianu (powstającego w procesie fotooddychania w peroksysomach). Różni się on od wszystkich opisanych przenośników tym, że jego aktywność jest stymulowana przez światło. U roślin typu C₄ i roślin gruboszowatych funkcję białka przenośnikowego pełni niedawno odkryty polipeptyd o masie cząsteczkowej 32 kd (nie występuje on u roślin C₃) [91].

Zewnętrzna błona otoczki jest natomiast całkowicie przepuszczalna

dla większości drobnocząsteczkowych substratów, ale — podobnie jak zewnętrzna błona mitochondriów — nie przepuszcza dekstranów o wysokich wartościach względnej masy cząsteczkowej M_r [107]. Do niedawna nie znane były graniczne wielkości hydrofilnych cząsteczek, które mogą dyfundować przez zewnętrzną błonę. Nie było również wiadomo, czy istnieje jakaś określona droga penetracji cząsteczek przez tę błonę, ani jak ten transport jest regulowany. Dopiero Flügge i Benz [87] badając penetrację radioaktywnych peptydów przez zewnętrzną błonę otoczki chloroplastów szpinaku rzucili nieco światła na tę kwestię. Określili m. in. granicę wielkości przepuszczanych przez tę błonę cząsteczek. Z ich danych wynika, że przepuszczane są cząsteczki o $M_r < 7000-13000$. Autorzy ci stwierdzili również, że zewnętrzna błona otoczki plastydowej stanowi swego rodzaju sito molekularne, którego oczka (pory) mają średnicę 2,5–3 nm; są więc większe niż w zewnętrznej błonie mitochondriów czy gramujemnych bakterii [87].

Wiadomo, że błony otoczki są włączone w proces transportu do wnętrza plastydu białek syntetyzowanych w cytoplazmie. Mechanizm tego (tych) procesu (ów) nie jest jednak całkowicie wyjaśniony. Wiele chloroplastowych białek lub ich podjednostek, szczególnie gdy pochodzą z przedziału jądrowo-cytoplazmatycznego, jest syntetyzowany w postaci prekursorowych polipeptydów. Wymiary takich polipeptydów już wewnątrz organelli podlegają redukcji przed włączeniem ich w dojrzałe funkcjonalnie białka. Schatz [217] określił tę potranslacyjną modyfikację dojrzewaniem wektorowem. Obejmuje ono etap bezpośredniego transportu przez błony i odłączenie fragmentu peptydu (tzw. tranzytowego polipeptydu [63]) od N-końca prekursorowego polipeptydu. Na przykład mała podjednostka karboksylazy/oksygenazy RuBP syntetyzowana jest na wolnych polirybosomach w cytozolu jako białko prekursorowe o $M_r = 20\ 000$. W takiej postaci transportowana jest do wnętrza chloroplastu, gdzie uzyskuje ostateczną wielkość [110]. Tranzytowy polipeptyd o $M_r = 4000$, złożony z około 44 przeważnie niepolarnych aminokwasów, głównie alaniny, zostaje odczepiony przez nie znane dotąd endopeptydazy, prawdopodobnie luźno związane z wewnętrzną błoną otoczki lub zlokalizowane w obszarze periplastydowym [80]. Transport stymulowany jest przez światło, a w ciemności wymaga dostarczenia energii w postaci ATP. Nie jest natomiast hamowany przez inhibitory syntezy białka wewnątrz chloroplastu. Nasuwa się więc wniosek, że funkcjonujące chloroplastowe rybosomy nie są konieczne dla pobierania i włączania w dojrzałe funkcjonalnie białka polipeptydów pochodzenia cytoplazmatycznego. Wydaje się natomiast, że musi istnieć jakiś mechanizm, który umożliwi odróżnianie przez błonę otoczki właściwego polipeptydu. Podana egzogennie duża podjednostka karboksylazy/oksygenazy RuBP nie pojawiła się wewnątrz

plastydów. Przypuszcza się, że mechanizm ten może działać np. dzięki specyficznej interakcji cząsteczek prekursorowych z zewnętrzną błoną otoczki. Jednak doświadczalnie nie udało się wykryć takiego mechanizmu. Pośrednie dowody wskazują, że zewnętrzna błona ma specyficzne białkowe receptory, dzięki którym może pełnić funkcję pośrednika w posttranslacyjnym transporcie do chloroplastów polipeptydów syntetyzowanych w cytoplazmie. Według Roberta i wsp. [205] we frakcji błon otoczek chloroplastów grochu i szpinaku znajduje się duży polipeptyd ($M_r = 33\ 000$) wiążący kalmodulinę. Wiążące kalmodulinę białka nie zostały znalezione ani we frakcji tylakoidów, ani w stromie. Jest to, jak dotąd, jedyne doniesienie o obecności w otoczce chloroplastów białka wiążącego kalmodulinę, która — jak się wydaje — może uczestniczyć w regulacji funkcji chloroplastu.

Istnieje także duże prawdopodobieństwo, że w proces rozpoznawania włączony jest opisany tu tranzytowy polipeptyd [80]. Połączenie obu podjednostek karboksylazy/oksygenazy RuBP w aktywny holoenzym odbywa się w stromie, prawdopodobnie za pośrednictwem mało jeszcze znanego białka o $M_r = 60\ 000$ (zwanego polipeptydem 60), którego synteza ma miejsce na terenie cytoplazmy [32].

Badania z zastosowaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS [125, 259] wykazały wiele różnic między białkami otoczki i tylakoidów. Znanych jest w otoczce około 70 polipeptydów (w tym 40 integralnych) [125]. Przeważają wśród nich polipeptydy o wysokiej względnej masie cząsteczkowej ($M_r \geq 54\ 000$). Niezwykle interesujący jest fakt, że w odróżnieniu od większości błon biologicznych, błony otoczki, podobnie jak i tylakoidów, nie zawierają glikoprotein [131]. Z kwasów tłuszczowych we frakcji otoczek dominował kwas α -linolenowy (C18:3) i w mniejszej ilości kwas palmitynowy (C16:0). Wagowy stosunek kwasów tłuszczowych do białek wynosił 1,21:1 (w tylakoidach tylko 0,71:1) [199]. Wysoką zawartość lipidów w otoczce wykazało wielu innych autorów. Bahl i wsp. [28] podali, że głównym lipidem w otoczkach plastydów *Triticum sativum* był digalaktozylodiacyloglicerol (DGDG), podobnie jak w ciałach prolamellarnych. Związek ten był również dominującym galaktolipidem otoczek amyloplastów *Solanum tuberosum* [213]. W tylakoidach stromy i gran dominował monogalaktozylodiacyloglicerol (MGDG). Fosfatydylocholina stanowiła około 60% fosfolipidów otoczki, 30% ciał prolamellarnych i 14% gran.

W błonach otoczki przebiega większość reakcji związanych z syntezą galaktolipidów [47, 65, 74, 76, 249]. Wykazano, że po dostarczeniu do frakcji otoczek egzogennej UDP-galaktozy, z puli diacylogliceroli obecnych wewnątrz błon otoczki tworzony jest monogalaktozylodiacyloglicerol. Kolejna galaktozylacja MGDG daje DGDG. Niedawne wyniki badań

[65] wskazują, że galaktozylotransferazy włączone w biosyntezę galaktolipidów są zlokalizowane wyłącznie w zewnętrznej błonie otoczki. Z kolei Block i wsp. [47] zlokalizowali na wewnętrznej błonie otoczki alkaliczną fosfatazę kwasu fosfatydowego. Diacyloglicerol syntetyzowany przy udziale tego enzymu z endogenego kwasu fosfatydowego stanowi substrat przy syntezie galaktolipidów. Synteza ta zdaniem Block i wsp. [47] odbywa się na wewnętrznej błonie otoczki, a nie jak sądzą inni autorzy [65] na zewnętrznej. Świadczy o tym m. in. fakt, że galaktozylotransferaza jest aktywna tylko w obecności dwuwartościowych kationów, a jej optymalne pH wynosi powyżej 7,5 [124]. Jak wiadomo, fosfataza kwasu fosfatydowego wykazuje optymalną aktywność w prawie identycznych warunkach. Badania nad lokalizacją określonych enzymów ujawniły, że oprócz Mg^{2+} ATP-azy [74, 187], która według niektórych autorów znajduje się przede wszystkim w obszarze periplastydowym, między dwiema błonami otoczki [198], większość enzymów, jakie dotychczas zlokalizowano w otoczce jest zaangażowana w metabolizm lipidów. Do tej grupy należy m. in. syntetaza acylo-CoA [123, 208], alkaliczna fosfataza kwasu fosfatydowego [47, 123] oraz kilka wspomnianych już różnych galaktozylotransferaz UDP Gal: lipidowy akceptor [65, 152, 153]. Przykładem może być enzym odpowiedzialny za syntezę acylogalaktozyloacyloglicerolu [155]. Nie wiadomo jednak, czy jest on zlokalizowany wyłącznie w otoczce. Według niektórych autorów z otoczką związane są również niektóre reakcje prowadzące do syntezy poliprenoidów (np. karotenoidów). W otoczkach chloroplastowych szpinaku wykazano obecność aktywnych enzymów zaangażowanych w biosyntezę karotenoidów [155]. Były to syntaza fitoenu (warunkująca powstawanie fitoenu przez kondensację dwóch cząsteczek pirofosforanu geranylogeranylu) oraz dehydrogenaza fitoenu (tworząca likopen z fitoenu). Także reduktaza katalizująca redukcję pirofosforanu geranylogeranylu (prekursora fitolu) do pirofosforanu fitolu (fitylopirofosforanu) zlokalizowana została w otoczce chloroplastowej. Akumulacja takich właśnie enzymów w otoczce wskazuje na ważną rolę jej błon w biosyntezie lipidów. Istnieją dane sugerujące, że in vivo chlorofile, karotenoidy i chinony nie są składnikami błon otoczek chloroplastów roślin wyższych [101]. Gdy chodzi o biosyntezę, to w przypadku chlorofili i karotenoidów ten sam autor uważa, że może się ona odbywać tylko w błonie tylakoidowej, kwestia zaś miejsca biosyntezy plastochinonu jest obecnie badana w tym ośrodku.

Chociaż badania techniką kriorytownictwa tylakoidów są powszechne, to ultrastruktura otoczki chloroplastowej, ujawniona za pomocą tej techniki, jest właściwie prawie nieznaną. Interesujące wyniki uzyskał Brandley [51], który badając tą techniką chloroplasty glonu *Codium australicum* (hodowla oświetlana) wykazał na zewnętrznej błonie otoczki

(na jej powierzchni EF) istnienie dwóch typów regionów: o wysokiej i niskiej gęstości cząstek. Region o wysokiej gęstości cząstek był z reguły zorientowany w kierunku ściany komórkowej. Chloroplasty roślin trzymany w ciemności nie wykazywały takiego podziału. O tym, że oświetlenie i zaciemnienie otoczki zmienia jej właściwości było wiadomo już wcześniej. Otoczki np. chloroplastów grochu oświetlane i zaciemniane różniły się zdolnością absorpcji jonów ciężkich metali, a tym samym kontrastem [127]. Ponadto stwierdzono, że liczba uwidocznionych metodą kriorytownictwa cząstek wynosi na powierzchni EF zewnętrznej błony otoczki $133 \mu\text{m}^{-2}$ [228]. Ich średnica sięgała 9 nm. Taka gęstość cząstek odpowiadała regionowi otoczki chloroplastu *Codium australicum* o niskiej gęstości cząstek [51]. Z kolei u krasnorostu *Bangia fuscopurpurea* na stronie EF zewnętrznej błony otoczki gęstość cząstek była podobna jak ta, którą podali Sprey i Laetsch [228], tj. 170 cząstek μm^{-2} , jednak ich średnica była większa i wynosiła około 14 nm [45]. Jaki jest charakter przedstawionych wyżej cząstek? Jak wiadomo, większość zidentyfikowanych do tej pory białek otoczki stanowi system przenośników zlokalizowany w błonie wewnętrznej [75]. Jednak kilku autorów doniosło, że wyizolowana frakcja otoczek chloroplastowych miała żółte zabarwienie, co wskazuje, że z otoczką związane są karotenoidy [119]. Późniejsze badania potwierdziły to i dodatkowo wykazały, że dominuje wśród nich wiolaksantyna [75]. Poziom karotenoidów w otoczce jest niestety zbyt niski [75], aby mogły one pełnić sugerowaną przez Jeffrey'a i wsp. [119] funkcję ochronną w stosunku do chlorofilu. Jeżeli natomiast jest tak jak uważa Brandley [51], a mianowicie, że obserwowane przez niego cząstki są kompleksami białka z barwnikami (najprawdopodobniej karotenoidowymi), to przemieszczanie barwników na oświetloną stronę chloroplastu może ponad dwukrotnie zwiększać ich koncentrację właśnie tam, gdzie są one najbardziej potrzebne. Zmniejsza to siłę argumentacji Douce i Joyarda [75]. Dopiero jednak badania nad działaniem światła o różnej długości fali na ruch cząstek mogą pomóc w rozwiązaniu zagadnienia identyfikacji i funkcji tych cząstek.

Podsumowując należy stwierdzić, że otoczka włączona jest w procesy syntezy takich składników chloroplastu, jak galaktolipidy, karotenoidy i prenylochinony. Błony otoczki tworzą selektywną barierę dla cząsteczek przemieszczanych z wnętrza i do wnętrza organelli. Ponadto ten system dwóch błon odgrywa ważną rolę w biogenezie tylakoidów. Jednak wyniki badań, w których porównywano ze sobą polipeptydy otoczki z głównymi polipeptydami tylakoidów ujawniły istotne różnice [125]. Wyniki te nie potwierdzają więc koncepcji o bezpośredniej relacji między tymi dwoma systemami błon (otoczką i tylakoidami). Whatley i wsp. [264] stwierdzili np., że inwaginacje wewnętrznej błony otoczki nie wykazują

powinowactwa do użytego barwnika (jodek cynku z osmem) podobnie jak otoczka, podczas gdy tylakoidy wybarwiły się bardzo silnie. Jeżeli faktycznie błony tylakoidowe powstają z wewnętrznej błony otoczki, to muszą zachodzić znaczne zmiany w składzie pęcherzyków następujące po początkowych etapach inwaginacji wewnętrznej błony.

STROMA (MATRIKS)

W stromie zlokalizowano większość białek, które kodowane są przez jądrowe DNA (tab. 1). Białka te są włączane w różne tory metaboliczne, jak np. synteza barwników, kwasów nukleinowych i białek, a także wchodzi w skład plastydowych błon i rybosomów. Aktywność enzymów stromy wyraźnie wzrasta po oświetleniu etiolowanych komórek. Jest to spowodowane głównie wzrostem ich syntezy de novo, ponieważ proces ten był hamowany przez cykloheksimid.

TABELA 1

Zestawienie lokalizacji plastydowych białek kodowanych w jądrze i syntetyzowanych na cytoplazmatycznych polirybosomach
S — stroma, T — tylakoidy, E — otoczka (według Parthiera [196])

Białko	Przedział
Alkaliczna dezoksyrybonukleaza	S
Syntetaza aminoacylo-tRNA	S
Dehydrataza aminolewulinianowa	S
ATPaza (CF ₁), podjednostki γ , δ	T
ATPaza (CF ₀), podjednostka II	T
Enzymy związane z karotenogenezą	S
Cytochrom c 552	T
Polimeraza DNA	S/T
Czynnik elongacyjny G	S
Białka błon otoczki	E
Ferredoksyna	T
Reduktaza ferredoksyna — NADP	T
Aldolaza fruktozo -1,6 difosforanu	S
Fosfataza 3-glicerynianowa	S
Białko kompleksu zbierającego energię świetlną (LHCP)	T
Zależna od NADP dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicero- lowego	S
Kinaza 3-fosfoglicerynianowa	S
Białkowe składniki fotoukładu II	T
Plastocyjanina	T
Polimeraza RNA	S/T
Rybosomalne białka (większość)	S
Mniejsza podjednostka karboksylazy RuBP	S
Enzymy zaangażowane w syntezę skrobi	S

W stromie chloroplastów roślin zaliczanych do tzw. typu C_3 ma miejsce wiązanie i redukcja CO_2 do cukrów. Odbywa się to w cyklu Calvin-Bensona (u roślin typu C_4 pierwszy etap wiązania CO_2 dokonuje się w cytozolu komórek miękiszowych, a pierwotnym akceptorem jest fosfoenolopirogronian). Wiązanie CO_2 u roślin C_3 , odbywa się przy udziale karboksylazy RuBP — głównego białka plastydowego, zwanego także frakcją I białka. W reakcji tej jedna cząsteczka rybulozo-1,5-bisfosforanu reagując z jedną cząsteczką CO_2 daje w wyniku dwie cząsteczki 3-fosfoglicerynianu (jest to karboksylazowa funkcja tego enzymu). Katalizuje on również przekształcanie jednej cząsteczki rybulozo-1,5-bisfosforanu w jedną cząsteczkę fosfoglicerynianu i jedną fosfoglikolanu (oksygenazowa funkcja, m. in. przy niskim poziomie CO_2 a wysokim O_2) [154]. W roślinach wyższych, zielenicach i pewnych fotosyntetyzujących bakteriach enzym ten utworzony jest z ośmiu 55 kd, dużych (=LS) podjednostek i ośmiu około 12–15 kd, małych (=SS) podjednostek. LS może występować jako dimer o współczynniku sedymentacji 7 S, współczynnik sedymentacji SS wynosi 3 S [209]. Wyniki późniejszych badań [210] wykazały, że LS syntetyzowana jest *in vivo* oraz w izolowanych chloroplastach w formie dwóch różnych kompleksów o współczynniku sedymentacji 7 S i 29 S. Autorzy ci stwierdzili również, że w izolowanych chloroplastach nadmiar dużych podjednostek jest degradowany. Katalityczne miejsca zarówno dla aktywności karboksylazowej, jak i oksygenazowej znajdują się w obrębie LS [121], natomiast funkcja SS nie jest znana. Masa cząsteczkowa holoenzymu została określona na około 550 kd, a stała sedymentacji na 18 S [130]. W przypadku roślin wyższych i zielenic tak dane genetyczne, jak i biochemiczne wskazują, że LS syntetyzowana jest w chloroplastach, a SS w cytoplazmie [80]. Ta mała podjednostka, jak już wcześniej podano, jest syntetyzowana na wolnych polirybosomach w cytozolu jako prekursorowe białko i transportowana do wnętrza plastydu, gdzie uzyskuje końcową wielkość [62, 110]. Połączenie obu podjednostek karboksylazy RuBP w aktywny holoenzym odbywa się w stromie prawdopodobnie za pomocą tzw. polipeptydu 60, również syntezowanego w cytozolu [32].

CHLOROPLASTOWE RYBOSOMY

W niskich koncentracjach Mg^{2+} chloroplastowe rybosomy dysocjują na dwie podjednostki — 30 S i 50 S. W skład mniejszej wchodzi RNA o stałej sedymentacji 16 S, a w skład większej: 23 S, 5 S i 4,5 S RNA. Oprócz cząsteczek RNA plastydowe rybosomy zawierają około 56–64 białek (podobnie jak rybosomy Prokaryota [188], a mniej niż rybosomy cytoplazmatyczne [192]), a mianowicie 24–31 białek w podjednostce 30 S i 32–33 białka w podjednostce 50 S. Z tej puli tylko 6–14 białek podjed-

nostki 30 S i 5–6 białek podjednostki 50 S było syntetyzowanych w izolowanych chloroplastach [81, 220]. Wszystkie natomiast rodzaje chloroplastowych RNA są kodowane na chloroplastowym DNA [109, 136].

Analiza elektroforogramów wyizolowanych cytoplazmatycznych i chloroplastowych rybosomów pochodzących z kilku gatunków prokariotycznych i eukariotycznych [143] wykazała m. in., że u *Euglena gracilis* i *Spinacia oleracea*, chloroplastowe rybosomy, były bardziej ruchliwe podczas elektroforezy i wyraźnie mniejsze ($19,7 \times 16,2$ nm), niż cytoplazmatyczne rybosomy tych gatunków ($23 \times 18,7$ nm). Z kolei porównanie rybosomów chloroplastowych z prokariotycznymi ujawniło podobieństwa w wielkości i ruchliwości elektroforetycznej.

Schmidt i wsp. [220] określili całkowitą masę cząsteczkową białek związanych z małą podjednostką chloroplastowych rybosomów *Chlamydomonas* na 992 3000, a związanych z dużą — na 605 800. Całkowita masa dużej podjednostki (około 1700 000 [220]) jest bardzo zbliżona do masy analogicznej podjednostki rybosomów *E. coli*, natomiast małej podjednostki (~ 1600 000 [220]) jest dużo większa od masy małej podjednostki rybosomów *E. coli*. Różnica ta jest związana wyłącznie z różnicą w masie cząsteczkowej białek, ponieważ 16 S rRNA małych podjednostek rybosomów plastydowych i rybosomów *E. coli* mają zbliżone masy cząsteczkowe [50].

Rybosomy chloroplastowe roślin wyższych (stanowią 30–50% wszystkich komórkowych rybosomów liścia [78]) i *Chlamydomonas* występują jako „wolne” w stromie lub związane z błonami tylakoidów [3 i cytowana tam literatura]. Liczba rybosomów związanych określana była na 50% [59]. Gdy jednak wzięto pod uwagę znaczny stopień uszkodzenia otoczki i utraty zawartości stromy przy takiej preparatyce, liczba ta okazała się dużo niższa i wynosiła 20% [240]. Proporcje między rybosomami wolnymi i związanymi mogą ulegać zmianie. U *Chlamydomonas* liczba związanych z tylakoidami rybosomów 70 S osiągała swoje maksimum na świetle w czasie biosyntezy błonowych białek i obniżała się gwałtownie, gdy glon umieszczano w ciemności [60]. Światło zwiększało również w chloroplastach grochu liczbę rybosomów związanych [86]. Wzrost ten wynosił średnio 25–65% w porównaniu z plastydami kontrolnymi materiału trzymanego w ciemności, przy czym wielkość wzrostu zależała od wieku liści. Był on jednak uchwytany w plastydach pochodzących z najmłodszych, jak i najstarszych liści. Według tych samych autorów światło zwiększało ponadto aktywność rybosomów plastydowych. Prowadzi się również badania zmierzające do poznania mechanizmów łączenia się rybosomów z tylakoidami (podobnie do wcześniej analizowanego problemu reakcji rybosomy 80 S ER [np. 207, 212, 224 i cytowana tam literatura]. Wnioskować o charakterze sił wiążących można na podstawie zachowania się rybosomów, gdy błony są inkubowane: 1) w wysokich

stężeniach soli (pękają wtedy elektrostatyczne wiązania), 2) z puromycyną (uwalnianie rybosomów jest wskazówką, że były one przymocowane do błon za pomocą łańcucha polipeptydowego), 3) z RN-azą (która pozwala wykazać połączenie za pośrednictwem RNA).

W błonach tylakoidowych grochu istnieją cztery kategorie rybosomów [273]. Pierwszą stanowią monomery (monosomy) obejmujące 30–40% wszystkich związanych rybosomów. Można je uwolnić już za pomocą wysokiego stężenia soli (0,5–1,0 M KCl), co wskazuje na bezpośrednie połączenie z błonami. Drugą wyraźną grupę (30% całości) rybosomów uwalniało zastosowanie niskiego stężenia RN-azy. Nie były więc one połączone z błoną bezpośrednio, a tylko poprzez mRNA. Do trzeciej kategorii zostały zaliczone te rybosomy, które można było odłączyć tylko za pomocą puromycyny. Mogły być zatem połączone z błoną tylakoidową bezpośrednio lub pośrednio za pomocą tworzącego się łańcucha polipeptydowego. Czwartą grupę (około 20%) stanowiły rybosomy, które pozostawały połączone z tylakoidami pomimo inkubacji w wysokim stężeniu soli, z puromycyną i RN-azą. Charakter wiązań nie został w tym przypadku określony, autorzy przypuszczają jednak, że połączenie mogło mieć miejsce poprzez tworzący się łańcuch polipeptydowy. Z kolei obrazy uzyskane za pośrednictwem elektronowego mikroskopu transmisyjnego ujawniły obecność rybosomów tylko na błonach tylakoidów stromy i krańcowych błon w obrębie granum [273].

Liczne dane z literatury [m. in. 3, 59, 60, 79, 118, 158, 164, 240] wskazują, że związane z tylakoidami rybosomy 70 S są zaangażowane w syntezę błonowych białek. Problem rekonstrukcji kształtu całego rybosomu i jego podjednostek, jak również przestrzennego rozmieszczenia licznych składników wewnątrz rybosomu jest niezwykle skomplikowany i trudny do rozwiązania. Wynika to nie tylko z dużej liczby białek rybosomalnych, ale także nieregularnego kształtu wielu białek. Niemniej w ostatnich latach zaznaczył się na tym polu widoczny postęp dzięki zastosowaniu wielu metod (elektronowy mikroskop transmisyjny, techniki immunologiczne i inne). Uzyskane wyniki pozwolą z pewnością już w niedalekiej przyszłości skonstruować model chloroplastowego rybosomu.

DNA

Podstawowe informacje na temat chloroplastowego DNA zawarte są m. in. w artykule przeglądowym autora niniejszego opracowania [272]. Można je streścić następująco: u roślin wyższych i glonów chloroplastowy genom jest reprezentowany przeważnie przez sekwencję jednej, kolistej cząsteczki DNA. Liczba, kształt, wielkość i położenie obszarów zawierających DNA (=obszarów nukleoidopodobnych) zmienia się w czasie ontogenezy chloroplastu. U większości przebadanych dotąd dojrze-

łych chloroplastów roślin lądowych i glonów liczba ta wynosi 8–40. Większą liczbę (40–300) stwierdzono w chloroplastach *Zygnematales*, *Ulotrichales* i *Ulvales*. Ze względu na kształt, wymiary i rozmieszczenie obszarów nukleoidopodobnych w chloroplastach, rośliny można podzielić na pięć typów. Na podstawie badań w mikroskopie elektronowym stwierdzono, że replikacja chloroplastowego DNA rozpoczyna się od formowania dwóch tzw. przemieszczających się pętli (=D-pętli), podobnych do tych, które zapoczątkowują replikację mitochondrialnego DNA u zwierząt. Każda z rosnących nici D-pętli rozszerza się tylko w jednym kierunku, tzn. do siebie. W efekcie powstaje po pewnym czasie nowa struktura, zwana strukturą Cairnsa, która kontynuując syntezę DNA doprowadza do powstania kompletnie zreplikowanego chloroplastowego DNA.

Znana jest również lokalizacja wielu genów w obrębie kolistej części chloroplastowego DNA (dla plastydowych tRNA, rRNA i białek [272]).

Ostatnio potwierdzono m. in informacje, że zawartość DNA w chloroplastach zmienia się w czasie ontogenezy liścia. Przykładem takiego doniesienia mogą być opublikowane niedawno wyniki Tymmsa i wsp. [247]. Wykazali oni, że wraz ze wzrostem liści buraka, od 2–3 do 25–30 cm średnia liczba chloroplastów na komórkę zwiększa się od 11 do 65, a ilość chloroplastowego DNA na komórkę od 1100 do 1900 plastomowych kopii; wzrasta także wielkość komórek. Jednak średnia liczba kopii na chloroplast wyraźnie maleje: od 104 w 2–3 cm liściach do 29 w 25–30 cm. W tym czasie chloroplasty podlegają kilku podziałom i zwiększają swoją średnicę od 1,5 do 4,9 μm .

Znaczne postępy poczyniono również w fizycznych badaniach plastydowego DNA. Wiadomo, że pewne geny dla tRNA chloroplastów zawierają sekwencje wtrętowe (introny). Są one w chloroplastowych genach bardzo długie (458–949 par zasad = bp) w porównaniu z intronami genów jądrowych dla tRNA (13–60 bp [189]). Deno i Sugiura [71] w DNA chloroplastów tytoniu określili sekwencję nukleotydów w genach dla tRNA^{Gly} (UCC) i tRNA^{Arg} (UCU). W latach 1981–1982 w pracowni Sugiury określono takie sekwencje dla sześciu innych tRNA. Stwierdzono ponadto, że gen dla tRNA^{Gly} ma sekwencję intronu złożoną z 691 bp, natomiast oddzielony od niego przerywnikiem (złożonym z 169 bp) gen dla tRNA^{Arg} nie ma intronu [71].

FITOFERRYTYNA

Żelazo w komórkach może występować w postaci nietoksycznego kompleksu z białkiem. Kompleksy takie, pod nazwą ferrytyny, były już od dawna znane w komórkach zwierzęcych. W komórkach roślinnych

natomiast zostały zidentyfikowane dopiero w latach 1961–1963 i nazwane fitoferrytyną [115]. Fitoferrytynę opisano u wielu *Angiospermae*, paproci i niektórych glonów [200].

W odróżnieniu od ferrytyny komórek zwierzęcych, fitoferrytyna obecna jest tylko w plastydach i ciałach lipidowych [197, 223]. W mikroskopie elektronowym fitoferrytyna wykazuje znaczną gęstość dla elektronów, nawet w materiale nie utrwalonym OsO_4 i nie barwionym metalami ciężkimi [115, 200]. Jest to wynikiem znacznej koncentracji żelaza w jej cząsteczkach. Fitoferrytyna może występować w postaci rozproszonych ziarnistości lub w układach krystalicznych [4, 200, 204]. Ze szczegółowych analiz wynika, że kompleksy fitoferrytyny utworzone są z żelazowego rdzenia o średnicy 5–7 nm. W jego skład wchodzi 6 podjednostek o średnicy około 1,5 nm rozmieszczonych w sześciu rogach ośmiościanu. Rdzeń otoczony jest przez białkową powłokę o grubości 2 nm, wyraźnie widoczną po negatywowym barwieniu [115].

Czynniki sprzyjające pojawianiu się fitoferrytyny są bardzo rozmaite. Należą do nich np. infekcja wirusowa, brak światła, proces starzenia, mutacje i proces różnicowania się komórek [223]. Są to czynniki, które ograniczają zdolność chloroplastów do fotosyntezy, co na poziomie ultrastruktury plastydów uwidacznia się wyraźną redukcją systemu tylakoidowego. Ogólnie przyjmuje się, że obecność fitoferrytyny w tkankach związana jest z wysokim poziomem żelaza w ksylemie, np. [222], lub z brakiem aktywności fotosyntetycznej. Spotyka się ją więc w kwiatach, korzeniach, nasionach, a także w komórkach zainfekowanych przez wirusa [115, 223, 262]. Fitoferrytyna tworzy się jednak i w normalnych, zielonych liściach [250], ale — jak wykazali Van der Mark i wsp. [251] — zawiera wtedy tylko około 350 atomów żelaza na cząsteczkę. W chlorotycznych liściach natomiast, tym samym autorom w ogóle nie udało się wykryć fitoferrytyny. W liściach przeniesionych z pożywki bez żelaza na pożywkę z wysoką zawartością tego metalu ($90 \mu\text{M FeNaEDTA}$), poziom żelaza w fitoferrytynie wzrósł do 1500–2500 atomów na cząsteczkę [251]. Zdaniem tych autorów, fitoferrytyna działa jako swoisty bufor, gdy podaż żelaza nie jest proporcjonalna do obecnego zapotrzebowania tkanki, ale może również służyć jako forma zabezpieczenia komórki przed toksycznie wysokim poziomem wolnego żelaza.

PLASTOGLOBULE

Charakterystyczną cechą plastydów utrwalonych przy udziale OsO_4 są okrągłe w zarysie i gęste dla elektronów ciała. Spotyka się je na terenie stromy, a w etioplastach często także w obrębie ciał prolamellar-nych. Struktury te określa się najczęściej mianem plastoglobul. Ich wy-

miary bywają bardzo różne. W normalnych np. fotosyntetyzujących chloroplastach średnica plastoglobul mieści się z reguły w granicach 10–500 nm [144], ale — jak podaje Falk [83] — spotyka się również plastydy ze znacznie większymi plastoglobulami. Zasadniczo wymiary i liczba plastoglobul wykazują tendencję do zwiększania się wraz z wiekiem plastydu [73, 145, 146], tak że w niektórych chromoplastach stanowią one wręcz struktury dominujące [57, 134, 242].

Skład chemiczny plastoglobul ulega podczas ontogenezy zmianom, o czym świadczy chociażby różny stopień ich wyczerpania się osmem [102]. Kiedy zostaje zatrzymana synteza karotenoidów np. działaniem herbicydu SAN-9789, wtedy plastoglobule stają się większe i po potraktowaniu OsO_4 mniej elektronogęste niż plastoglobule materiału kontrolnego [27]. Jest to wynikiem nagromadzenia się w nich prekursorów karotenoidów (fitoenu i fitofluenu), przez co obniżyło się powinowactwo plastoglobul do osmu [27]. Analiza frakcji plastoglobul wykazała, że ich podstawowym składnikiem są lipofilne plastochinony (plastochinon 45, α -tokoferol i niewielkie ilości witaminy K_1 [149]) oraz karotenoidy. Obecność karotenoidów wykazano jednak tylko w plastoglobulach niektórych typów plastydów, np. etioplastów i chloroplastów starzejących się liści, natomiast plastoglobule normalnie funkcjonujących chloroplastów są ich pozbawione [98 i cyt. tam lit., 146, 228]. W miarę starzenia się plastydów i przy przemianie chloroplastów w chromoplasty zwiększa się w plastoglobulach poziom karotenoidów [147, 148].

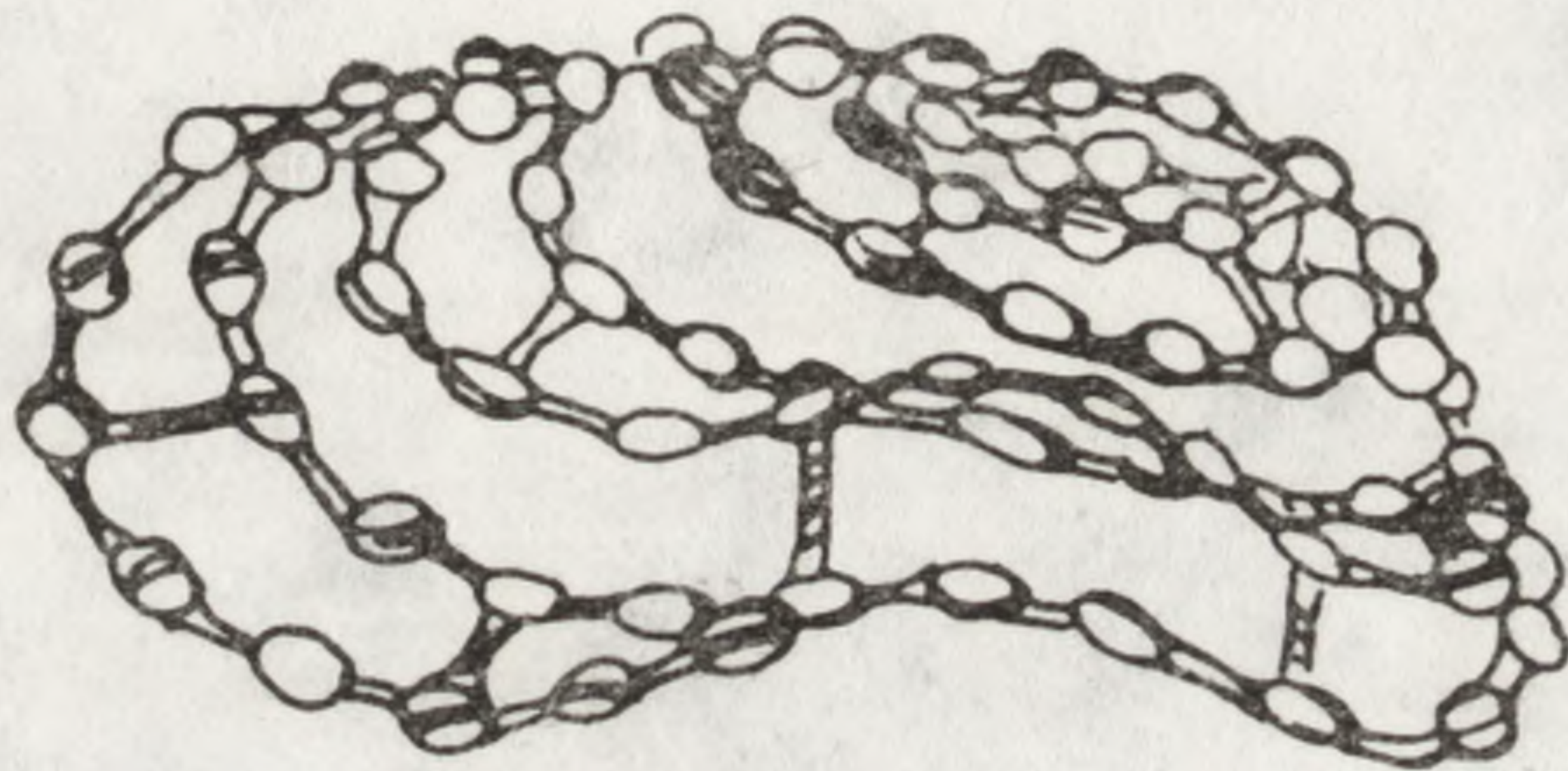
Plastoglobule można więc traktować zarówno jako struktury gromadzące produkty rozpadu aparatu fotosyntetycznego oraz jako rezerwuar pewnych składników (np. witaminy K_1) koniecznych do jego budowy.

TYLAKOIDY

Niektóre modele wyjaśniające organizację i wzajemne układy błon tylakoidowych. Wczesne rekonstrukcje przestrzennego układu błon w chloroplaście zostały wyczerpująco przedstawione m. in. przez Parka i Sane'a [195], Gunninga i Steera [102] oraz Więckowskiego [265]. Obecne proponowane np. przez Wildmana i wsp. [266], Paolillo i Rubina [194] czy Whatley i wsp. [264] różnią się dość znacznie między sobą.

Model zaproponowany przez Wildmana i wsp. [266] oparty jest na wynikach obserwacji uzyskanych na poziomie mikroskopu świetlnego. Według tych autorów grana są cylindrami o stałej powierzchni i grubości. Istnieją one jako oddzielne jednostki, niezachodzące wzajemnie na siebie. Grana, które mogą być nachylone względem siebie pod różnymi kątami, są połączone ze sobą „nicią” w sposób, w jaki nanizane są koraliki

na sznurku. Nić z granami, będąca najprawdopodobniej tylakoidem stromy, zwinięta jest w trójwymiarową spiralę (helisę) stabilizowaną nie-licznymi poprzecznymi wiązaniami utworzonymi między różnymi poziomami helisy, mniej więcej co 15 gran (ryc. 2). Helisa ta ma stanowić swoisty szkielet wewnętrzny chloroplastu. Ziarna skrobi, jeżeli są obecne w chloroplaście, zajmują wolne obszary utworzone przez helisę.

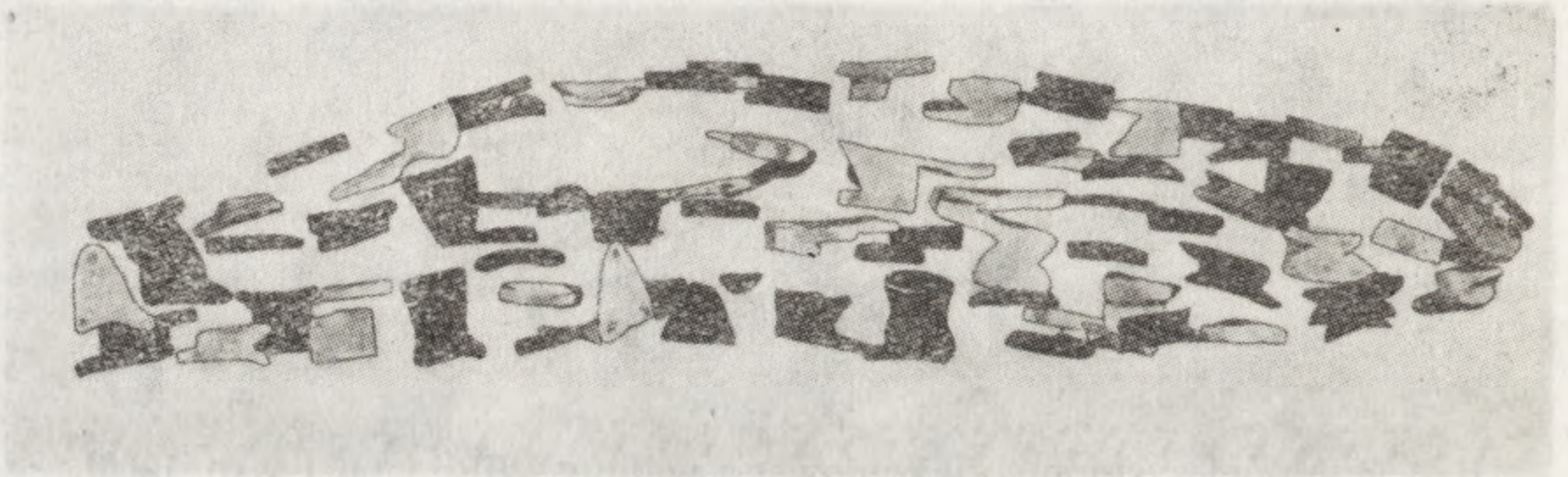


Ryc. 2. Model systemu tylakoidowego według Wildmana i wsp. [266]

Model ten przez samych autorów uznany został za najprostszy ze wszystkich proponowanych do tej pory. Najważniejsza różnica między modelem Wildmana a innymi modelami dotyczy grubości gran. We wcześniejszych modelach grubość gran była różna, przeważnie jednak znacznie przewyższała średnicę granum, natomiast Wildman i wsp. [266] uważają, że grana cechują się stałą grubością, a stosunek średnicy granum do jego grubości wynosi w przybliżeniu 5:1. Ponadto grana przedstawiano na modelach jako ułożone dokładnie poprzecznie w stosunku do dłuższej osi chloroplastu, podczas gdy model Wildmana obrazuje grana nachylone pod różnymi kątami. Model np. Weiera i wsp. [258] przedstawiał grana połączone gęstą siatką rureczek, która powstała w wyniku połączeń między granami. Połączenia te były obecne zarówno na jednym, jak i różnych poziomach, natomiast w modelu Wildmana i wsp. [266] między granami znajdującymi się na różnych poziomach poprzeczne połączenia pojawiają się tylko sporadycznie.

Autorzy drugiego modelu, Paolillo i Rubin [194], kwestionują w ogóle możliwość wykorzystania mikroskopu świetlnego do badania trójwymiarowej budowy systemu tylakoidowego w chloroplaście, a tym samym prawdziwość rezultatów uzyskanych przez Wildmana i wsp. [266]. Zrekonstruowany przez nich system tylakoidów (dane uzyskali analizując w transmisyjnym mikroskopie elektronowym serie skrawków reprezentujące kilka 0,5 μm fragmentów pochodzących ze środkowego regionu chloroplastu *Nicotiana tabacum*) potwierdza obserwacje Paolillo z roku 1970 [193]. Bezpośrednim dowodem prawdziwości doniesień o helikalnym układzie pojedynczego tylakoidu stromy wokół granum była już praca

Mustárdy'a i Janossy'a [182] wykonana przy zastosowaniu skaningowego mikroskopu elektronowego. Jednak obecna rekonstrukcja wykazała oprócz tego, że duże grana nie zawsze są prostymi bryłami (cylindrami) (ryc. 3). Utworzone są one mianowicie z dwóch lub więcej niesymetrycznie ustawionych na sobie brył. Często bryły te były cylindryczne, ale spotykano także ścięte stożki, ukośne cylindry i inne. Bryły budujące granum różniły się wysokością i średnicą. Według Paolillo i Rubina [194],



Ryc. 3. Rekonstrukcja systemu gran w chloroplaście [194]

mogły być one połączone z granami innych warstw poprzez system licznych połączeń międzygranowych. Zgodnie z tym modelem, grana rozmieszczone są w kilku (do wielu) warstwach, przy czym cechą charakterystyczną jest duża liczba połączeń między granami zarówno w obrębie jednej warstwy, jak i między warstwami. Połączenia te tworzą skomplikowaną, trójwymiarową siatkę (ryc. 4).

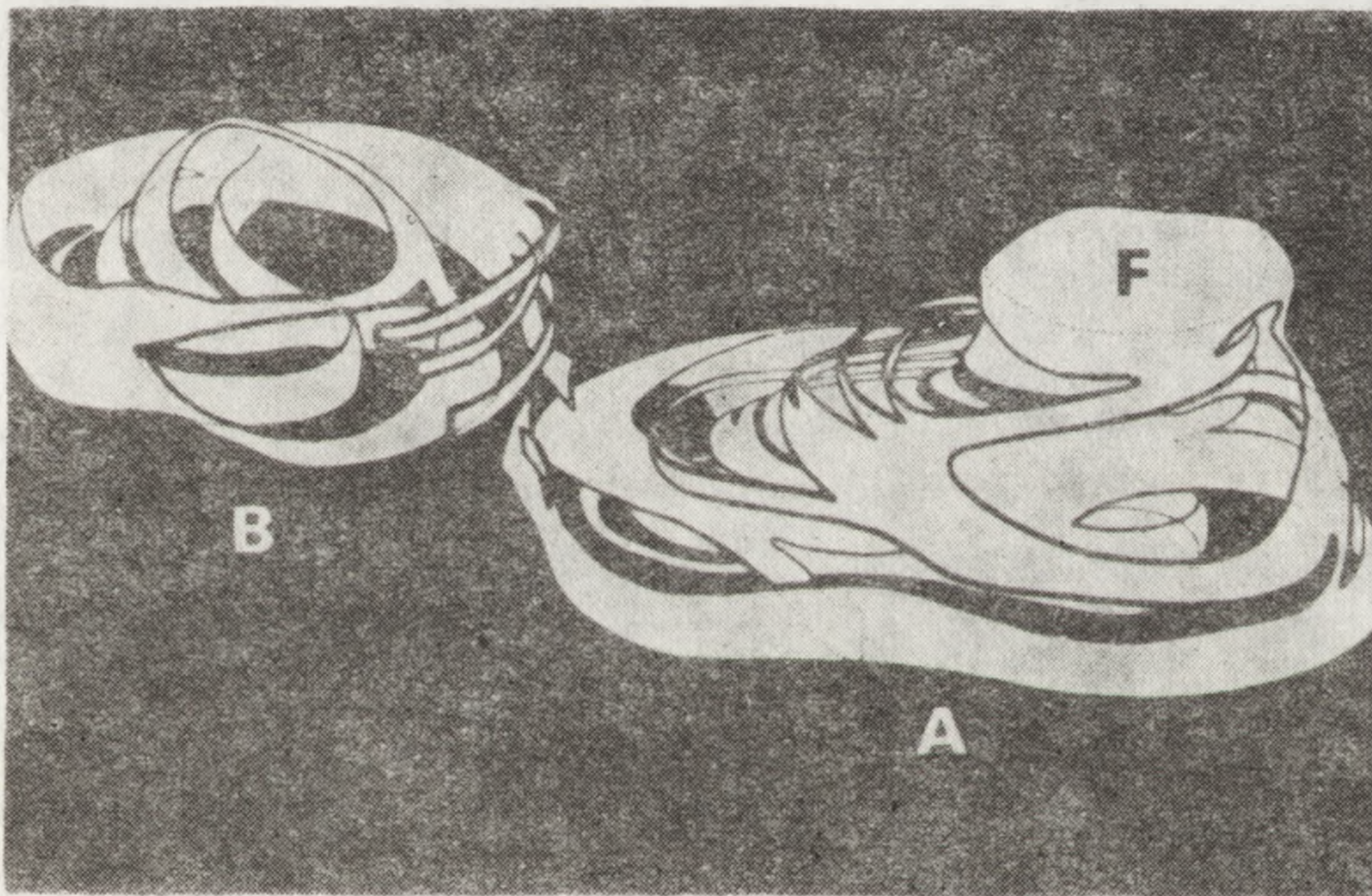


Ryc. 4. Morfologia systemu tylakoidowego opracowana na podstawie danych uzyskanych z transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Ujęto na nim także tylakoidy intergranowe, które zostały pominięte na ryc. 3 [194]

Model opierający się na wynikach uzyskanych za pomocą mikroskopu świetlnego [122, 266] wydaje się zbyt uproszczony w porównaniu z obrazami systemu tylakoidowego dojrzałych chloroplastów, jakie obserwuje się w mikroskopie elektronowym zarówno po zastosowaniu

konwencjonalnej metody preparatyki (z użyciem określonych związków chemicznych jako utrwalaczy), jak i techniki kriorytownictwa [194]. Rekonstrukcja systemu tylakoidowego, oparta na danych dostarczonych przez mikroskop elektronowy, daje tak skomplikowany obraz, że trudno wręcz wyobrazić sobie wszystkie trójwymiarowe rozgałęzienia tego systemu oraz zrozumieć, w jaki sposób mogło dojść do powstania tak złożonej struktury.

Kolejny model, zaproponowany przez Whatley i wsp. [264], ogranicza się niestety jedynie do pokazania rozmieszczenia systemu tylakoidowego w plastydach przedgranowych i na początku tworzenia się gran. Obejmuje więc tylko najwcześniejsze etapy rozwoju chloroplastów (autorzy analizowali budowę plastydów między 4–7 dniem od rozpoczęcia procesu kiełkowania), kiedy system ten jest jeszcze niezbyt skomplikowany. Wykonane przez Whatley i wsp. [264] cienkie skrawki przez eoplasty (proplastydy) ujawniły w plastydach pojedynczych perforowanych



Ryc. 5. Model systemu tylakoidowego skonstruowany na podstawie analizy seryjnych skrawków z przedgranowych chloroplastów. Kierunek zwijania się spirali tylakoidowej w segmencie A jest odwrotny w stosunku do kierunku pokazanego w segmencie B [264]

tylakoidów (średnica perforacji wynosiła około 32 nm) tworzących koncentryczne pierścienie, helisy, a także bardziej złożone układy. Na tym etapie rozwoju plastydów (podobnie jak w etioplastach) obserwowano stosunkowo nieliczne połączenia poprzeczne między głównymi tylakoidami. Piątego dnia od rozpoczęcia procesu kiełkowania stwierdzono obecność tylakoidu przypominającego pojedynczą, szeroką „taśmę”. Na skrawkach o grubości rzędu 75–100 nm jej szerokość wahała się w granicach 300–800 nm.

Skonstruowany na podstawie analizy takich skrawków model pokazuje, że tylakoid może być zwinięty w jednej płaszczyźnie, jak zwinięta sprężyna zegara (ryc. 5B) lub mieć bardziej złożoną postać, przypominającą sprężynę zegara, ale wyciągniętą w górę i w dół, tak że zwoje o największej średnicy znajdowały się w centrum, a najmniejsze u góry i u dołu (ryc. 5A). Ponadto na modelu widać, że w obrębie zwoju o największej średnicy tylakoid zachowywał początkową, prawie pionową orientację (jak w sprężynie zegara); natomiast górny i dolny zwój są prawdopodobnie zorientowane poziomo (ryc. 5A). Oprócz pierwotnej, czyli głównej spirali w plastydach obecne są jeszcze węższe i przypadkowo zlokalizowane boczne wypustki. Mają one także spiralny układ i łączą sąsiednie zwoje głównej spirali na tym samym (horyzontalnie) lub na różnych poziomach.

Tak więc badania Whatley i wsp. [264] ujawniły, że małe nieregularne tylakoidy proplastydów liści *Phaseolus* rozwijają się w szeroką „taśmę” o różnej orientacji i o różnej średnicy zwojów. W jaki sposób składniki są dodawane do rosnącego tylakoidu autorzy nie podają. Sygnalizują jednak, że kiedy zaczyna się formować chloroplast, wtedy liczba zwojów w zasadzie nie zmienia się, modyfikacji ulega natomiast forma owej tylakoidowej „taśmy” i jej spiralny układ. Pojedyncza początkowo „taśma” podwaja się na znacznej części swojej długości, jakie są dalsze kolejne etapy rozwoju, nie wiadomo.

Charakterystyka błon tylakoidowych. Reakcje, które prowadzą do przekształcania energii świetlnej w chemiczną zlokalizowane są w błonach tylakoidowych, dlatego niezwykle ważne jest poznanie strukturalnej organizacji fotosyntetycznych błon. Jak już wspomniano tu, najbardziej charakterystyczną cechą dojrzałego funkcjonalnie chloroplastu wyższych roślin (wyjątkiem są chloroplasty pochwy okołowiązkowej niektórych roślin typu C_4) i pewnych *Chlorophyta* jest obecność dwóch różnych regionów w obrębie systemu tylakoidowego: grana i tylakoidów intergranowych (tylakoidów stromy). U większości glonów natomiast grana są nieobecne w chloroplastach, a tylakoidy (po dwa lub więcej) przylegają ściśle do siebie na całej długości. U krasnorostów i u większości *Cyanophyta* wszystkie błony tylakoidowe są w kontakcie ze stromą (lub z cytoplazmą), nie stwierdzono bowiem istnienia żadnych regionów, w których błony dwóch sąsiednich tylakoidów przylegałyby do siebie [135]. Interesujące jest, że u *Prochloron*, morskiego jednokomórkowego organizmu prokariotycznego, stwierdzono obecność kompleksów chlorofil a/b białko (LHC), a jego system tylakoidowy zróżnicowany jest, podobnie jak w chloroplastach wyższych roślin i zielenic, na regiony połączonych ze sobą tylakoidów (grana) i tylakoidów stromy [95]. Błony tylakoidów swoim składem chemicznym i organizacją na poziomie molekularnym różnią się od innych typów błon komórkowych [265].

ROZMIESZCZENIE LIPIDÓW

W błonach tylakoidowych dominującymi ilościowo lipidami (poza barwnikami) są galaktolipidy. Na podstawie dotychczasowych wyników badań wydaje się, że są one rozmieszczone równomiernie w obrębie tylakoidów stromy i gran [2, 43]. Spośród lipidów zawierających węglowodany tylko jeden rodzaj sulfolipidu (sulfochinowosylodigliceryd) wykazywał różnice w rozmieszczeniu. W chloroplastach szpinaku i pszenicy znajdował się on w nieco większej ilości w błonach tylakoidów stromy niż gran [2, 28]. Bardziej wyraźna była ta różnica w błonach tylakoidowych chloroplastów mezofilu kukurydzy [246]. Te same zespoły badawcze określiły również zawartość fosfolipidów w błonach tylakoidów gran i stromy. Allen i wsp. [2] oraz Bahl i wsp. [28] w chloroplastach szpinaku i pszenicy stwierdzili, że w lamellach stromy było nieco więcej fosfatydyloglicerolu (który jest głównym fosfolipidem błon tylakoidowych) niż w lamellach gran. W chloroplastach mezofilu kukurydzy natomiast zawartość tego fosfolipidu była właściwie taka sama w błonach tylakoidów gran i stromy, zauważono jednak różnicę w składzie kwasów tłuszczowych. Kwas *trans*-heksadecenowy stanowił w granach aż 36% wszystkich kwasów tłuszczowych fosfatydyloglicerolu, 18% w tylakoidach stromy, a już tylko 8% w bezgranowych chloroplastach pochwy okołowiązkowej [246].

Plastochinon (PQ), będący ważnym lipidowym składnikiem łańcucha przenośników elektronów, zlokalizowany jest zarówno w błonach tylakoidów gran, jak i stromy. Wcześniejsze prace podawały przeciwstawne dane o wzbogaceniu w ten składnik błon jednego z dwóch regionów [108, 162, 241, 253]. Można to jednak wyjaśnić funkcją, jaką Haehnel [103], czy Milner i Barber [170] przypisują plastochinonowi. Podają oni mianowicie, że PQ przenosi elektrony z fotoukładu II (PS II), obecnego przede wszystkim w regionach zespolonych tylakoidów, a więc w granach, do kompleksu cytochrom b_6-f regionów niezespolonych.

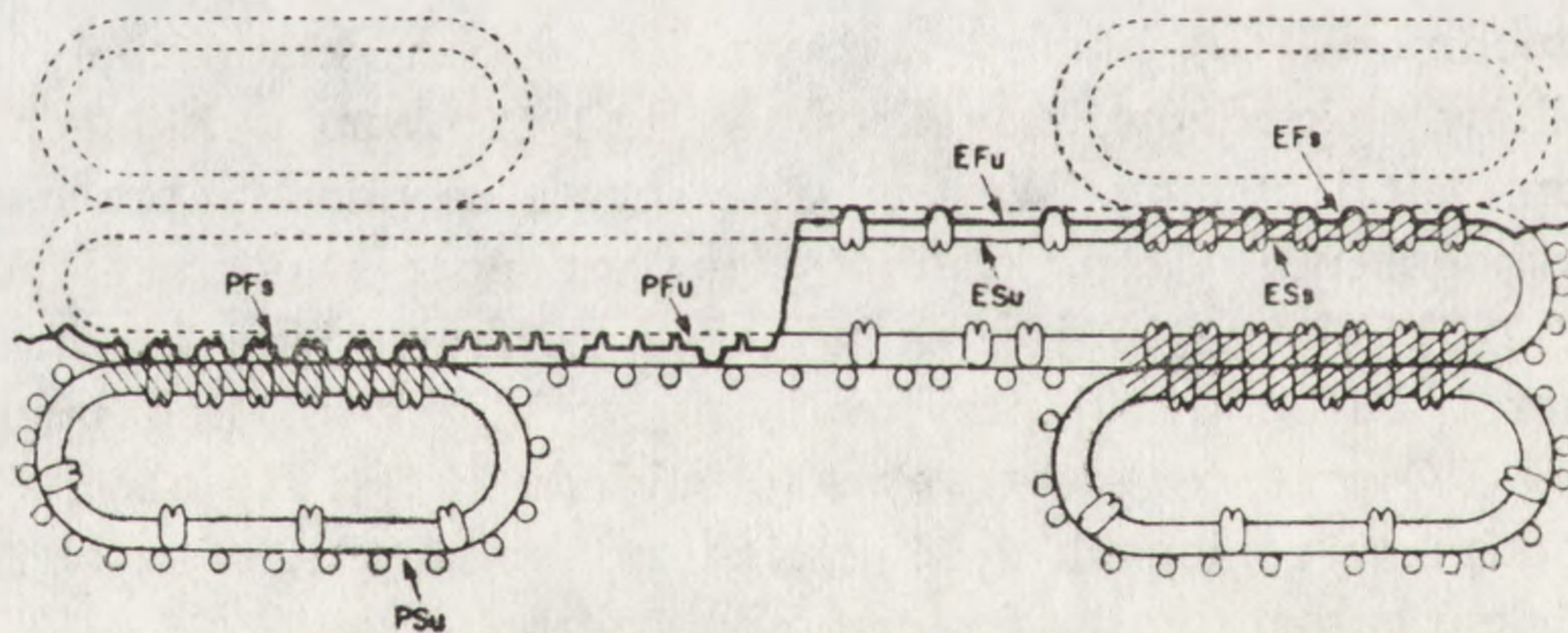
ROZMIESZCZENIE BIAŁEK

Transport elektronów w procesie fotosyntezy odbywa się wzdłuż i w poprzek tylakoidowych błon chloroplastu. Większość zaangażowanych w ten transport składników połączonych jest z białkami, co przyczynia się do powstania zarówno wewnątrz, jak i na powierzchni błon znacznej wielkości kompleksów. Najistotniejszymi elementami zaangażowanymi w zbieranie energii i procesy transportu elektronów są: PS II wraz ze zbierającym energię kompleksem chlorofil a/b białko (LHC), kompleks fotoukładu I (PS I) i kompleks cytochrom b_6-f [10]. Wczesne doniesienia, opisujące wyniki frakcjonowania zespolonych tylakoidów metodą mechaniczną lub z zastosowaniem detergentów, wykazały, że tzw. ciężka frakcja, pochodząca z gran, była wzbogacona w aktywność PS II, a tylko nieco

zubożona w aktywność PS I, podczas gdy „lekka frakcja”, pochodząca z tylakoidów stromy, była silnie zubożona w aktywność PS II, a wyraźnie wzbogacona w aktywność PS I. Obecność LHC w granach wykazano dzięki niskiej wartości stosunku chlorofilu a do chlorofilu b „ciężkiej frakcji” [11, 117, 118, 165, 181, 214, 260].

Różnice między tylakoidami stromy i gran pod względem wyposażenia w LHC i PSI uzyskano również za pomocą elektroforezy w obecności SDS tych dwóch frakcji [20, 54]. Mimo, że wszystkie te badania wskazywały na wzbogacenie gran w PS II i LHC, to jednak za pomocą stosowanych technik frakcjonowania nie było możliwości odróżnienia składu przegród (partitions) od składu eksponowanych w kierunku stromy błon tylakoidów gran (tzn. błon brzegów i błon krańcowych).

Najwięcej interesujących różnic między regionami zespolonych i niespolonych błon dostarczyło zastosowanie technik kriorytownictwa. Techniki te dostarczają obrazów wewnętrznych powierzchni błon rozszczepionych wzdłuż podwójnej warstwy fosfolipidowej. Wewnątrz błonowe cząstki, ujawnione za pomocą tej metody na powierzchni przełamu, odpowiadają najprawdopodobniej kompleksom integralnych, błonowych białek z modelu błony Singera i Nicolsona [227]. Do oznaczania odpowiednich powierzchni plastydowych błon ujawnionych techniką krioryto-

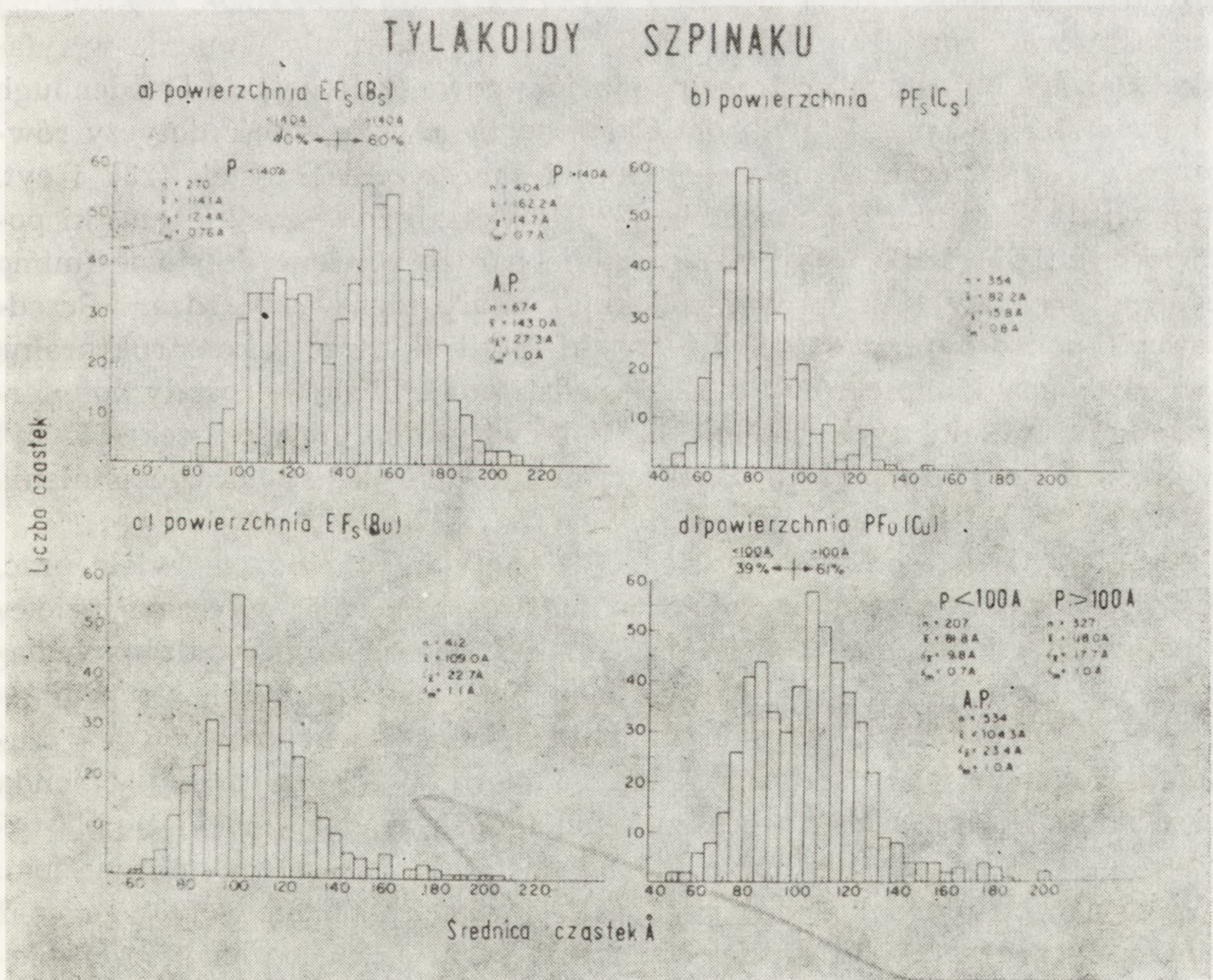


Ryc. 6. Diagram przedstawiający nomenklaturę objaśniającą obrazy błon chloroplastowych uzyskiwanych techniką kriorytownictwa

P — strona protoplazmatyczna, E — strona egzoplazmatyczna, F — powierzchnia przełamania, S — powierzchnia rzeczywista, u i s — regiony błon niepołączonych i połączonych [230]

wnictwa stosuje się zmodyfikowaną przez Staehelina [229] nomenklaturę wprowadzoną przez Brantona i wsp. [52]. Jest ona oparta na fakcie, że wszystkie biologiczne błony mają dwa listki: protoplazmatyczny (P), ułożony bliżej cytoplazmy (stromy, matriks mitochondrium itd.) i egzoplazmatyczny (E), zlokalizowany bliżej przestrzeni pozakomórkowej, pozaplazmatycznej, np. od strony lokulusa (wnętrza wakuoli itd.). W każdym listku można wyróżnić powierzchnię przełamania (F) i hydrofilną powierzchnię rzeczywistą (S); tak więc oznaczenia PF i EF odnoszą się do przełamów, a PS i ES — do rzeczywistych powierzchni (ryc. 6).

Wyniki pierwszych badań błon chloroplastowych, w których zastosowano technikę kriorytownictwa, opublikowali Mühlethaler i wsp. [183] oraz Branton i Park [53]. Istniało wówczas wiele nieporozumień związanych głównie z interpretacją obrazów uzyskiwanych za pomocą tej techniki. Z tego powodu wymienione tu prace mają obecnie znaczenie raczej historyczne. W roku 1969 Arntzen i wsp. [26] wykazali, że frakcja chloroplastowych błon, wzbogacona w PS II, była także wzbogacona w duże cząstki normalnie obecne na powierzchni EF (cząstki EF), podczas gdy frakcja zawierająca prawie wyłącznie PS I ujawniała w zasadzie tylko mniejsze cząstki pochodzące z powierzchni PF (cząstki PF). Opierając się na tych odkryciach autorzy postulowali lokalizację różnych fotoukładów w cząstkach różnej wielkości. Kolejnym etapem było stwierdzenie, że niezespalone lamelle (stromy) mają wyraźnie mniej cząstek EF niż lamelle gran [9, 214]. Odnotowano ponadto [97] istnienie strukturalnych różnic między powierzchniami należącymi do rejonów zespolonych i niezespoleonych błon; określa się je odpowiednio jako powierzchnie PF_s i PF_u . Zostały one ilościowo przedstawione na histogramie obrazującym

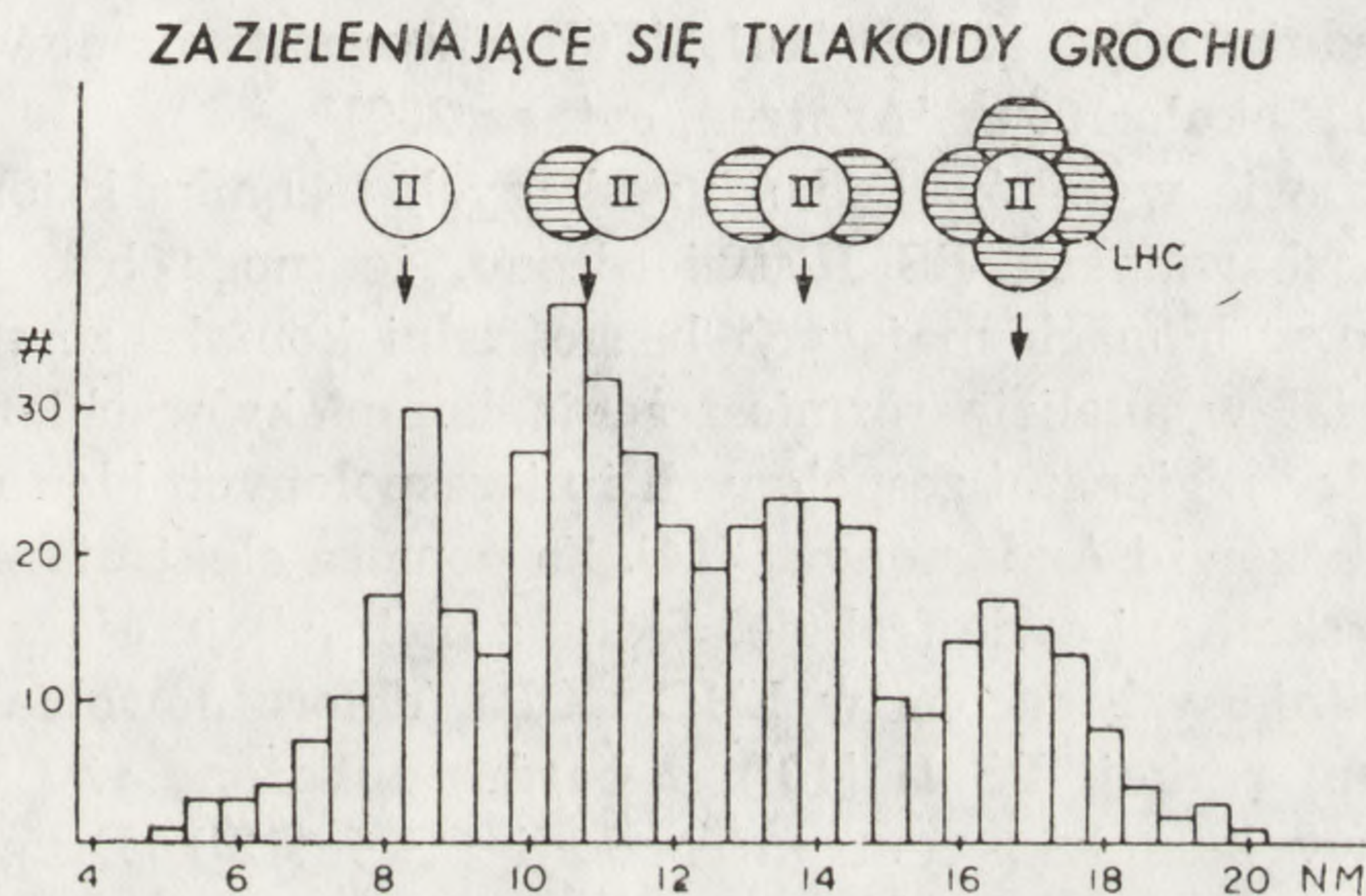


Ryc. 7. Histogramy wymiarów cząstek obecnych na czterech (ujawnionych techniką kriorytownictwa) typach powierzchni tylakoidów szpinaku: P = cząstki, A.P. = wszystkie cząstki [229]

wielkość cząstek wszystkich czterech powierzchni (ryc. 7). Widać na nim, że każda powierzchnia błony ma typowy dla siebie zestaw cząstek. Powierzchnia EF_s jest najwyraźniejszą powierzchnią w obrębie przełamu błony tylakoidu, a to z powodu gęsto rozmieszczonych, dużych i wyraźnych cząstek znajdujących się na stosunkowo gładkim podłożu. Z analizy wielkości cząstek (ryc. 7) wynika, że chociaż wymiary cząstek wahają się w granicach 80–200 Å, to większość zgrupowana jest w dwóch zakresach: $<140 \text{ Å}$ i $>140 \text{ Å}$. Powierzchnia PF_s jest komplementarna do powierzchni EF_s . Wydaje się „chropowata”, ponieważ zawiera mieszaninę dużych jamek i małych cząstek. Jak widać na histogramie, cząstki PF_s są dość jednorodne pod względem wymiarów i średnio mniejsze (przeciętna średnica 80 Å) niż cząstki obecne na pozostałych powierzchniach. Powierzchnia EF_u często stanowi kontynuację powierzchni EF_s . Znajdują się na niej liczne jamki oraz populacja cząstek o wymiarach zbliżonych do mniejszych cząstek powierzchni EF_s . Są one jednak rzadko rozmieszczone. Powierzchnia PF_u , komplementarna do powierzchni EF_u , ma najgęściej upakowane cząstki. Histogram ujawnia, że cząstki tworzą tutaj jakby dwie kategorie wielkości — $<100 \text{ Å}$ i $>100 \text{ Å}$. Liczne późniejsze badania z zastosowaniem techniki kriorytownictwa potwierdziły istnienie w tylakoidach takich samych czterech rodzajów powierzchni, jakie Goodenough i Staehelin [97] przedstawili dla *Chlamydomonas*. Zgodność dotyczy również wielkości (z małymi wahaniami) i zagęszczenia cząstek [230 i cyt. tam lit.]. W roku 1976 Staehelin [229] wykazał, że wszystkie cząstki powierzchni EF_s i EF_u były strukturalnie bardzo zbliżone do siebie (mimo różnej średnicy) i najprawdopodobniej miały identyczny rdzeń. Przedstawił ponadto propozycję, by cząstki EF traktować jako strukturalne ekwiwalenty kompleksów PS II. Te podstawowe hipotezy zostały potwierdzone w późniejszych badaniach. Całkowity np. brak cząstek EF był opisywany w tylakoidach, dla których nie dało się stwierdzić istnienia aktywności PS II.

W pierwszej połowie lat siedemdziesiątych pojawiło się wiele prac, w których donoszono o wzroście wymiarów cząstek EF w czasie zazieleniania się etioplastów w świetle. Jednak żadne z przeprowadzonych badań nie ustaliły ściślejszej zależności między specyficznymi, biochemicznymi parametrami a określonymi kategoriami wewnątrz błonowych cząstek. Problem ten został rozwiązany dopiero w 1977 r. przez Armonda i wsp. [23], którzy badali proces zazieleniania się w ciągłym świetle plastydów grochu poddanych uprzednio naświetlaniu przerywanym światłem. W rosnących przez 7 dni w ciemności siewkach eksponowanych przez 2 dni na przerywane światło (cykle: 2 min światło, 2 godz. ciemność), plastydy zawierały jedynie długie, równoległe względem siebie ułożone lamelle z bardzo małą liczbą regionów, gdzie błony zachodziły na siebie.

Wykonane analizy biochemiczne ujawniły, że tylakoidy plastydów oświetlane przerywanym światłem były całkowicie zdolne do przeprowadzania wszystkich procesów wiązania fotochemicznej energii [69]. Nie miały jednak zbierających energię kompleksów chlorofil a/b białko (LHC), chlorofilu b i regionów zespolonych błon. Kiedy rośliny zaczęto oświetlać ciągłym światłem, wtedy obserwowano szybkie wbudowywanie LHC do błon tylakoidów i równoczesne tworzenie się gran. Elektronogramy kriorytów tylakoidów ujawniły ponadto, że plastydy nie oświetlone ciągłym światłem miały przypadkowo rozmieszczone 80 Å cząstki EF, podczas gdy tylakoidy eksponowane na ciągłe światło cechowała proliferacja kilku kategorii większych cząstek EF: 105, 132 i 164 Å (ryc. 8). Ponieważ temu



Ryc. 8. Histogram klas wielkości cząstek obecnych na powierzchni EF_s błony tylakoidowej roślin oświetlonych najpierw światłem przerywanym, a następnie wystawionych przez 8 godz. na światło ciągłe. Diagram umieszczony powyżej każdego wierzchołka określa typ kompleksu, który najprawdopodobniej warunkuje powstanie owego wierzchołka (II oznacza centrum reakcji PS II, LHC — zbierający energię kompleks chlorofil a/b białko) [230]

wzrostowi wymiarów cząstek EF towarzyszyło wbudowywanie LHC do tylakoidów, Armond i wsp. [23] przyjęli więc, że 80 Å cząstki EF odpowiadały rdzeniowi (centrum reakcji) PS II, a w czasie zazieleniania się 1, 2 i 4 agregaty LHC przyłączały się do centrum, dając w efekcie odpowiednio 105, 132 i 164 Å wielkości cząstki (ryc. 8). Zgodna z tym poglądem jest również informacja, że tylakoidy pozbawionego chlorofilu b mutantu jęczmienia nie miały ani LHC, ani też dużych, typu 164 Å, cząstek EF_s [168].

Przyjmując za podstawę liczbę cząstek EF_u, obliczono, że prawie 15–20% PS II powinno być zlokalizowanych w regionach błon kontaktujących się ze stromą [21]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach immu-

nologicznych [137, 202] i cytochemicznych [132, 188]. Wszystkie te dane przemawiały za wyraźnym wzbogaceniem regionów przegród w PS II, mało natomiast jest danych o rozmieszczeniu PS I. Z wyników badań otrzymanych techniką kriorytownictwa wiadomo, że cząstki PF reprezentują:

1. jednostki PS I;
2. „wolne” (tzn. nie połączone z PS II) jednostki LHC;
3. kompleksy cytochrom b_6-f ;
4. wewnątrzłonowy oligomer (CF_o) – syntetazy ATP (H^+ -ATP-azy).

Wyizolowane i oczyszczone kompleksy PS I po wbudowaniu ich w liposomy ujawniały się na replikach kriorytów jako cząstki o średnicy około 106 Å [178]. Porównywalne preparaty oczyszczonych LHC miały cząstki o średnicy około 80 Å [161, 176], a wewnątrzłonowe oligomery syntetazy ATP około 100 Å [Arntzen, cyt. za 230].

Na podstawie wyników badań uzyskanych techniką kriorytownictwa mutantów pozbawionych PS I stwierdzono, że mogą być one zlokalizowane tylko w błonach mających bezpośredni kontakt ze stromą [167]. Znaczny udział w analizie rozmieszczenia kompleksów chlorofilowobiałkowych między regionami zespolonych i niezespolonych błon należy przypisać Anderssonowi i Andersonowi [14]. Za pomocą elektroforezy z udziałem SDS uzyskali oni dwie frakcje. Jedna z nich (obejmująca błony przegród) była silnie wzbogacona w LHC i CPa (chlorofilowobiałkowy kompleks centrum reakcji PS II [13]), a bardzo zubożona w CP I (chlorofilowobiałkowy kompleks centrum reakcji PS I [13]). Druga natomiast (obejmująca regiony tylakoidów kontaktujące się ze stromą) była wzbogacona w CP I, a zubożona w CPa i LHC. Andersson i Anderson [14] uważając, że małe ilości PS I, spotykane przez nich w pierwszej frakcji, należy traktować jako swego rodzaju „zanieczyszczenia”, postawili hipotezę, według której wszystkie PS I są zlokalizowane w regionach błon będących w bezpośrednim kontakcie ze stromą (tzn. tylakoidach stromy, a w obrębie gran tylko w krańcowych błonach i w brzegach). PS II zaś i LHC w największych ilościach byłyby obecne w przegrodach, a w znacznie mniejszej ilości w błonach pozostałych regionów tylakoidów. Do podobnych wniosków doszli Anderson i Melis [12]. Z kolei Vaughn i wsp. [252] posługując się metodami cytochemicznymi oraz immunocytochemicznymi uzyskali dane, z których wynika, że PS I i PS II są jednak obecne zarówno w granach, jak i w tylakoidach stromy, przy czym PS II jest zlokalizowany przeważnie (ale nie wyłącznie) w tylakoidach gran. Z innych białek tylakoidowych znana jest również lokalizacja kompleksu H^+ -ATP-azy (tzn. $CF_1 \cdot CF_o$ ATP syntetazy). Obecność na zewnętrznej powierzchni błon tylakoidowych peryferycznej części tego kompleksu, zwanej czynnikiem sprzęgającym CF_1 [160], wykazały badania immuno-

logiczne [109, 160]. Po wyizolowaniu cząstki reprezentujące czynnik sprzęgający miały średnicę około 10 nm, współczynnik sedimentacji równy 13 S [113], masę cząsteczkową około 326 000 [84, 85] i wykazywały aktywność ATP-azy zależnej od Ca^{2+} [92, 113]. Na podstawie analizy cienkich skrawków zaproponowano początkowo równomierne rozmieszczenie tego czynnika wzdłuż błon [191]. Jednak Miller i Staehelin [169] uzyskali inne wyniki. Wykorzystując opisany w 1966 r. przez Izawę i Gooda [116] fakt pozwalający w warunkach *in vitro* sterować łączeniem się tylakoidów w grana i ich rozłączaniem, przeanalizowali rozmieszczenie cząstek białkowych w błonie tylakoidów połączonych w grana, rozłączonych (przy niskiej koncentracji jednowartościowych kationów) i ponownie połączonych. Wykazali oni, że:

(a) prawie 30% cząstek powierzchni PS stanowiły cząsteczki karboksylazy/oksygenazy RuBP;

(b) CF_1 zlokalizowany był tylko w regionach błon kontaktujących się ze stromą, a nie w przegrodach;

(c) cząstki czynnika sprzęgającego mogą przemieszczać się wzdłuż błon tylakoidowych (rozłączenie tylakoidów spowodowało redystrybucję cząstek wzdłuż błon, a ponowne połączenie w grana przyczyniło się do segregacji tych cząstek).

Segregację CF_1 w regionach błon tylakoidowych, kontaktujących się ze stromą, wykazali także Murakami i Kunieda [179] na podstawie analizy cienkich skrawków w transmisyjnym mikroskopie elektronowym.

W roku 1979 Jennings i wsp. [120] opublikowali dane dotyczące lokalizacji aktywności reduktazy ferredoksyna-NADP w zespolonych i niezespolonych tylakoidach. Wynika z nich, że enzym ten zlokalizowany był tylko w regionach błon, które bezpośrednio kontaktowały się ze stromą.

Badano także rozmieszczenie cytochromów w błonach tylakoidów. Wyniki ostatnich badań [8, 67] wskazują na równomierne rozmieszczenie kompleksu cytochrom b_6-f w błonach tylakoidów.

NIEKTÓRE MODELE ILUSTRUJĄCE BUDOWĘ BŁONY TYLAKOIDOWEJ

Należy zaznaczyć, że do tej pory nikomu nie udało się zaproponować modelu przedstawiającego budowę błon tylakoidowych, który nie budziłby zastrzeżeń. Brak jest bowiem odpowiednich metod, które umożliwiałyby uzyskiwanie jednoznacznych wyników.

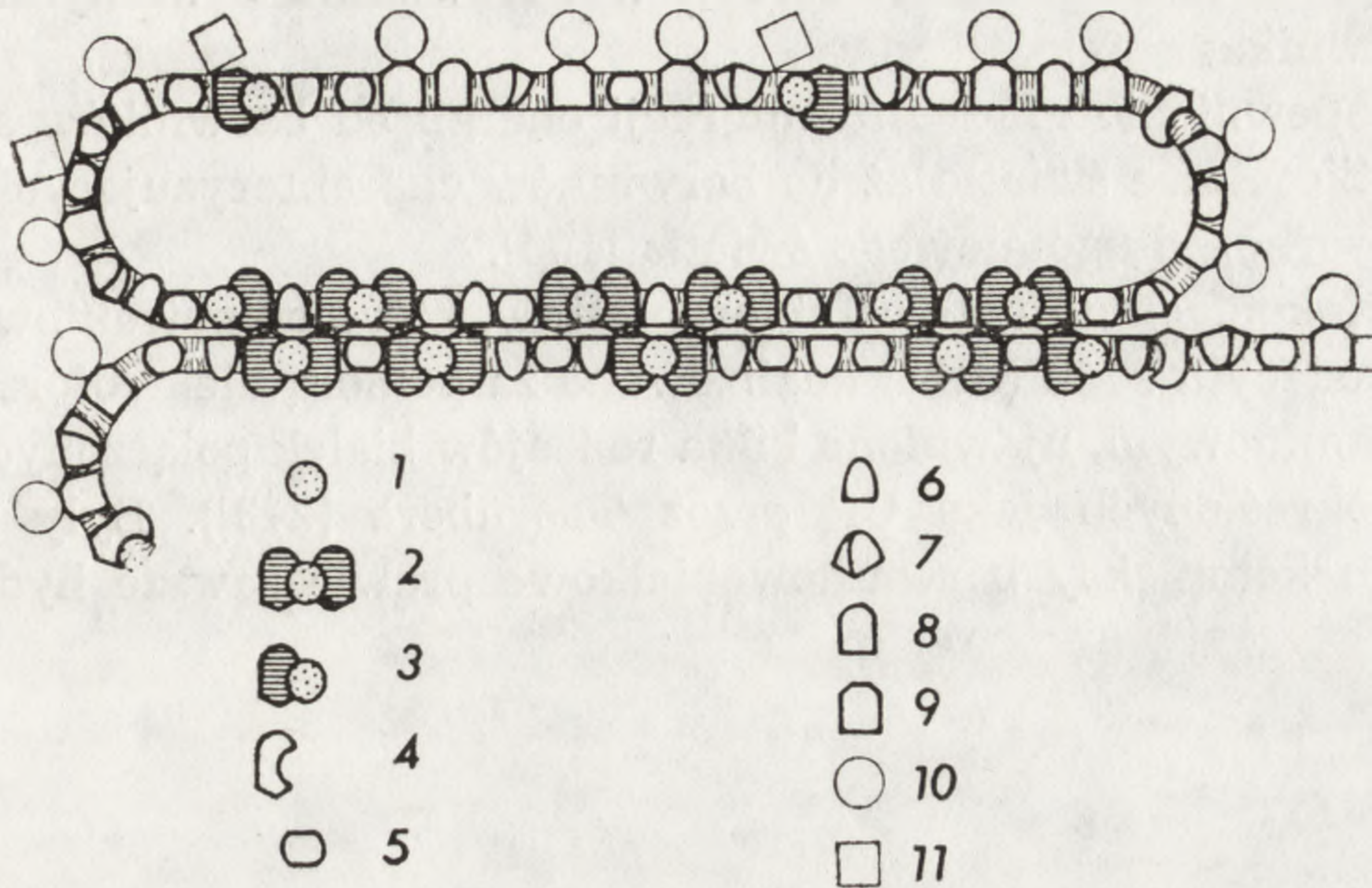
Do niedawna dość często cytowany był w piśmiennictwie model opracowany przez Weiera i Bensona [257]. Obecnie odpowiednikiem powszechnie akceptowanego mozaikowego modelu błony komórkowej Singera i Nicolsona [227] jest kolejny model błony tylakoidowej zapropono-

wany przez Kirka [133]. Zakłada on istnienie dwóch warstw lipidowych, których polarne grupy zwrócone są na zewnątrz. W warstwach tych „zanurzone” są co najmniej dwa rodzaje cząstek białkowych. Większe z nich były, zdaniem Kirka [133], złożone z czterech podjednostek. Inne białka (np. czynnik sprzęgający CF_1 , karboksylaza RuBP) są na tym modelu luźno związane z powierzchnią błony tylakoidu, która kontaktuje się ze stromą. Cząsteczki chlorofilu nie tworzą oddzielnej warstwy, lecz występują w powiązaniu z białkami w postaci wspomnianych już dwóch kategorii cząstek. Z modelu Kirka [133] wynika również, że nie całe zewnętrzne partie błony tylakoidu są zbudowane z białek, lipidy mogą więc kontaktować się bezpośrednio z wnętrzem tylakoidu (lokulusem) i ze stromą.

W roku 1975 Branton i wsp. [52], o czym wspomniano już tu, wprowadzili nową terminologię do oznaczania odpowiednich powierzchni błon komórkowych ujawnionych przy zastosowaniu techniki kriorytownictwa. Pozwala ona zrezygnować z dotychczasowych, abstrakcyjnych określeń typu: powierzchnia A, B, C i D [97, 195]. W odniesieniu do powierzchni błony tylakoidowej Staehelin [229] zastosował nieco zmodyfikowaną terminologię Brantona i wsp. [52]. Wykryto też, że wewnątrz błon tylakoidu obecne są nie dwie, a cztery główne kategorie cząstek [166, 229], z których dwie uwidaczniały się na powierzchniach EF (w dawnej terminologii powierzchnie B, albo wewnętrzne powierzchnie utworzone w wyniku przełamania), a dwie na powierzchniach PF (powierzchnie C, albo zewnętrzne powierzchnie utworzone w wyniku przełamania). Stwierdzono także, że duże cząstki (14–16 nm), wykryte na powierzchni ES (czyli od strony lokulusa, dawniej powierzchnia D lub wewnętrzna powierzchnia), są tam obecne tylko wtedy, gdy tylakoidy są połączone w grana [97, 169, 190, 229]. W związku z tym uważa się je za wyznaczniki regionów, w których błony są ze sobą zespolone. Staehelin [229] wykazał, że te „wystające” z bardzo gładkiego podłoża cząstki odpowiadają cząstkom powierzchni EF i stanowią strukturalne ekwiwalenty kompleksów PS II + LHC. Miller [166] natomiast uważa, że te same tetrameryczne cząstki były widoczne zarówno na powierzchni EF, jak i ES, a także jako małe „wzgórki” na powierzchni PS. Ustalona wydaje się też funkcja niektórych dużych cząstek powierzchni PS (są to np. oligomery CF_1 , reduktaza ferrodoksyna – $NADP^+$, karboksylaza/oksygeneza RuBP).

Identyfikacja i lokalizacja głównych składowych elementów błon tylakoidu pozwoliła na konstrukcję bardziej dokładnego modelu [230] (ryc. 9) niż poprzednie. Nadal jednak lokalizacja wielu elementów błony pozostaje kontrowersyjna. Odnosi się to m.in. do lokalizacji PS I i PS II.

Tak więc pomimo opracowania wielu modeli ilustrujących budowę błony tylakoidu, organizacja tej struktury na poziomie molekularnym nadal pozostaje nie do końca poznana.



Ryc. 9. Model błony tylakoidowej chloroplastów roślin wyższych i zielenic, zakropkowane elementy dają początek cząstkom EF, pozostałe — cząstkom PF. Rozmieszczenie różnych typów cząstek między regionami zespolonymi i niezespolonymi zostało oparte na wynikach doświadczalnych, natomiast rozmieszczenie cząstek PF jest hipotetyczne [230]

1. centrum reakcji PS II (8 nm cząstki EF), 2. PS II z kompletem zbierających energię kompleksów chlorofil a/b białko = LHC (> 14 nm cząstki EF_s), 3. PS II z niepełnym zespołem kompleksów zbierających energię (< 14 nm cząstki EF_s i EF_u), 4. „wolne” LHC, 5. kompleks cytochrom b₆ — f, 6. centrum reakcji PS I, 7. PS I + LHC, 8. kompleks wiążący rybosomy, 9. CF₀ (wewnątrz błonowy oligomer ATP-azy), 10. CF₁ (zewnątrz błonowy oligomer ATP-azy), 11. karboksylaza/oksygenaza RuBP

CHARAKTERYSTYKA KOMPLEKSÓW UTWORZONYCH W TYLAKOIDACH PRZEZ POŁĄCZENIE SIĘ BIAŁEK Z INNYMI SKŁADNIKAMI

Błony tylakoidowe chloroplastów wyższych roślin zawierają pięć integralnych kompleksów białkowych [24]:

1. kompleks białko — P₇₀₀ chlorofil a (PS I);
2. kompleks fotoukładu II (PS II);
3. zbierający energię kompleks chlorofil a/b białko (LHC);
4. kompleks plastydowej ATP-azy (CF₀—CF₁ ATP syntetazy);
5. kompleks cytochrom b₆/f obejmujący także składnik określany mianem „Rieske FeS białko”.

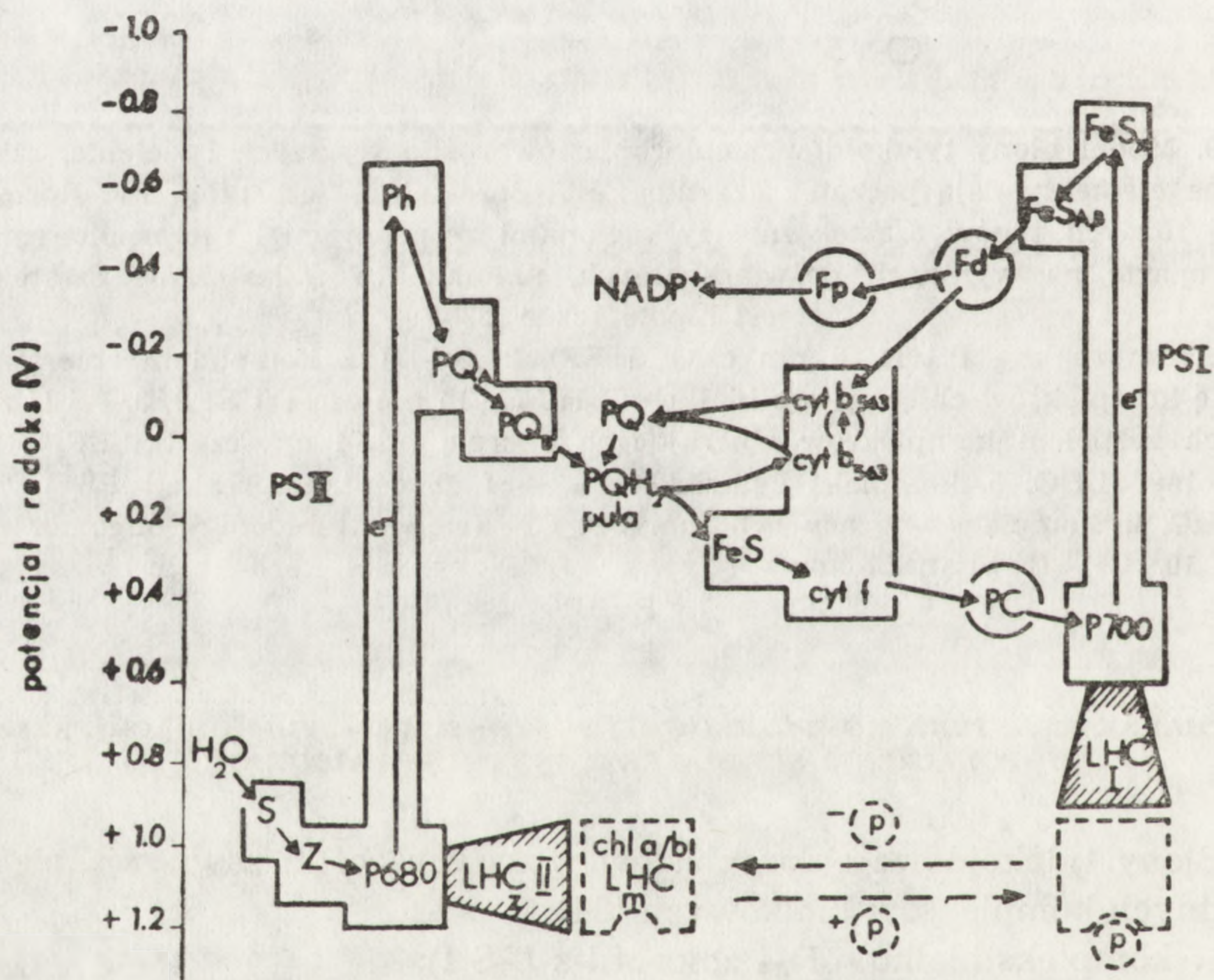
We wszystkich fotosyntezujących organizmach chlorofil jest niekovalentnie połączony z białkami [111, 129, 245]. Przyłączenie barwników do białek zwiększa skuteczność przekazywania zaabsorbowanej energii świetlnej m.in. przez:

- (a) utrzymanie wysokiej lokalnej koncentracji barwników (regulując zarówno orientację, jak i odległość między cząsteczkami barwników);

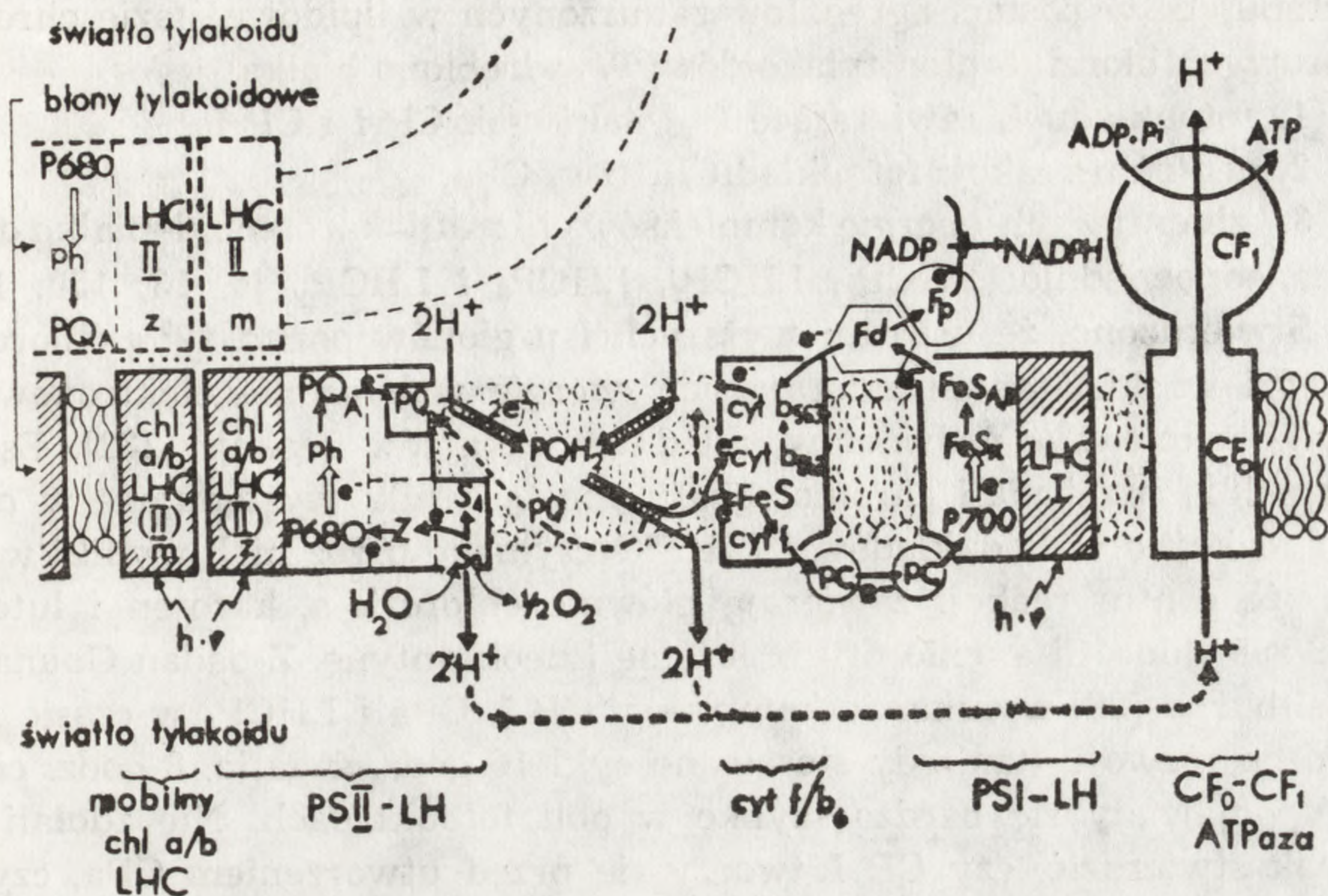
(b) poszerzenie pasma absorpcji w porównaniu z wolnymi cząsteczkami barwnika;

(c) zapewnienie gradientu migracji energii od barwników absorbujących krótkofalowe światło aż do barwników charakteryzujących się zdolnością absorpcji długofalowego światła [100].

W tylakoidach dojrzałych chloroplastów, które po potraktowaniu siarczanem dodecyłu sodu (SDS) analizowano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, ujawniono kilka rodzajów białek połączonych z barwnikami (określonych jako CP przez Thornbera [243]). Były to przede wszystkim kompleksy barwnikobiałkowe prawie zawsze hydrofobowe,



Ryc. 10. Schemat niecyklicznego i cyklicznego przepływu elektronów w procesie fotosyntezy. Na rzędnej oznaczono wartości potencjałów oksydoredukcyjnych każdego przenośnika (uwaga: zakresowane elementy nie zostały ujęte w tej skali). Wielokąty przedstawiają kompleksy utworzone z cząsteczek integralnych błonowych białek. Odpowiadają one kompleksom pokazanym na ryc. 11. Kółkami oznaczono białka rozpuszczalne w wodzie. Cykl Q obejmujący utlenianie dwóch cząsteczek plastohydrochinonu (PQH_2), a następnie redukcję jednej cząsteczki plastoquinonu (PQ) przez składniki kompleksu cytochromu b_6-f , wzbogaca wnętrze tylakoidu w dodatkowy proton na każdą przetransportowaną przez przenośniki parę elektronów. Zaznaczono również zależną od fosforylacji, odwracalną migrację mobilnych LHC między PS II i PS I. Skrótly objaśniono przy ryc. 11 [232]



Ryc. 11. Organizacja składników błony chloroplastowej, które biorą udział w fotosyntetycznym transporcie elektronów. Strzałki zaznaczone ciągłą cienką linią wskazują kierunek przekazywania elektronów, strzałki o jasnym wnętrzu — przemiany chemiczne, strzałki utworzone z ciągłej grubej linii — ruch protonów, natomiast strzałki kreskowane oznaczają drogi PQ. W liniowym transporcie elektronów z wody do NADP uczestniczą trzy wyraźne, strukturalne kompleksy: PS II, skąd elektrony są przekazywane do kompleksu cytochrom b_6-f za pomocą cząsteczek PQ oraz PS I, otrzymujący elektrony z kompleksu cytochromów za pośrednictwem rozpuszczalnego w wodzie białka — plastocyjaniny. Pokazano także transport elektronów w cyklu Q, dzięki któremu następuje przemieszczenie do wnętrza tylakoidu jednego dodatkowego protonu na każde dwa elektrony przeniesione przez łańcuch przenośników. Protony przekazane do wnętrza tylakoidu „wydostają się” na zewnątrz tylakoidu przy udziale kompleksu CF_0-CF_1 ATP syntetazy. Zbierające energię świetlną kompleksy barwnikobiałkowe (LHC) służą obu fotoukładom, przy czym LHC preferencyjnie związane z PS I oznaczono jako LHC I, a z PS II jako LHC II. Wśród LHC istnieje populacja „mobilnych LHC” (m) [162]. Może ona służyć zarówno PS I, jak i PS II dzięki zdolności do przemieszczania się między lamellami stromy (wzbogaconymi w centra reakcji PS I) a granami (wzbogaconymi w PS II)

Objaśnienia skrótów użytych na rys. 10 i 11: chl a/b LHC — zbierający energię świetlną kompleks chlorofil a/b — białko, S i Z enzymy uczestniczące w rozkładzie wody i wydzielaniu O_2 . Przekazują one elektrony do P680, P 680 — centrum reakcji PC II, Ph — związana feofityna a (pierwotny akceptor elektronów z PS II), PQ_A i PQ_B — cząsteczki związanych plastochinonów, PQ i PQH_2 — plastochinon i zredukowany plastochinon, FeS — Rieske FeS białko, cyt. f i cyt. b_{563} — cytochromy f i b_{563} (b_6), PC — plastocyjanina, P 700 — centrum reakcji PS I, FeS_x — specjalne centrum FeS służące jako pierwotny akceptor elektronów z PS I, FeS_{AB} — dwa inne centra FeS, Fd — ferredoksyna, F_p — flawoproteid (reduktaza ferredoksyna — NADP), NADP — fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, CF_0 i CF_1 oligomery, ATP-azy, ADP i ATP — adenozylo di- i trifosforan, hv — energia świetlna

[232]

występujące w postaci agregatów zanurzonych w lipidowej fazie chromatoforowych błon lub błon tylakoidów. Wyodrębniono białka:

1. fotoukładu I, zawierające P_{700} , takie jak CP I i CP Ia;
2. centrum reakcji fotoukładu II, tzw. CPa;
3. zbierających energię kompleksów chlorofil–karotenoid–białko oznaczone odpowiednio: LHCP₁, LHCP₂, LHCP₃ i LHCP_y [6, 13, 150, 151].

Stwierdzono, że u roślin wyższych i u glonów ponad 99% chlorofilu wchodzi w skład anten zbierających energię wzbudzenia elektronowego, a tylko około 1% wchodzi w skład tzw. centrów reakcji [232]. Eskins i wsp. [82] przebadali chromatograficznie barwniki występujące w centrach reakcji obu fotoukładów i LHC. Otrzymane przez nich wyniki wskazują, że centra reakcji zawierają głównie chlorofil a, karoten i luteinę, LHC zaś chlorofil a, chlorofil b, luteinę i neoksantynę. Z badań Gounarisa i Wellburna [99] wynika, że kompleksy CP I, CPa i LHCP₃ w czasie normalnego rozwoju (tzn. gdy stosowano cykl 16 godz. światło, 8 godz. ciemność) pojawiały się bardzo szybko w obu fotoukładach. Nie zdołali oni jednak stwierdzić, czy CP I tworzy się przed utworzeniem CPa, czy po jego utworzeniu. Wyniki te [99] informują ponadto, że w procesie zazieleniania się (gdy oświetlano rośliny po 7 dniach trzymania ich w ciemności) karotenoidy mogą się łączyć z białkami zanim jeszcze zostanie dołączony chlorofil a.

W chloroplastach znajdują się dwa rodzaje centrów reakcji, które działają w serii, jak pokazano na ryc. 10, 11 [68]. W centrum reakcji PS II występuje chlorofil a, wykazujący maksimum absorpcji przy 680 nm. Z kompleksem centrum reakcji PS II związana jest również część puli plastochinonu (oznaczona przez PQ_A), pełniąca funkcję pierwotnego akceptora elektronów [5]. Centrum zaś reakcji PS I zawiera chlorofil a absorbujący światło o długości fali 700 nm oraz kompleks, którego składnikami są żelazo i siarka (Fe–S_x). Działa on jako pierwotny akceptor elektronów [68]. Trzecim głównym składnikiem tylakoidowej błony są kompleksy polipeptydów uczestniczące w reakcji sprzęgania (wiązania) energii fotosyntetycznej. U roślin wyższych i zielenic większość błon tylakoidowych tworzy rejony, w obrębie których są one ściśle ze sobą zespolone (grana) oraz rejony niezespolonych błon (tylakoidy stromy). Jak już wcześniej podkreślono, zarówno badania morfologiczne, jak i biochemiczne wykazały, że rejony przegród i błon niezespolonych mają różną organizację strukturalną i skład chemiczny (tab. 2).

1. *Kompleks białko– P_{700} chlorofil a (PS I)*. Kompleks ten obejmuje centrum reakcji PS I (P_{700}) i cząsteczki antenowych chlorofili a (wg [178] absorbujących światło długofalowe 680–700) [244]. Kontrowersyjne pozostają nadal dane dotyczące liczby i mas cząsteczkowych polipeptydu (ów),

TABELA 2

Przestrzenne rozmieszczenie składników błon chloroplastowych według [233]

Składnik	Zespólone błony (przegrody gran) [%]	Niezespólone błony (tylakoidy stromy) [%]	Literatura
PS II	85	15	[7, 14, 21, 229]
PS I	15	85	[7, 14]
cyt b ₆ -f	0–50 (?)	50–100 (?)	[8, 67, Henry, Moller 1981, cyt. za 233]
LHC	70–90 (zawartość zależ- na od fosforylacji)	10–30 (zawartość za- leżna od fosfo- rylacji)	[7, 14, 142]
syntetaza ATP	0	100	[169]

które stanowią białkową część centrum reakcji. Kilku autorów stwierdziło, że zawiera ono tylko jeden rodzaj polipeptydu o masie 60–70 kd [34, 61, 156, 203]. Inni natomiast [np. 254] podają dwa rodzaje: o masie 58 i 62 kd. Ponieważ obserwowano je w kompleksach P₇₀₀ chlorofil a — białko wszystkich gatunków roślin przebadanych do roku 1983 [254], można przypuszczać, że wcześniejsze dane (wskazujące na obecność tylko jednego rodzaju polipeptydu) były wynikiem zbyt niskiej rozdzielczości elektroforezy w żelu. Część białkowa kompleksu P₇₀₀ chlorofil a — białko jest kodowana przez chloroplastowy DNA [80]. Westhoff i wsp. [261] zidentyfikowali miejsce tego genu na chloroplastowym DNA szpinaku. Jest to pojedynczy gen, więc przedstawione już tu dane o różnicach w strukturze pierwotnej są albo artefaktem powstałym w czasie izolacji, albo — co jest bardziej prawdopodobne — mogą być wynikiem różnicującego potranslacyjnego dojrzewania białka lub różnicującego potranskrypcyjnego dojrzewania mRNA dla białkowej części kompleksu P₇₀₀ chlorofil a — białko. W odniesieniu do tej drugiej możliwości brak jednak dowodów. Vierling i Alberte [254] uważają więc, że polipeptydy o masach 58 i 62 kd reprezentują dwie formy pojedynczego składnika.

Badano także biosyntezę polipeptydów związanych z P₇₀₀ in vivo, głównie w celu ustalenia, w jakim stopniu proces ten zależy od światła i nagromadzenia się chlorofilu. Rezultaty, jakie uzyskano (używając do badania rozwijających się chloroplastów jęczmienia), nie wskazują, aby światło czy tempo syntezy chlorofilu mogły w bezpośredni sposób kontrolować syntezę tych polipeptydów [255].

Oprócz opisanych polipeptydów w preparatach PS I są obecne tak-

że polipeptydy o niewielkich (niższych od 25 kd) masach cząsteczkowych, np. [187].

Część autorów uważa, że nie są one wymagane dla aktywności P_{700} in vivo, chociaż mogą działać stabilizująco na kompleks.

2 i 3. *Kompleks fotoukładu II + zbierający energię kompleks chlorofil a/b białko (LHC)*. W skład fotoukładu II wchodzi, jak już wspomniano tu; (a) centrum reakcji (P_{680}) biorące, podobnie jak P_{700} w PS I, bezpośredni udział w transporcie elektronów; (b) plastochinon (PQ_A , ryc. 11) będący pierwotnym, stabilnym akceptorem elektronów [5]; (c) barwniki tworzące anteny energetyczne. Ich funkcją jest przekazywanie zaabsorbowanej energii na centra reakcji. W centrum reakcji PS II białkową część reprezentują od cztery do pięciu rodzajów polipeptydów o masach cząsteczkowych wynoszących 47, 43, 32, 30 i 10–7 kd [215], z których najprawdopodobniej tylko dwa większe (47 i 43 kd) wiążą barwniki fotosyntetyczne.

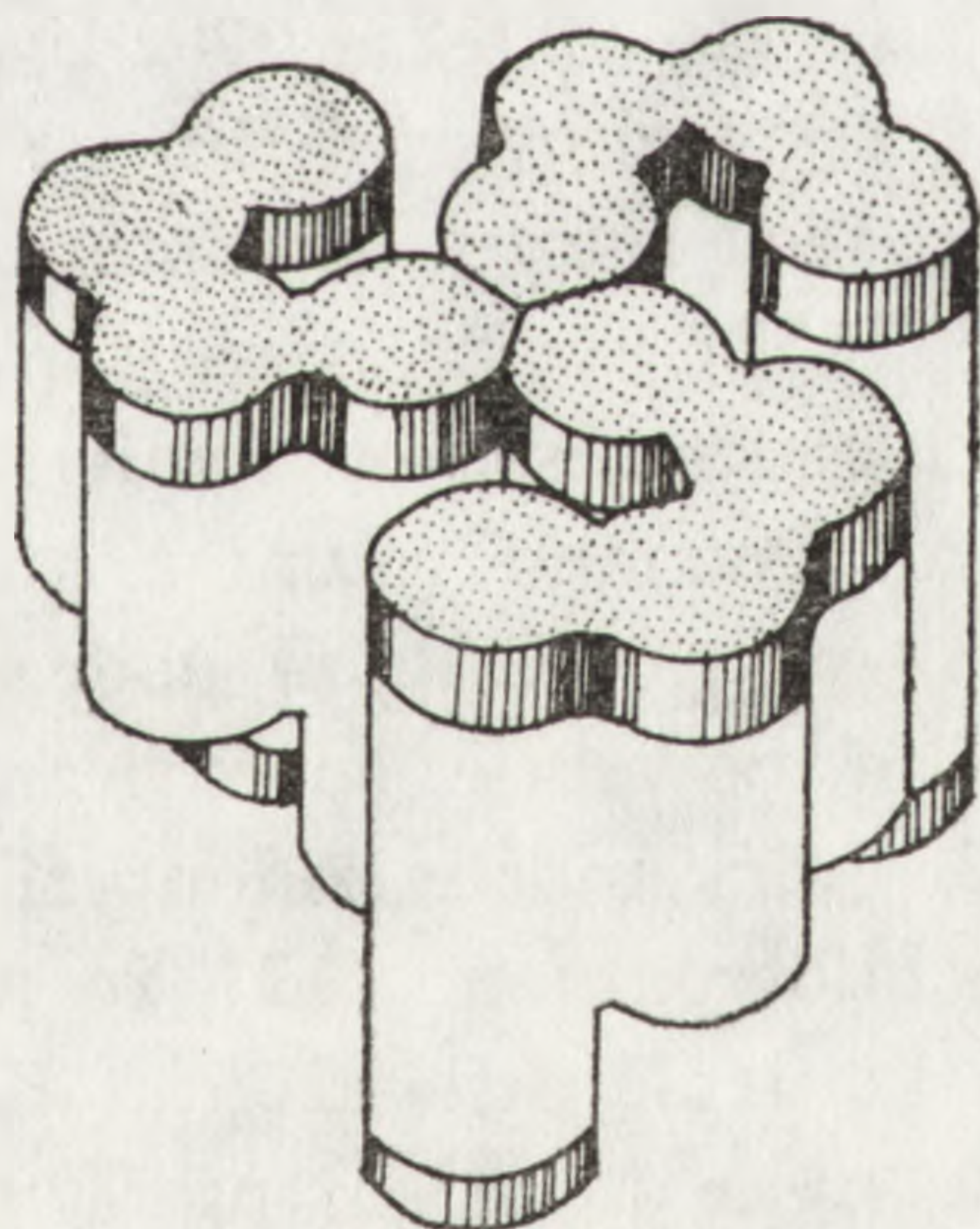
Badania przeprowadzone w latach siedemdziesiątych wykazały, że oprócz poznanych już fotoukładów (PS I i PS II), barwniki fotosyntetyczne tworzą w błonach tylakoidowych także trzeci zespół, który nazwano LHC [243]. W jego skład, w całkowicie dojrzałych chloroplastach, wchodzi aż 50–60% wszystkich barwników chlorofilowych, przy czym z PS I związane są chlorofile absorbujące najbardziej długofalowe światło (680–700) [178]; PS II wyposażony jest w chlorofile o maksimach absorpcji między 670–680 nm [72, 215], LHC natomiast zawiera chlorofil b, którego maksimum absorpcji (w wyizolowanych kompleksach) wynosi 650 nm (czerwień), chlorofile zaś a absorbują światło o długości 660 i 680 nm [176].

LHC funkcjonuje jako molekularna antena zbierająca energię słoneczną, reguluje przekazywanie energii wzbudzenia na centra reakcji PS II i PS I (np. praca przeglądowa Włoch [269]). Proces ten zależy od fosforylacji białkowej części LHC [40]. Kompleks pośredniczy również w interakcji błon tylakoidowych, prowadzącej do powstawania stosów zespolonych błon gran [25, 70].

Jak już wspomniano, wymiary cząstek na powierzchniach EFs i EFu błony tylakoidowej zmieniały się wraz ze zmianą liczby LHC, które przyłączyły się do 8 nm cząstek stanowiących centrum reakcji PS II (ryc. 8) [21]. Późniejsze badania ujawniły ponadto istnienie dodatkowej puli jednostek LHC nie przyłączonych do PS II [226, 231, 270]. Jednostki te tworzyły około 8 nm średnicy cząstki na powierzchni PF i zostały przez Staehelina i Arntzena [232] nazwane „mobilnymi jednostkami LHC”, dla odróżnienia od „związanych jednostek LHC”, przyłączonych do kompleksów PS II. Są dowody wskazujące, że mobilne LHC są odpowiedzialne za

adhezję tylakoidów i dlatego są one obecne przede wszystkim w regionach gran.

Natywny LHC jest najprawdopodobniej oligomerem złożonym z identycznych podjednostek [211, 239]. Stanowi on strukturalną i funkcjonalną jednostkę tylakoidowej błony chloroplastu, którą można izolować [55]. W skład LHC wchodzi chlorofil a i b, przy czym $a : b \approx 1$, luteina i neoksantyna oraz jeden do kilku polipeptydów o masach cząsteczkowych od 21 000 do 29 000 [15, 16, 55, 77, 157, 211]. Każdy polipeptyd łączy się z 6–11 cząsteczkami chlorofilu a, i z 6–11 cząsteczkami chlorofilu b oraz z mniejszą liczbą cząsteczek karotenoidów [175, 245]. Wielkość stosunku chlorofilu a do b wskazuje, że chlorofil b jest zlokalizowany głównie, jeżeli nie wyłącznie w tym zespole barwników. Interesującą własnością LHC, która odróżnia go od innych chlorofilowobiałkowych kompleksów, jest zdolność LHC do tworzenia kryształów w warunkach *in vitro* [176]. Kryształy takie były i są nadal badane np. za pomocą elektronowej mikroskopii i metodą dyfrakcji promieni X. Opublikowane ostatnio wyniki badań [138, 139] wykazały, że LHC grochu jest to wysoce asymetryczne białko zbudowane z dwóch rodzajów polipeptydów o masach cząsteczkowych 25 000 i 27 000. Jest on trimerym złożonym z trzech ekwiwalentnych podjednostek (monomerycznych LHC), które — zdaniem Kühlbrandta i wsp. [139] — są prawdopodobnie heterodimerami dwóch polipeptydów. Jedną stronę trimeru (określoną przez Kühlbrandta [138] mianem górnej strony) stanowią trzy haczykowształtne, nieco kań-



Ryc. 12. Schemat jednego kompleksu zbierającego energię (LHC). Trójrotna symetria kompleksu wskazuje, że jest to trimer złożony z trzech strukturalnie ekwiwalentnych podjednostek. Zakreskowane regiony przedstawiają część kompleksu wystającą z hipotetycznej, 4,5 nm podwójnej warstwy lipidowej. Płaszczyzna na górze kompleksu bierze najprawdopodobniej udział w interakcji błon poprzez siły van der Waalsa oddziałujące między cząsteczkami LHC w zespolonych błonach

[138]

ciaste płaty. Każdy płat jest prawdopodobnie złożony z trzech pionowo ukierunkowanych, w przybliżeniu cylindrycznych domen o średnicy około 1,5–2 nm, połączonych za pomocą węższych regionów (ryc. 12). Przeciwną stronę tworzą trzy podłużne występy. Górna strona kompleksu ma 3–4 razy większą powierzchnię niż strona przeciwna [138]. Przypuszczalnie ta, tak obszerna płaszczyzna na górnej stronie cząsteczek LHC, związana jest z funkcją, jaką pełni kompleks w interakcji między błonami. Jak wykazali Kühlbrandt i wsp. [139], odległość między zespolonymi listkami błon tylakoidowych wynosi 5,6–5,8 nm, co wystarcza, aby kompleksy LHC, znajdujące się w przylegających do siebie błonach, mogły się zbliżyć na tyle, by zaczęły między nimi działać siły van der Waalsa [30, 31]. Płaska górna powierzchnia cząstek LHC jest bardzo dogodna do tego celu. Inną możliwą funkcją tej części LHC jest według Kühlbrandta [138] zapewnienie warunków określonej orientacji antenowych chlorofili. Trzy występy na przeciwnym końcu mogą służyć jako zaczepy cząsteczki LHC w błonie i umożliwiać kontakt z chlorofilowo-białkowymi kompleksami PS II, które są ściśle związane z LHC [14].

Ostatnio została określona sekwencja aminokwasów dla większego polipeptydu LHC grochu i jego dokładna masa cząsteczkowa, która wynosi 28 512 [66]. Przyjmując założenie, że białko LHC ma taką samą gęstość jak bakteriorodopsyna, Kühlbrandt [138] podał, że masa cząsteczkowa LHC wynosi około 100 000. Jest to więc wartość niższa od przedstawionej przez Mc Donnel i Staehelina [161], według których masa cząsteczkowa kompleksu wynosi 202 000–234 000. Uwzględniając przyłączony chlorofil, wielkość masy cząsteczkowej LHC podana przez Kühlbrandta [138] wskazuje, że trimer jest raczej utworzony z trzech niż z sześciu polipeptydów. Kühlbrandt [138] uważa ponadto, że dwa rodzaje polipeptydów znalezione w LHC grochu są ekwiwalentne strukturalnie i mogą się wymieniać w trimerze. Poznano również nieco szczegółów dotyczących syntezy LHC. Wykazano np. [18], że podczas indukowanego światłem zazieleniania się roślin powstaje specyficzny produkt transkrypcji dla białkowej części LHC, który można zidentyfikować w obrębie frakcji poli-A mRNA. Następnie udowodniono [17], że proces powstawania tego mRNA znajduje się pod kontrolą fitochromu. Krótkotrwałe oświetlenie etiolowanych roślin czerwonym światłem nie wystarcza jednak do powstania kompletnego LHC. Drugim niezbędnym elementem do jego utworzenia jest fototransformacja protochlorofilidu a w chlorofilid a i synteza chlorofilu b. Chlorofile, a szczególnie chlorofil b są również niezbędne do wytwarzania stabilnego LHC [18, 19, 39]. Istnieje ponadto wyraźna korelacja między ilością chlorofilu b i LHC wbudowanego w błony tylakoidowe [221]. Wyniki badań strukturalnych, dotyczące LHC, a uzyskane w dużej mierze dzięki zastosowaniu techniki kriorytownictwa, opisano w rozdziale dotyczącym rozmieszczenia białek w błonach tylakoidów.

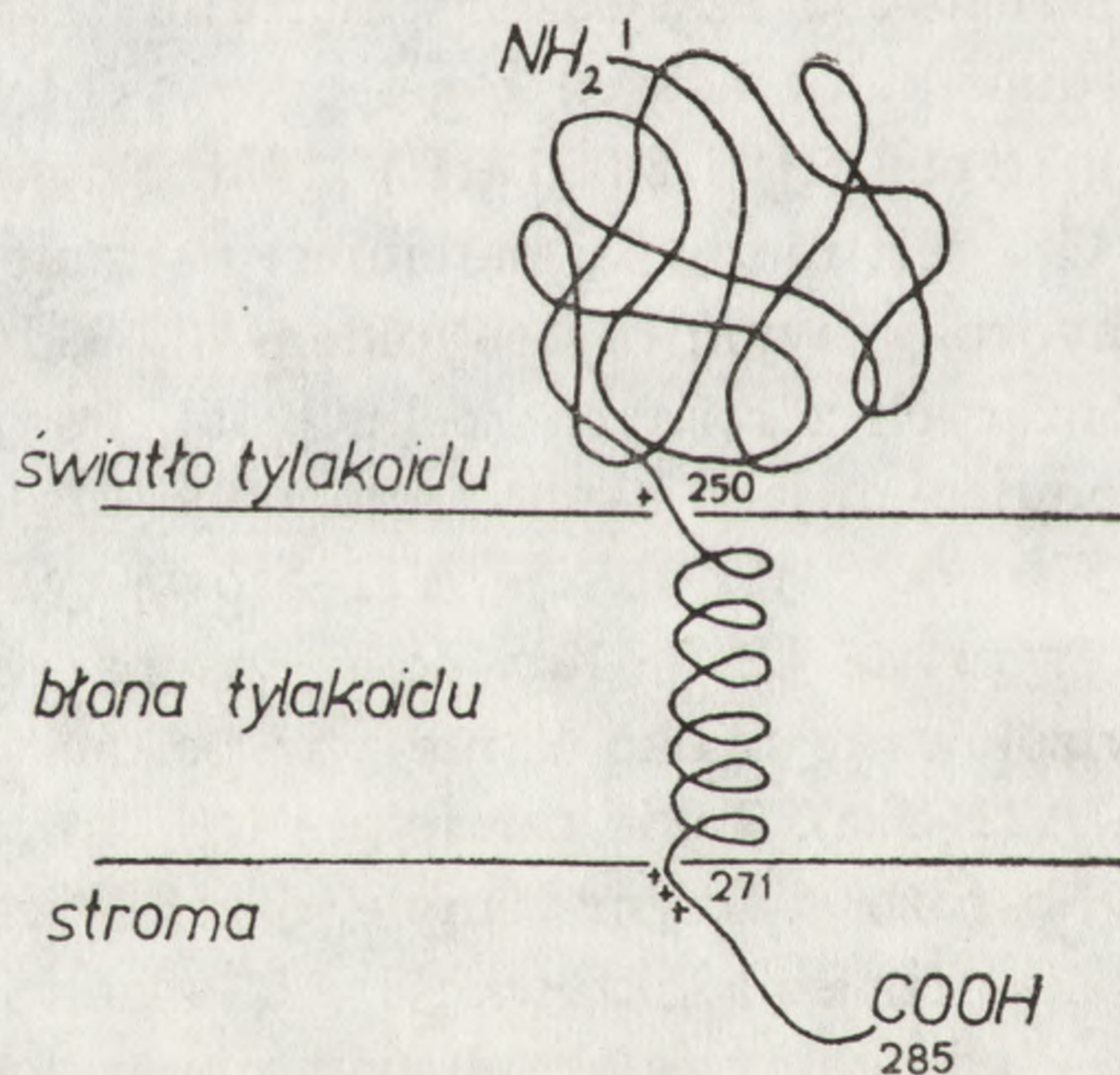
4. *Kompleks plastydowej ATP-azy (CF_0 - CF_1 ATP syntetazy)*. Związany z błoną tylakoidową kompleks ATP-azy składa się z peryferycznej części, zwanej czynnikiem sprzęgającym CF_1 , oraz z części integralnie związanej z błoną, zwanej CF_0 . CF_1 zbudowany jest z pięciu podjednostek: α , β , γ , δ , ϵ . Podjednostki α i β mają miejsca, do których przyłączają się nukleotydy, dlatego przyjmuje się, że tworzą one katalityczne centrum kompleksu. Podjednostka γ uczestniczy w konformacyjnych zmianach kompleksu oraz w przenoszeniu protonów przez kanał CF_0 do katalitycznego centrum ATP-azy. Podjednostka δ wiąże CF_1 z CF_0 , a tym samym z błoną tylakoidu [238, a także prace przeglądowe 29, 159, 186, 235]. Funkcją najmniejszej podjednostki CF_1 — ϵ jest kontrola aktywności ATP-azy poprzez interakcję z podjednostką γ [128, 186]. Stosunki ilościowe podjednostek CF_1 są najprawdopodobniej następujące: 2α , 2β , γ , δ , 2ϵ (praca przeglądowa [185]), chociaż nie można wykluczyć występowania innych stosunków ilościowych. Masę cząsteczkową CF_1 określono na 325 000, a podjednostek odpowiednio na 59 000 (α), 56 000 (β), 37 000 (γ), 17 500 (δ) i 13 000 (ϵ) [44]. W błonach tylakoidowych jedna cząsteczka CF_1 przypada na 830–890 cząsteczek chlorofilu [235]. W skład CF_0 wchodzi trzy podjednostki o masach cząsteczkowych wynoszących odpowiednio 15 000 (I), 12 500 (II) i 8 000 (III) [186]. Funkcja dwóch większych podjednostek CF_0 jest nieznana, natomiast najmniejsza z nich (podjednostka III) jest hydrofobowym proteolipidem [237], bardzo podobnym w ATP-azach pochodzących z różnych roślin [235]. Podjednostka ta jest heksamerem funkcjonującym jako kanał protonowy [225].

Wyizolowane CF_1 wykazują funkcję ATP-azową tylko po uprzednim potraktowaniu np. trypsyną [248] lub podwyższoną temperaturą [84]. Wskazuje to, że wyizolowane białko istnieje w postaci nieaktywnej katalitycznie (latentna ATP-aza). Takie cząsteczki CF_1 , związane z błonami, hydrolizują ATP w bardzo wolnym tempie, jeżeli chloroplasty są np. trzymane w ciemności. Znaczna aktywność ATP-azowa była natomiast obserwowana wtedy, kiedy błony tylakoidowe najpierw oświetlano, a później dopiero dodawano ATP (aktywowana światłem ATP-aza) [235]. Wyniki uzyskane przez Wagenvoorda i wsp. [256] potwierdziły przypuszczenie, że katalityczne miejsce cząsteczki CF_1 znajduje się w podjednostkach α i (lub) β .

Aktywność chloroplastowej ATP-azy podlega regulacji, tzn. aktywność ta jest dostosowana do naturalnych warunków, np. zmian intensywności światła w cyklu dzień — noc. Zasada kontroli tkwi w zdolności enzymu do „rozpoznawania” tych warunków i reagowania „włączaniem się” i „wyłączaniem”, a także modulacją aktywności katalitycznej [np. 171]. Mechanizm regulacji jest obecnie przedmiotem intensywnych badań [235].

5. *Kompleks cytochrom b_6-f* . Kompleks cytochrom b_6-f jest kompleksem integralnych białek, który obejmuje kilka rodzajów polipeptydów. Są nimi: polipeptyd cytochromu f (34 kd), polipeptyd z dwoma hemami cytochromów typu b_6 (23 kd), polipeptyd o wysokim potencjale, określany mianem „Rieske FeS białko” (20 kd), strukturowy polipeptyd o masie 17 kd, mały 5 kd peptyd oraz związany plastochinon [103 i cyt. tam lit.].

Dokładna lokalizacja kompleksów cytochrom b_6-f w błonach tylakoidowych nie została jeszcze jednoznacznie ustalona. Chociaż wyniki dwóch przeprowadzonych analiz frakcjonowanego materiału [8, 67] są zgodne z poglądem na równomierne rozmieszczenie kompleksów cytochrom b_6-f w obrębie tylakoidów gran i stromy, to istnieją również doniesienia (np. Henry’ego i Møllera 1981, cyt. za [233]) informujące o braku takich kompleksów na terenie gran. Z kolei Ghirardi i Melis [94], opierając się na wynikach kinetycznych analiz składników łańcucha przenośników elektronów chloroplastów kukurydzy, stwierdzili, że kompleksy cytochrom b_6-f występują w obrębie brzegów (margins) tylakoidów gran.



Ryc. 13. Model obrazujący orientację cząsteczki cytochromu f w błonie tylakoidowej. Liczby określają reszty aminokwasowe, przy czym pofałdowanie odcinka od 1 do 250 reszty aminokwasowej przedstawiono schematycznie [267]

Mörschel i Staehelin [174], dysponując oczyszczonymi kompleksami cytochrom b_6-f o średnicy 8,5 nm i wysokości 11 nm, określili masę cząsteczkową izolowanego kompleksu — wynosi ona 280 000. Kompleks cytochrom b_6-f funkcjonuje jako przenośnik elektronów między dwoma fotoukładami, a niektórzy autorzy postulują także, że uczestniczy on w translokacji protonów w poprzek błony tylakoidowej [114]. Stosunkowo dobrze poznany jest jeden ze składników kompleksu, a mianowicie cy-

tochrom f, który w procesie transportu elektronów otrzymuje elektrony z centrum Rieske FeS i przekazuje je na plastocyjaninę (miedzioproteina). Struktura i topologia cytochromu f uzyskanego z chloroplastowych błon grochu została podana przez Willeya i wsp. [267]. Ustalili oni, że białko to zawiera 285 reszt aminokwasowych, a jego masa cząsteczkowa wynosi 31 090. Określili także sekwencję aminokwasów. Cytochrom f jest umiarkowanie hydrofobowym białkiem. Jedyne hydrofobowe regiony obejmują 20 reszt aminokwasowych 251–270 (ryc. 13), a więc odcinek znajdujący się w obrębie podwójnej warstwy lipidowej błony tylakoidowej. Po obu stronach hydrofobowego regionu znajdują się aminokwasy obdarzone ładunkiem elektrycznym: arginina w pozycji 250 i kolejno trzy lizyny w pozycjach 271–273. Powszechnie akceptowana lokalizacja plastocyjaniny po wewnętrznej stronie tylakoidu [33] sugeruje, że koniec N cytochromu f jest również tam zlokalizowany, natomiast liczący 15 reszt aminokwasowych koniec C eksponowany jest w kierunku stromy (ryc. 13).

Dynamiczne aspekty organizacji błony tylakoidowej

Wpływ soli na strukturę błony tylakoidu. W tabeli 2 zestawiono informacje o rozmieszczeniu w obrębie błon tylakoidowych pięciu wewnątrz błonowych kompleksów białkowych. Doświadczenia z zastosowaniem m.in. metody elektroforezy cząstek, pomiaru powierzchniowego potencjału (praca przeglądowa Barbera [31]) ujawniły, że tylakoidy w obojętnym pH mają przewagę ujemnych ładunków elektrycznych na zewnętrznej powierzchni błony. Adhezja błon tylakoidowych jest możliwa dopiero po zneutralizowaniu tych ładunków kationami [30, 31], przy czym — jak wynika z cytowanych już prac Barbera — jednowartościowe kationy są najmniej efektywne, a trójwartościowe — najsilniej. Przeniesienie wyizolowanych tylakoidów do środowiska o niskim stężeniu soli (np. 10mM NaCl) powoduje nie tylko zaniknięcie regionów zespolonych tylakoidów, ale także wymieszanie się wszystkich wewnątrz błonowych kompleksów białkowych [229]. Dodanie do zawiesiny tylakoidów > 3 mM $MgCl_2$ lub > 150 mM NaCl prowadzi do formowania się nowych gran i równoczesnej resegregacji kompleksów między regiony zespolonych i niezespolonych błon [169, 229]. Opisane zanikanie gran w niskim stężeniu soli nie jest ekwiwalentne procesowi wywołanemu fosforylacją LHC [141, 231].

Zmiany w strukturze tylakoidu wywołane fosforylacją. Optymalizacja niecyklicznego przepływu elektronów w błonach fotosyntetycznych u roślin wyższych i wielu glonów (ryc. 10) otrzymywana jest przez odkrytą pod koniec lat sześćdziesiątych regulację rodzaju zaabsorbowanej energii wzbudzania elektronowego między centra reak-

cji PS II i PS I [49, 180, 184]. Autorzy ci wykazali, że kiedy rośliny eksponowano kolejno na światło o różnych zakresach spektralnych, wtedy ich barwniki antenowe podlegały dynamicznym adaptacjom do zmienionych warunków oświetlenia, co powodowało polepszenie równomierności w rozdziale energii między PS I i PS II. Adaptacje te są zwykle określane jako przejście stan I — stan II. Stan I powstaje wtedy, gdy fotosyntetyzujący organizm zostaje wystawiony na światło, które jest absorbowane przede wszystkim przez PS I (≥ 700 nm). Adaptacja sprawiająca, że więcej zaabsorbowanej energii świetlnej będzie kierowane do PS II ujawnia się już po upływie kilku minut. Stan II natomiast jest wynikiem otrzymania przez fotosyntetyzujący organizm światła absorbowanego przez PS II (650 nm) — adaptacja w tym przypadku polega na zwiększaniu energii wzbudzenia, która będzie kierowana do PS I.

Dopiero niedawno zaproponowano mechanizm przejścia stan I — stan II. Przejście to jest związane z modyfikacją LHC, wywołaną fosforylacją budujących go peptydów. Bennett w serii doświadczeń [35–38] wykazał, że do błon chloroplastowych przyłączone są kinaza i fosfataza. Te zależne od jonów Mg^{2+} enzymy kontrolują procesy fosforylacji i defosforylacji rodników treoninowych znajdujących się na skierowanej w kierunku stromy powierzchni LHC. Kinaza może być aktywowana światłem. Autoradiograficznie stwierdzono wbudowywanie ^{32}P do kilku polipeptydów chloroplastowych błon. Szczególnie podatne dla tej zależnej od ATP reakcji były polipeptydy LHC o masach cząsteczkowych 23 000 i 29 000. Jeżeli próbka była wystawiona na światło, to następowała fosforylacja białek, gdy z kolei przenoszono je do ciemności — LHC ulegał szybkiej defosforylacji. Nieco później wykazano [1, 112], że kluczowym czynnikiem kontrolującym aktywację kinazy jest stan redoksy plastochinonu (PQ) [103, 170]. Na świetle szybsze przenoszenie elektronów przez PS II niż przez PS I powoduje redukcję puli PQ, to zaś wywołuje aktywację kinazy i fosforylację białka LHC, przez co zwiększa się efektywność przekazywania energii wzbudzenia elektronowego do PS I. I odwrotnie — utlenianie PQ przez PS I inaktywuje kinazę, a fosfataza defosforyluje LHC, powodując efektywniejsze przekazywanie energii wzbudzenia elektronowego do PS II. Odkrycie odwracalnej fosforylacji białka LHC zwróciło uwagę również na to, że fosforylacja może przyczyniać się do zmian własności zbierania energii świetlnej przez błony. Wyniki opublikowane przez Bennetta i wsp. [41] potwierdziły prawdziwość takiego przypuszczenia. Autorzy ci stwierdzili bowiem, że kiedy błony były ufosforylowane, wtedy więcej zaabsorbowanych kwantów było kierowanych do PS I. Stanowiło to główny wkład umożliwiający sformułowanie hipotezy, iż fosforylacja białka LHC leży u podstaw biochemicznego mechanizmu kontrolującego zmianę stanów barwników chloroplastowych.

Zmiany w strukturze błony związane ze zmianą stan I — stan II. Zdolność błon plastydowych do tworzenia regionów zespolonych zależy w dużej mierze od wzajemnie neutralizującego charakteru elektrostatycznych sił odpychających i przyciągających sił van der Waalsa, które istnieją na powierzchni błon [30, 31]. Wbudowanie więc ujemnie naładowanych grup fosforanowych do związanych z błoną cząstek LHC (na drodze fosforylacji białka LHC) powinno wpłynąć na strukturalną organizację błon, co sugerowano w kilku publikacjach, np. [42, 201]. Kyle i wsp. [141, 142] przebadali dokładnie wpływ fosforylacji LHC na supramolekularną organizację błon tylakoidowych i zakres ich zespolenia się. Wykorzystali do tego celu trzy typy tylakoidów: tylakoidy kontrolne, ufosforylowane *in vitro* oraz fosforylowane defosforylowane *in vitro*. Posługując się techniką kriorytownictwa nie byli w stanie odróżnić błon nefosforylowanych, fosforylowanych i defosforylowanych, opierając się jedynie na jakościowej analizie ich czterech powierzchni. Jednak analiza ilościowa cząstek, jak również bezpośrednie pomiary długości regionów zespolonych i niezespolonych ujawniły wyraźne różnice w supramolekularnej organizacji błon. I tak wywołana za pośrednictwem światła fosforylacja LHC spowodowała w tylakoidach chloroplastów grochu obniżenie się liczby zespolonych tylakoidów o 23%. Indukowana ciemnością defosforylacja LHC cofała ten efekt. Ponieważ obniżeniu liczby zespolonych błon tylakoidowych towarzyszyły tylko minimalne zmiany w gęstości cząstek, Kyle i wsp. [142] uważają więc, że zmiany te są wynikiem przemieszczenia się wewnątrz błonowych cząstek z regionów zespolonych do niezespolonych. W ustaleniu, jakie cząstki podlegają migracji, bardzo pomocny był fakt, że każda powierzchnia błony, uzyskana techniką kriorytownictwa, wyposażona jest w typowy dla siebie zespół cząstek [229], co zostało bardziej szczegółowo już tu przedstawione. Pomiary wielkości cząstek ujawniły, że w wyniku fosforylacji przemieszcza się tylko jedna kategoria cząstek wewnątrz błonowych (ok. 8 nm cząstki powierzchni PF). Przemieszczały się one z regionów PF_s do PF_u, defosforylacja z kolei powodowała powrót owych cząstek z PF_u do PF_s. Posługując się metodami biochemicznymi Kyle i wsp. [142] ustalili, że lamelle stromy ufosforylowanych błon miały w porównaniu z nieufosforylowanymi wyższy poziom polipeptydów o masach cząsteczkowych 23 i 29 kd. Tym indukowanym fosforylacją zmianom towarzyszyło obniżenie wartości stosunku chlorofilu a do chlorofilu b (od 6,7 do 5,0) w lamellach stromy i równoczesny wzrost wartości tego stosunku w błonach gran (od 2,3 do 2,6) [232]. Wykorzystując te dane Kyle i wsp. [142] postawili hipotezę, w myśl której fosforylacja tylakoidów wywołuje przemieszczanie się podfrakcji LHC (opisanych wcześniej tzw. mobilnych LHC) z gran do lamelli stromy, a defosforylacja — ich powrót do gran.

Ruch mobilnych LHC jest najprawdopodobniej uzależniony od wielkości powierzchniowego ładunku błony tylakoidowej i od powierzchniowej konfiguracji wbudowanych w nią kompleksów białkowych. Wiadomo bowiem, że normalnie tylakoidy mają ładunek ujemny, oraz że kationy obniżają powierzchniowy potencjał, prowadząc do zbliżenia się dwóch sąsiednich błon [30, 31]. Z kolei wystające ponad powierzchnię błony tylakoidowej segmenty LHC są regionami tzw. kationowych peptydów, bogatych w rodniki lizyny i argininy [177]. Segmenty te są nieodzowne przy powstawaniu gran i — jak się wydaje — mogą pełnić swoją funkcję poprzez interakcje ładunków z przyległą błoną, stabilizując regiony kontaktu błon [58, 177, 234]. Opisane segmenty LHC zawierają także dwa rodniki treoniny. Jeden z nich (lub oba) są miejscem (ami) wbudowywania fosforanu. Przyjmuje się, że fosforylacja LHC może dodawać 6–12 ujemnie naładowanych grup fosforanowych do każdej cząstki LHC [232]. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Kyle'a i Arntzena [140], którzy obserwowali w najbliższej okolicy gran wyraźny wzrost ładunków ujemnych po fosforylacji LHC. Staehelin i Arntzen [239], twierdzą, że jest to wzrost powierzchniowych ładunków ujemnych, który prowadzi do konformacyjnych zmian mobilnego LHC, a te powodują rozłączanie się błon i boczną migrację kompleksów z regionów zespolonych do niezespolonych. Funkcjonalną konsekwencją migracji LHC do lamelli stromy jest wzrost ilości barwników antenowych związanych z PS I. Odpowiedni wzrost wartości α (tak określa się część zaabsorbowanej energii, która została przekazana do PS I [56]), był rzeczywiście odnotowywany w ufosforylowanych błonach [104, 141]. Obserwacje te potwierdzają też hipotezę Bonaventury i Meyersa [49], zgodnie z którą przejście stan I — stan II zmienia własności absorpcyjne obu fotosystemów. Usunięcie natomiast z gran mobilnych jednostek LHC, bez istotnego zagęszczenia pozostających w regionie zespolonych błon centrów PS II, może być przyczyną pogorszonej łączności między centrami PS II, co obserwowano w ufosforylowanych błonach [104, 141]. Obniżenie za pośrednictwem LHC energii przekazywanej z PS II do PS I prowadzi ponadto do wzrostu przekazywania jej z PS II do PS I.

Tak więc poznane dotychczas fakty wskazują, że chociaż fosforylacja białka LHC jest niezbędna, to sama nie wystarcza do spowodowania zmiany stanu. Równie ważną częścią mechanizmu odpowiedzialnego za regulację dostarczanej energii do PS I i PS II jest zachodząca w płaszczyźnie błony boczna migracja mobilnych LHC.

Do czego „potrzebne” są chloroplastom grana? Jedną z nadal intrygujących własności błon chloroplastów roślin wyższych i zielenic jest ich przestrzenne zróżnicowanie na regiony zespolone (gra-

na) i niezespalone (lamelle stromy). Cecha ta jest wyraźnie związana z funkcjonalną specjalizacją błon. Błony chloroplastowe odpowiedzialne są za zbieranie energii świetlnej i produkcję stabilnych, wysokoenergetycznych związków chemicznych (ATP i NADPH₂). Analiza rozwoju błon i tworzenia się gran ujawniła, że z powstaniem regionów zespolonych błon skorelowany jest wzrost efektywności zbierania energii i jej wykorzystywania, zwłaszcza przy niekorzystnych warunkach świetlnych [22, 48]. Jest to zgodne z wieloma doniesieniami, które informują, że rośliny rosnące w cieniu lub przy niskiej intensywności światła mają więcej zespolonych błon niż rosnące przy wysokiej intensywności, np. [46, 162]. Jak już wspomniano tu, u roślin wyższych i zielenic LHC jest nie tylko głównym kompleksem zbierającym energię, ale również składnikiem powodującym adhezję między błonami chloroplastów. Zatem kiedy warunki świetlne stają się czynnikiem ograniczającym w fotosyntezie, wówczas pierwotną adaptacją roślin jest proporcjonalny wzrost zawartości LHC w tylakoidach oraz ilości zespolonych błon [9]. Wyjaśnia to zależność między warunkami świetlnymi i liczebnością tylakoidów gran, nie wyjaśnia jednak bardziej podstawowej kwestii, a mianowicie, po co grana w ogóle powstają? Staehelin i Arntzen [232] zaproponowali następujące wyjaśnienie: chlorofile związane z LHC absorbują światło o krótszej fali niż chlorofile centrów reakcji PS I i PS II. Umożliwia to temu kompleksowi bardzo skuteczne przekazywanie energii wzbudzenia elektronowego do obu typów centrów reakcji, np. wskutek indukowanego rezonansu. Ponieważ jednak przekazywanie energii wskutek indukowanego rezonansu jest zależne od wielu parametrów, m.in. od odległości między cząsteczkami chlorofilu, ich orientacji, w błonach chloroplastowych występuje więc także kilka innych kierunków przekazywania energii wzbudzenia, a mianowicie LHC → LHC i PS II → PS I [56, 126]. W związku z tym rodzi się pytanie: co sprawia, że cała zebrana przez różne systemy antenowe energia nie jest przekazywana do PS I? To centrum reakcji jest bowiem wyposażone w barwniki chlorofilowe o maksimach absorpcji najbardziej przesuniętych w kierunku czerwieni i równocześnie jest bardziej skuteczne w zbieraniu energii świetlnej niż PS II [268].

Według Staehelina i Arntzena [232] ewolucja dostarczyła roślinom zielonym „prostego” strukturalnego rozwiązania tego problemu poprzez segregację większości PS II i LHC w granach, a większości PS I w regionach błon stromy (tab. 2). Taka przestrzenna segregacja dwóch typów centrów reakcji chroni przez nadmiernym przekazywaniem energii wzbudzenia z PS II do PS I. Mimo istnienia owej segregacji fotoukłady konkurują o energię promienistą, a to narzuca pewne ograniczenia funkcji. Gdyby więc zestaw barwników został jednolicie rozdzielony między lamelle gran i stromy, własności absorpcji światła przez chloroplasty byłyby

stałe. Ponieważ faktyczne warunki świetlne otoczenia nie są stałe, a „zapotrzebowania” komórek w stosunku do PS I pośredniczącego zarówno w niecyklicznym, jak i cyklicznym przepływie elektronów również często się zmieniają, dlatego więc taki jednowariantowy rozdział barwników byłby niekorzystny. Jednak wykształcenie się systemu mobilnych anten, które mogą być zmiennie rozdzielane między bogate w PS II grana i bogate w PS I lamelle stromy spowodowało, że problem regulacji rozdziału energii przestał istnieć, a fotosynteza w roślinach wyższych uzyskała maksymalne natężenie.

Kontrola rozdziału energii wzbudzenia w plastydach nie mających tylakoidów z regionami zespolonych błon. W świetle poprzednich rozważań na temat mechanizmu kontroli rozdziału energii wzbudzenia elektronowego między PS II i PS I może się wydać nieco dziwne, że podstawa zjawiska, tzn. przejście stan I — stan II, została opisana po raz pierwszy dla krasnorostu z rodzaju *Porphyridium* [180], glonu nie mającego zespolonych tylakoidów. Tylakoidy krasnorostów, podobnie jak sinic, są pozbawione LHC zawierającego chlorofil b. Wykorzystują natomiast zbierające energię anteny, znane jako fikobilisomy (zbierającymi energię barwnikami są w nich fikobiliproteiny [93, 96]). Fikobilisomy są dużymi kompleksami barwników z białkami, zlokalizowanymi nad kompleksami PS II na kontaktujących się ze stromą powierzchniach tylakoidów. Wydaje się, że są one zarówno strukturalnie, jak i funkcjonalnie powiązane z kompleksami PS II [93, 95, 96]. Jest jeszcze bardzo mało wiadomo o mechanizmie przejścia stan I — stan II w tylakoidach, które są wyposażone w fikobilisomy [216]. Staehelin i Arntzen [232] sądzą, że u glonów, podobnie jak u roślin zielonych, mechanizm ten jest również zależny od reorganizacji błonowych kompleksów wywołanych zmianą wielkości powierzchniowych ładunków ujemnych. Do wywołania takiego samego efektu (tzn. przejścia stan I — stan II) wystarczają tu jednak znacznie mniejsze reorganizacje. Ponieważ zdolność wiązania energii wzbudzenia przekazywanej w wyniku indukowanego rezonansu maleje do szóstej potęgi odległości [236], dlatego nawet zmiany rzędu 10 nm w przestrzennych układach istniejących między centralnymi (zawierającymi allofikocyjaninę) podjednostkami fikobilisomów a znajdującymi się w błonie kompleksami PS II i PS I mogą być wystarczające do regulacji rozdziału energii wzbudzenia między te dwa kompleksy.

LITERATURA

- [1] ALLEN J. F., BENNETT J., STEINBACH K. E., ARNTZEN C. J., Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation between photosystems, *Nature*, **291**: 25–29, 1981.

- [2] ALLEN J. F., GOOD P., TROSPER T., PARK R. B., Chlorophyll-glycerolipid and protein ratios in spinach chloroplasts grana, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **48**: 907-913, 1972.
- [3] ALSCHER R., PATTERSON R., JAGENDORF A. T., Activity of thylakoid-bound ribosomes in pea chloroplasts, *Plant Physiol.*, **62**: 88-93, 1978.
- [4] AMELUNXEN F., THALER I., HARSDORFF M., Die Struktur der Phyto-ferritinkristalle von *Phajus grandifolius*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **63**: 199-210, 1970.
- [5] AMESZ J., The photosynthetic reaction center. W: *Progress in Botany*, eds. H., Ellenberg, K., Esser, K., Kubitzki, E., Schnepf, H., Ziegler. Springer — Verlag, Berlin, **43**: 49-65, 1981.
- [6] ANDERSON J. M., P-700 content and polypeptide profile of chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta*, **591**: 113-126, 1980.
- [7] — Consequences of spatial organization of photosystem 1 and 2 in thylakoid membranes of higher plant chloroplasts, *FEBS Lett.*, **124**: 1-10, 1981.
- [8] — Distribution of the cytochromes of spinach chloroplasts between the appressed membranes of grana stacks and stroma-exposed thylakoid regions, *FEBS Lett.*, **138**: 62-66, 1982.
- [9] — The significance of grana stacking in chlorophyll b containing chloroplasts, *Photobiochem., Photohiophys.*, **3**: 225-241, 1982.
- [10] ANDERSON J. M., ANDERSSON B., The architecture of photosynthetic membranes: lateral and transverse organisation, *Trends Biochem. Sci.*, **7**: 288-292, 1982.
- [11] ANDERSON J. M., BOARDMAN N. K., Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis. I. Chlorophyll contents and photochemical activities of particles isolated from spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **112**: 403-421, 1966.
- [12] ANDERSON J. M., MELIS A., Localization of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**: 745-749, 1982.
- [13] ANDERSON J. M., WALDRON J. C., THORNE S. W., Chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids, *FEBS Lett.*, **92**: 227-233, 1978.
- [14] ANDERSSON B., ANDERSON J. M., Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **593**: 427-440, 1980.
- [15] ANDERSSON B., ANDERSON J. M., RYRIE I. J., Transbilayer organization of the chlorophyll-proteins of spinach thylakoids, *Eur. J. Biochem.*, **123**: 465-472, 1982.
- [16] APEL K., The light-harvesting chlorophyll a/b protein complex of the green alga *Acetabularia mediterranea*. Isolation and characterization of two subunits, *Biochim. Biophys. Acta*, **462**: 390-402, 1977.
- [17] — 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.
- [18] 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.
- [19] — 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.
- [20] ARGYROUDI-AKOYUNOGLU J. H., AKOYUNOGLU G., The chlorophyll protein complexes of the thylakoid in greening plastids of *Phaseolus vulgaris*, *FEBS Lett.*, **104**: 78–84, 1979.
- [21] ARMOND P. A., ARNTZEN C. J., Localization and characterization of photosystem II in grana and stroma lamellae, *Plant Physiol.*, **59**: 398–404, 1977.
- [22] ARMOND P. A., ARNTZEN C. J., BRIANTAIS J. M., VENOTTE C., Differentiation of chloroplast lamellae. I. Light harvesting efficiency and grana development, *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**: 400–418, 1976.
- [23] ARMOND P. A., STAEHELIN L. A., ARNTZEN C. J., Spatial relationship of photosystem I, photosystem II, and the light-harvesting complex in chloroplast membranes, *J. Cell Biol.*, **73**: 400–418, 1977.
- [24] ARNTZEN C. J., Dynamic structural features of chloroplast lamellae. W: *Curr. Top. Bioenerg.*, **8**: 111–160, ed. D. R., Sanadi, L. P., Vernon, New York, Academic Press, 1978.
- [25] ARNTZEN C. J., BURKE J. J., Analysis of dynamic changes in membrane architecture: electron microscopic approach, *Meth. Enzym.*, **69**: 520–538, 1980.
- [26] ARNTZEN C. J., DILLEY R. A., CRANE F. L., A comparison of chloroplast membrane surfaces visualized by freeze-etch and negative staining techniques; and ultrastructural characterization of membrane fractions obtained from digitonin-treated spinach chloroplasts, *J. Cell Biol.*, **43**: 16–31, 1969.
- [27] AXELSSON L., DAHLIN C., RYBERG H., The function of carotenoids during chloroplast development. V. Correlation between carotenoid content, ultrastructure and chlorophyll b to chlorophyll a ratio, *Physiol. Plant.*, **55**: 111–116, 1982.
- [28] BAHL J., FRANCKE B., MONÉGER R., Lipid composition of envelopes, prolamellar bodies and other plastid membranes in etiolated, green and greening wheat leaves, *Planta*, **129**: 193–201, 1976.
- [29] BAIRD B. A., HAMMES G. G., Structure of oxidative — and photo-phosphorylation coupling factor complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **549**: 31–53, 1979.
- [30] BARBER J., An explanation for the relationship between salt-induced thylakoid stacking and the chlorophyll fluorescence changes associated with changes in spillover of energy from photosystem II to photosystem I, *FEBS Lett.*, **118**: 1–10, 1980.
- [31] — Influence of surface charges on thylakoid structure and function, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **33**: 261–295, 1982.
- [32] 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.
- [33] BENDAL D. S., Electron and proton transfer in chloroplasts, [W:] *Inter. Rev. Biochem.*, **13**, ed. D. H. Northcote, Baltimore University Park Press, 41–78, 1977.
- [34] BENGIS C., NELSON N., Purification and properties of the PS I reaction center from chloroplasts, *J. Biol. Chem.*, **250**: 2783–2788, 1975.
- [35] BENNETT J., Phosphorylation of chloroplast membrane proteins, *Nature* **269**: 344–346, 1977.

- [36] — Chloroplast phosphoproteins. The protein kinase of thylakoid membranes is light dependent, *FEBS Lett.*, **103**: 342–344, 1979.
- [37] — Chloroplast phosphoproteins. Phosphorylation of polypeptides of the light-harvesting chlorophyll protein complex, *Eur. J. Biochem.*, **99**: 133–137, 1980.
- [38] — Chloroplast phosphoproteins. Evidence for a thylakoid-bound phosphoprotein phosphatase, *Eur. J. Biochem.*, **104**: 85–95, 1980.
- [39] — Biosynthesis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. Polypeptide turnover in darkness, *Eur. J. Biochem.*, **118**: 61–70, 1981.
- [40] — Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll a/b protein, *Biochem.*, **212**: 1–13, 1983.
- [41] BENNETT J., STEINBECK K. E., ARNTZEN C. J., Chloroplast phosphoproteins: regulation of excitation energy transfer by phosphorylation of thylakoid membrane polypeptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 5253–5257, 1980.
- [42] BIGGINS J., Thylakoid conformational changes accompanying membrane protein phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **679**: 479–482, 1982.
- [43] BILLECOCQ A., Structure des membranes biologiques: localisation des galactosyldiglycérines dans les chloroplastes au moyen, des anticorps spécifiques. II. Étude en microscopie électronique à l'aide d'un marquage à la peroxydase, *Biochim. Biophys. Acta*, **352**: 245–251, 1974.
- [44] BINDER A., JAGENDORF A. T., NGO E., Isolation and composition of the subunits of spinach chloroplast coupling factor protein, *J. Biol. Chem.*, **253**: 3094–3100, 1978.
- [45] BISALPUTRA T., BAILEY A., The fine structure of the chloroplast envelope of red alga *Bangia fusco-purpurea*, *Protoplasma*, **76**: 443–454, 1973.
- [46] BJÖRKMAN O., LUDLOW M., Characterization of the light climate on the floor of a Queensland rainforest, [W:] *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, **71**: 85–94, 1972.
- [47] BLOCK M. A., DORNE A.-J., JOYARD J., DOUCE R., The phosphatidic acid phosphatase of the chloroplast envelope is located on the inner envelope membrane, *FEBS Lett.*, **164**: 111–115, 1983.
- [48] BOARDMAN N. K., ANDERSON J. M., GOODCHILD D. J., Chlorophyll-protein complexes and structure of mature and developing chloroplasts, [W:] *Curr. Top. Bioenerg.*, **8**: 36–109, 1978.
- [49] BONAVENTURA C., MYERS J., Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*, *Biochim. Biophys. Acta*, **189**: 366–383, 1969.
- [50] BOYNTON J. E., GILLHAM N. W., LAMBOWITZ A. M., Biogenesis of chloroplast and mitochondrial ribosomes. W: *Ribosomes: structure, function and genetics*, eds. G. Chamblis, G. Craven, J. Davies, L. Kahan, M. Nomura, Univ. Press Baltimore, 903–950, 1980.
- [51] BRANDLEY B. K., Light-dependent particle movement in the outer envelope of chloroplasts from *Codium australicum* (Silva), *Protoplasma*, **110**: 15–19, 1982.
- [52] BRANTON D., BULLIVANT S., GILULA N. B., KARNOVSKY M. J., MOOR H., MÜHLETHALER K., NORTHCOTE D. H., PACKER L., SATIR B., SATIR P., SPETH U., STAEHELIN L. A., STEERE R. L., WEINSTEIN R. S., Freeze-etching nomenclature, *Science*, **190**: 54–56, 1975.
- [53] BRANTON D., PARK R. B., Subunits in chloroplast lamellae, *J. Ultrastruct. Res.*, **19**: 283–303, 1967.

- [54] BROWN J. S., ALBERTE R. S., THORNBURGER J. P., Comparative studies on the occurrence and spectral composition of chlorophyll-protein complexes in a wide variety of plant material, Proc. 3rd Int. Cong. Photosynth. Rehovot, ed. M. Avron, 3: 1951-1962, 1975.
- [55] BURKE J. J., DITTO C. L., ARNTZEN C. J., Involvement of the light-harvesting complex in cation regulation of excitation energy distribution in chloroplasts, Arch. Biochem. Biophys., 187: 252-263, 1978.
- [56] BUTLER W. L., Chlorophyll fluorescence: a probe for electron transfer and energy transfer, [W:] Photosynthesis I. Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation; eds. A. Trebst, M. Avron, Springer — Verlag, Berlin 149-167, 1977.
- [57] BUTLER R. D., SIMON E. W., Ultrastructural aspects of plant senescence. [W:] Advances in gerontological research 111, ed. B. Strehler, Academic Press, New York, London, 1971.
- [58] CARTER D. P., STAEHELIN L. A., Proteolysis of chloroplast thylakoid membranes. II. Evidence for the involvement of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex in thylakoid stacking and for effects of magnesium ions on photosystem II-light harvesting complex aggregates in the absence of membrane stacking, Arch. Biochem. Biophys., 200: 374-386, 1980.
- [59] CHEN J. L., WILDMAN S. G., „Free” and membrane-bound ribosomes, and nature of products formed by isolated tobacco chloroplasts incubated for protein synthesis, Biochim. Biophys. Acta, 209: 207-219, 1970.
- [60] CHUA N.-H., BLOBEL G., SIEKEVITZ P., PALADE G. E., Periodic variations in the ratio of free to thylakoid-bound chloroplasts during the cell cycle of *C. reinhardtii*, J. Cell Biol., 71: 497-514, 1976.
- [61] CHUA N.-H., MATLIN K., BENNOUN P., A chlorophyll-protein complex lacking in photosystem I mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*, J. Cell Biol., 67: 361-377, 1975.
- [62] CHUA N.-H., SCHMIDT G. W., Post-translated transport into intact chloroplasts of a precursor to the small subunit of ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75: 6110-6114, 1978.
- [63] CHUA N.-H., SCHMIDT G. W., Transport of proteins into mitochondria and chloroplasts, J. Cell Biol., 81: 461-483, 1979.
- [64] CLINE K., ANDREWS J., MERSEY B., NEWCOMB E. H., KEEGSTRA K., Separation and characterization of inner and outer envelope membranes of pea chloroplasts, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78: 3595-3599, 1981.
- [65] CLINE K., KEEGSTRA K., Galactosyltransferases involved in galactolipid biosynthesis are located in the outer membrane of pea chloroplast envelopes, Plant Physiol., 71: 366-372, 1983.
- [66] CORUZZI G., BROGLIE R., CASHMORE A., CHUA N.-H., Nucleotide sequences of two pea cDNA clones encoding the small subunit of ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase and the major chlorophyll a/b-binding thylakoid polypeptide, J. Biol. Chem., 258: 1399-1402, 1983.
- [67] COX R. P., ANDERSSON B., Lateral and transverse organisation of cytochromes in the chloroplast thylakoid membrane, Biochem. Biophys. Res. Commun., 103: 1336-1342, 1981.
- [68] CRAMER W. R., CROFTS A. R., Electron and proton transport. W: Photosynthetic Energy Conversion in Plants and Bacteria, ed. Govindjee, Academic Press, Inc., New York, 1: 387-467, 1982.
- [69] DAVIS D. J., ARMOND P. A., GROSS E. L., ARNTZEN C. J., Differentia-

- tion of chloroplast lamellae. Onset of cation regulation of excitation energy distribution, *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**: 64–70, 1976.
- [70] DAY D. A., RYRIE I. J., FUAD N., Investigations of the role of the main light-harvesting chlorophyll-protein complex in thylakoid membranes. Reconstitution of depleted membranes from intermittent-light-grown plants with the isolated complex, *J. Cell Biol.*, **97**: 163–172, 1984.
- [71] DENO H., SUGIURA M., Chloroplast tRNA Gly gene contains a long intron in the D stem: nucleotide sequences of tobacco chloroplast genes for tRNA Gly (UCC) and tRNA Arg (UCU), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**: 405–408, 1984.
- [72] DINER B., WOLLMAN F. A., Isolation of highly active photosystem II particles from a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eur. J. Biochem.*, **110**: 521–526, 1981.
- [73] DODGE J. D., Changes in chloroplast fine structure during the autumnal senescence of *Betula* leaves, *Ann. Bot.*, **34**: 817–824, 1970.
- [74] DOUCE R., Site of biosynthesis of galactolipids in spinach chloroplasts, *Science*, **183**: 852–853, 1974.
- [75] DOUCE R., JOYARD J., Structure and function of the plastid envelope, *Adv. Bot. Res.*, **7**: 1–116, 1979.
- [76] — Does the plastid envelope derive from the endoplasmic reticulum, *TIBS*, **6**: 237–239, 1981.
- [77] DUNKLEY P. R., ANDERSON J. M., The light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from barley thylakoid membranes. Polypeptide composition and characterization of an oligomer, *Biochim. Biophys. Acta*, **545**: 174–187, 1979.
- [78] ELLIS R. J., Protein and nucleic acid synthesis by chloroplasts, [W:] *The Intact Chloroplast*, ed. J. Barber, Elsevier North Holland Biomedical Press, 335–364, 1976.
- [79] ELLIS R. J., Protein synthesis by isolated chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **463**: 185–215, 1977.
- [80] — Chloroplast proteins: synthesis, transport and assembly, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **32**: 11–137, 1981.
- [81] ENEAS-FILHO J., HARTLEY M. R., MACHE R., Pea chloroplast ribosomal proteins: characterization and site of synthesis, *Mol. Gen. Genetics*, **184**: 484–488, 1981.
- [82] ESKINS K., DUYSEN M. E., OLSON L., Pigment analysis of chloroplast pigment-protein complexes in wheat, *Plant Physiol.*, **71**: 777–779, 1983.
- [83] FALK H., Magnoglobuli in Chloroplasten von *Ficus elastica* Roxb., *Planta*, **55**: 525–532, 1960.
- [84] FARRON F., Isolation and properties of a chloroplast coupling factor and heat-activated adenosine triphosphatase, *Biochem.*, **9**: 3823–3828, 1970.
- [85] FARRON F., RACKER E., Studies on the mechanism of the conversion of coupling factor 1 from chloroplasts to an active adenosine triphosphatase, *Biochem.*, **9**: 3829–3836, 1970.
- [86] FISH L. E., JAGENDORF A. T., Light-induced increase in the number and activity of ribosomes bound to pea chloroplast thylakoids in vivo, *Plant Physiol.*, **69**: 814–825, 1982.
- [87] FLÜGGE U. I., BENZ R., Pore-forming activity in the outer membrane of the chloroplast envelope, *FEBS Lett.*, **169**: 85–89, 1984.
- [88] FLÜGGE U. I., HELDT H. W., Identification of a protein involved in phos-

- phate transport of chloroplasts, *FEBS Lett.*, **68**: 259–262, 1976.
- [89] — Specific labelling of a protein involved in phosphate transport of chloroplasts by pyridoxal-5-phosphate, *FEBS Lett.*, **82**: 29–33, 1977.
- [90] — Specific labelling of the active site of the phosphate translocator in spinach chloroplasts by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**: 37–44, 1978.
- [91] FOSTER J. G., EDWARDS G. E., Polypeptide composition of envelope membranes isolated from chloroplasts of C₃, C₄ and CAM Plants, *Plant, Cell Physiol.*, **24**: 1191–1202, 1983.
- [92] FRĄCKOWIAK B., Struktura i funkcja błon chloroplastów, *Post. Biochem.*, **17**: 235–248, 1971.
- [93] GANTT E., Phycobilisomes, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **23**: 327–347, 1981.
- [94] GHIRARDI M. L., MELIS A., Localization of photosynthetic electron transport components in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of *Zea mays*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **224**: 19–28, 1983.
- [95] GIDDINGS T. H., WASMAN C., STAEHELIN L. A., Structure of the thylakoids and envelope membranes of the cyanelles of *Cyanophora paradoxa*, *Plant Physiol.*, **71**: 409–410, 1983.
- [96] GLAZER A. N., Phycobilisomes: structure and dynamics, *Annu. Rev. Microbiol.*, **36**: 173–198, 1982.
- [97] GOODENOUGH U. W., STAEHELIN L. A., Structural differentiation of stacked and unstacked chloroplast membranes. Freeze-etch electron microscopy of wild-type and mutant strains of *Chlamydomonas*, *J. Cell Biol.*, **48**: 594–619, 1971.
- [98] GOODWIN T. W., The prenyllipids of the membranes of higher plants, [w:] *Lipids and lipid polymers in higher plants*, eds. M. Tevini, H. K. Lichtenthaler, Springer Verlag, 29–47, 1977.
- [99] GOUNARIS I., WELLBURN A. R., Formation of chlorophyll-carotenoid-protein complexes in cereal plastids during greening and normal light-grown development, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **178**: 433–442, 1983.
- [100] GOVINDJEE R., Introduction to photosynthesis, [w:] *Bioenergetics of Photosynthesis*, ed. R. Govindjee, Academic Press, Inc., New York, 1–50, 1975.
- [101] GRUMBACH K. H., Distribution of chlorophylls, carotenoids and quinones in chloroplasts of higher plants, *Z. Naturforsch.*, **38c**: 996–1002, 1983.
- [102] GUNNING B. E. S., STEER M. W., Ultrastructure and the biology of plant cells, ed. E. Arnold LTD., London, 97–133, 1975.
- [103] HAEHNEL W., Photosynthetic electron transport in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 659–693, 1984.
- [104] HAWORTH P., KYLE D. J., ARNTZEN C. J., A demonstration of the physiological role of membrane phosphorylation in chloroplasts, using the bipartite and tripartite models of photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **680**: 343–351, 1982.
- [105] HEBER U., HELDT H. W., The chloroplast envelope: structure, function, and role in leaf metabolism, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **32**: 139–168, 1981.
- [106] HELDT H. W., Metabolite carriers of chloroplasts, [W:] *Transport in Plants. III. Intracellular Interactions and Transport Processes*, eds. C. R. Stocking, U. Heber, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 137–143, 1976.
- [107] HELDT H. W., SAUER F., The inner membrane of the chloroplast envelope as the site of specific metabolite transport, *Biochim. Biophys. Acta*, **234**: 83–91, 1971.

- [108] HENNINGER M. D., MAGREE L., CRANE F. L., Distribution of plastoquinones in fractionated chloroplasts, *Biochim. Acta.* **131**: 119–126, 1967.
- [109] HERRMANN R. G., POSSINGHAM J. V., Plastid DNA. — The plastome, [W:] *Chloroplasts (Results and problems in cell differentiation, vol. 10)*, ed. J. Reinert, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 45–96, 1980.
- [110] HIGHFIELD P. E., ELLIS R. J., Synthesis and transport of the small subunit of chloroplast ribulose biphosphate carboxylase, *Nature*, **271**: 420–424, 1978.
- [111] HILLER R. G., GOODCHILD D. J., Thylakoid membrane and pigment organization, [W:] *The Biochemistry of Plants: Photosynthesis*, eds. M. D. Hatch, N. K. Boardman, Academic Press, Inc., New York, **8**: 1–49, 1981.
- [112] HORTON P., BLACK M. T., On the fluorescence decrease due to phosphorylation of chloroplast membrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **680**: 2–27, 1982.
- [113] HOWELL S. H., MOUDRIANAKIS E. N., Function of the “quintasome” in the photosynthesis: structure and properties of membrane-bound particles active in the dark reactions of photophosphorylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**: 1261–1268, 1967.
- [114] HURT E. C., HAUSKA G., SHAHAK Y., Electrogenic proton translocation by the chloroplast cytochrome b_6/f complex reconstituted into phospholipid vesicles, *FEBS Lett.*, **149**: 221–216, 1982.
- [115] HYDE B. B., HODGE A. J., KAHN A., BIRNSTIEL M. L., Studies on phytoferritin. 1. Identification and localization, *J. Ultrastruct. Res.*, **9**: 248–258, 1963.
- [116] IZAWA S., GOOD N. E., Effects of salts and electron transport on the conformation of isolated chloroplasts. II. Electron microscopy, *Plant Physiol.*, **41**: 544–552, 1966.
- [117] JACOBI G., LEHMANN H., Die Fragmentatio isolierter Chloroplasten. I. Die funktionelle und strukturelle Beurteilung von Fragmenten Ultraschall-behandelter Chloroplasten, *Z. Pflanzenphysiol*, **53**: 557–476, 1968.
- [118] JACOBI G., LEHMANN H., Photochemical activities of chloroplast fragments, *Progr. Photosynth. Res.*, **1**: 159–173, 1969.
- [119] JEFFREY S., DOUCE W., BENSON A. A., Carotenoid transformation in the chloroplast envelope, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**: 807–810, 1974.
- [120] JENNINGS R. C., GARLASCHI F. M., GEROLA P. D., FORTI G., Partition zone penetration by chymotrypsin and the localization of the chloroplast flavoprotein and photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **546**: 207–219, 1979.
- [121] JENSEN R. G., BAHR J. T., Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase-oxygenase, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **28**: 379–400, 1977.
- [122] JOPE C. A., ATCHISON B. A., PRINGLE R. C., A computer analysis of a spiral, string-of-grana model of the tree-dimensional structure of chloroplasts, *Bot. Gaz.*, **141**: 37–47, 1980.
- [123] JOYARD J., DOUCE R., Site of synthesis of phosphatidic acid and diacylglycerol in spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **486**: 273–285, 1977.
- [124] — Characterization of phosphatidate phosphohydrolase activity associated with chloroplast envelope membranes, *FEBS Lett.*, **102**: 147–150, 1979.
- [125] JOYARD J., GROSSMAN A., BARTLETT S. G., DOUCE R., CHUA N.-H., Characterization of envelope membrane polypeptides from spinach chloroplasts, *J. Biol. Chem.*, **257**: 1095–1101, 1982.
- [126] JUNGE W., Physical aspects of light harvesting, electron transport and electrochemical potential generation in photosynthesis of green plants, [w] *Photosynthesis I. Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation* eds. Trebs A., Avron M., 59–93, Springer-Verlag, Berlin 1977.

- [127] KAGAN-ZUR V., FREDLANDER M., LIPS S. H., Chloroplast envelopes as affected by light or dark pretreatment of pea plants, *Planta*, **149**: 427-432, 1980.
- [128] KAHN J. S., The ϵ subunit of the chloroplast coupling factor 1 from *Euglena gracilis*. A possible role in controlling ATPase activity. *Plant Physiol.*, **70**: 451-455, 1982.
- [129] KAPLAN S., ARNTZEN C. J., Photosynthetic membrane structure and function, [W:] *Photosynthesis: Comparative Aspects of Bacteria and Green Plants*, ed. R. Govindjee, 65-153, Academic Press Inc., New York, 1982.
- [130] KAWASHIMA N., WILDMAN S. G., Fraction I protein, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **21**: 325-358, 1970.
- [131] KEEGSTRA K., CLINE K., Evidence that envelope and thylakoid membranes from pea chloroplasts lack glycoproteins, *Plant Physiol.*, **70**: 232-237, 1982.
- [132] KIRCHANSKI S. J., Cooper ferricyanide localization of photosystem II in glutaraldehyde fixed and unfixed chloroplasts, *J. Ultrastruct. Res.*, **57**: 113-119, 1976.
- [133] KIRK J. T. O., Chloroplast structure and biogenesis, *Annu. Rev. Biochem.*, **40**: 161-196, 1971.
- [134] KIRK J. T. O., TILNEY-BASSETT R. A. E., *The plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*, eds., W. H., Freeman and Company Ltd., London and San Francisco, 1967.
- [135] — *The plastids*. Elsevier-North Holland-Biomedical Press, Amsterdam, 1978.
- [136] KOCH W., EDWARDS K., KÖSSEL H., Sequencing of the 16 S-23 S spacer in a ribosomal RNA operon of *Zea mays* chloroplast DNA reveals two split tRNA genes, *Cell*, **25**: 203-213, 1981.
- [137] KOENIG K., MENKE W., CRAUBNER H., SCHMID G. H., RADUNZ A., Photochemically active chlorophyll-containing proteins from chloroplasts and their localization in the thylakoid membrane, *Z. Naturforsch.*, **27b**: 1225-1238, 1972.
- [138] KÜHLBRANDT W., Three-dimensional structure of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex, *Nature*, **307**: 478-480, 1984.
- [139] KÜHLBRANDT W., THALER Th., WEHRLI E., The structure of membrane crystals of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex, *J. Cell Biol.*, **96**: 1414-1424, 1983.
- [140] KYLE D. J., ARNTZEN C. J., Thylakoid membrane protein phosphorylation selectively alters the local membrane surface charge near the primary acceptor of photosystem II, *Photobiochem. Photobiophys.*, **5**: 11-25, 1983.
- [141] KYLE D. J., HAWORTH P., ARNTZEN C. J., Thylakoid membrane protein phosphorylation leads to a decrease in connectivity between photosystem II reaction centers, *Biochim. Biophys. Acta*, **680**: 336-342, 1982.
- [142] KYLE D. J., STAEHELIN L. A., ARNTZEN C. J., Lateral mobility of the light-harvesting complex in chloroplast membranes controls excitation energy distribution in higher plants, *Arch. Biochem. Biophys.*, **222**: 527-541, 1983.
- [143] LEDSIGT G., STEVENS B. J., CURGY J. J., ANDRE J., Analysis of chloroplast ribosomes by polyacrylamide gel electrophoresis and electron microscopy, *Exp. Cell Res.*, **119**: 221-229, 1979.
- [144] LEECH R. M., *The chloroplast inside and outside the cell*, [W:] *Plant Cell Organelles*, ed., J. B., Pridham, Academic Press, New York, London, 137-162, 1968.
- [145] LICHTHENTHALER H. K., Plastoglobuli und Plastidenstruktur, *Ber. Dt. Bot. Ges.*, **79**: 82-88, 1966.

- [146] — Plastoglobuli and the fine structure of plastids, *Endeavour* **27**: 144–149, 1968.
- [147] — Die Plastoglobuli von Spinat, ihre Größe, Isolierung und Lipochinonzusammensetzung, *Protoplasma*, **68**: 65–77, 1969.
- [148] — Die Plastoglobuli von Spinat, ihre Größe, und Zusammensetzung während der Chloroplastengeneration, *Protoplasma*, **68**: 315–326, 1969.
- [149] — Regulation der Lipochinonsynthese in Chloroplasten, *Ber. Dt. Bot. Ges.*, **86**: 313–329, 1973.
- [150] LICHTENTHALER H. K., BURKARD G., KUNH G., PRENZEL U., Light-induced accumulation and stability of chlorophylls and chlorophyll-proteins during chloroplast development in radish seedlings, *Z. Naturforsch.*, **36c**: 421–430, 1981.
- [151] LICHTENTHALER H. K., PRENZEL U., KUHN G., Carotenoid composition of chlorophyll-carotenoid-proteins from radish chloroplasts, *Z. Naturforsch.*, **37c**: 10–12, 1982.
- [152] LIEDVOGEL B., KLEINING H., Galactolipid synthesis in chromoplast internal membranes of the daffodil, *Planta*, **129**: 19–21, 1976.
- [153] — Lipid metabolism in chromoplast membranes from the daffodil: glycosylation and acylation, *Planta*, **133**: 249–253, 1977.
- [154] LORIMER G. H., The carboxylation and oxygenation of ribulose 1.5-bisphosphate the primary events in photosynthesis and photorespiration, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **32**: 349–383, 1981.
- [155] LÜTKE-BRINKHAUS F., LIEDVOGEL B., KREUZ K., KLEINING H., Phytoene synthase and phytoene dehydrogenase associated with envelope membranes from spinach chloroplasts, *Planta*, **156**: 176–180, 1982.
- [156] MACHOLD O., On the molecular nature of chloroplast thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **281**: 103–122, 1975.
- [157] — Chlorophyll a/b-proteins and light-harvesting complex of *Vicia faba* and *Hordeum vulgare*, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **176**: 805–827, 1981.
- [158] MARGULIES M. M., TIFFANY H. L., MICHAELS A., Vectorial discharge of nascent polypeptides attached to chloroplast thylakoid membranes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**: 735–739, 1975.
- [159] MASŁOWSKI P., MASŁOWSKA H., Właściwości, struktura i funkcja chloroplastowego czynnika sprzęgającego (CF₁), *Post. Biochem.*, **29**: 111–123, 1983.
- [160] MC CARTY R. E., RACKER E., Effect of coupling factor and its antiserum on photophosphorylation and hydrogen ion transport, *Brookhaven Symp. Biol.*, **19**: 202–212, 1966.
- [161] 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.
- [162] MELIS A., BROWN J. S., Stoichiometry of system I and system II reaction centers and of plastoquinone in different photosynthetic membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 4712–4716, 1980.
- [163] MELKONIAN M., ROBENEK H., STEUP M., Occurrence and distribution of filipinsterol complexes in chloroplast envelope membranes of algae and higher plants as visualized by freeze-fracture, *Protoplasma*, **109**: 349–358, 1981.
- [164] MICHAELS A., MARGULIES M. M., Amino acid incorporation into protein by ribosomes bound to chloroplast thylakoid membranes. Formation of discrete products, *Biochim. Biophys. Acta*, **390**: 352–362, 1975.
- [165] MICHEL J. M., MICHEL-WOLWERTZ M. R., Fractionation of the photosyn-

- thetic apparatus from broken spinach chloroplasts by sucrose density-gradient centrifugation, *Carnegie Inst. Year B.*, **67**: 508-514, 1967.
- [166] MILLER K. R., A particle spanning the photosynthetic membrane, *J. Ultrastr. Res.*, **54**: 159-167, 1976.
- [167] MILLER K. R., A chloroplast membrane lacking photosystem I. Changes in unstacked membrane regions, *Biochim. Biophys. Acta*, **592**: 143-152, 1980.
- [168] MILLER K. R., MILLER G. J., MCINTYRE K. R., The light-harvesting chlorophyll protein complex of photosystem II. Its location in the membrane, *J. Cell Biol.*, **71**: 624-638, 1976.
- [169] MILLER K. R., STAEHELIN L. A., Analysis of the thylakoid outer surface. Coupling factor is limited to unstacked membrane regions, *J. Cell Biol.*, **68**: 30-47, 1976.
- [170] MILLNER P. A., BARBER J., Plastoquinone as a mobile redox carrier in the photosynthetic membrane, *FEBS Lett.*, **169**: 1-6, 1984.
- [171] MILLS J. D., MITCHELL P., Modulation of coupling factor ATPase activity in intact chloroplasts. Reversal of thiol modulation in the dark, *Biochim. Biophys. Acta*, **679**: 75-83, 1982.
- [172] MŁODZIANOWSKI F., WOŻNY A., Wykłady i ćwiczenia z biologii komórki roślinnej, *Wyd. Naukowe U.A.M.*, 176-223, 1981.
- [173] MOLLER C. H., MUDD J. B., Localization of filipin-sterol complexes in the membranes of *Beta vulgaris* roots and *Spinacia oleracea* chloroplasts, *Plant Physiol.*, **70**: 1554-1561, 1982.
- [174] MÖRSCHER E., STAEHELIN L. A., Reconstruction of cytochrome f/b_6 and CF_0 - CF_1 ATP synthetase complexes into phospholipid and galactolipid liposomes, *J. Cell Biol.*, **97**: 301-310, 1983.
- [175] MULLET J. E., The amino acid sequence of the polypeptide segment which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts, *J. Biol. Chem.*, **258**: 9941-9948, 1983.
- [176] MULLET J. E., ARNTZEN C. J., Simulation of grana stacking in a model membrane system. Mediation by a purified light-harvesting pigment protein complex from chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **589**: 100-117, 1980.
- [177] MULLET J. E., BALDWIN T. O., ARNTZEN C. J., A mechanism for chloroplast thylakoid adhesion mediated by the chl. a/b light harvesting complex, [W:] *Photosynthesis III. Structure and Molecular Organization of the Photosynthetic Apparatus*, ed. G. Akoyunoglou, Balaban International Science Philadelphia, 557-582, 1981.
- [178] MULLET J. E., BURKE J. J., ARNTZEN CH. J., Chlorophyll proteins of photosystem I, *Plant Physiol.*, **65**: 814-822, 1980.
- [179] MURAKAMI S., KUNIEDA R., Location of coupling factor particles on the thylakoid of spinach chloroplasts, [W:] *Photosynthetic Organelles*, eds. S. Miyachi, S. Katoh, Y. Fujita and K. Shibata, Special issue of *Plant Physiol.*, 403-414, 1977.
- [180] MURATA N., Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **172**: 242-251, 1969.
- [181] MURATA N., BROWN J., Photochemical activities of spinach chloroplast particles fractionated after French-press treatment, *Plant Physiol.*, **45**: 360-361, 1970.
- [182] MUSTÁRDY L. A., JÁNOSSY A. G. S., Evidence of helical thylakoid arrangement by scanning electron microscopy, *Plant Sci. Lett.*, **16**: 281-284, 1979.

- [183] MÜHLETHALER K., MOOR H., SZARKOWSKI J. W., The ultrastructure of the chloroplast lamellae, *Planta*, **67**: 305–323, 1965.
- [184] MYERS J., Enhancement studies in photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **22**: 289–312, 1971.
- [185] NELSON N., Structure and function of chloroplast ATPase, *Biochim. Biophys. Acta*, **456**: 314–338, 1976.
- [186] — Proton-ATPase of chloroplasts, *Curr. Top. Bioenerg.*, **11**: 1–33, 1981.
- [187] NGUYEN T. D., SIEGENTHALER P.-A., Proteins and polypeptides of envelope membranes from spinach chloroplasts. Properties of a membrane-bound ATPase, *FEBS Lett.*, **164**: 67–70, 1983.
- [188] NIR I., PEASE D. C., Chloroplast organization and the ultrastructural localization of photosystem I and II, *J. Ultrastruct. Res.*, **42**: 534–550, 1973.
- [189] OGDEN R. C., KNOPP G., PEEBLES C. L., KANG H. S., BECKMANN J. S., JOHNSON P. F., FUHRMAN S. A., ABELSON J. N., [W:] Transfer RNA: biological aspects, eds. D. Söll, J. N. Abelson, P. R. Schimmel, Cold Spring Harbor, New York, 173–190, 1980.
- [190] OJAKIAN G. K., SATIR P., Particle movements in chloroplast membranes: quantitative measurements of membrane fluidity by the freeze-fracture technique, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**: 2052–2056, 1974.
- [191] OLESZKO S., MOUDRIANAKIS E. N., The visualisation of photosynthetic coupling factor in embedded spinach chloroplasts, *J. Cell Biol.*, **63**: 936–948, 1974.
- [192] OPARIN A. I., ODINTSOVA M. S., YURINA N. P., Chloroplast ribosomes as ribosomes of the prokaryotic type, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **168**: 175–183, 1975.
- [193] PAOLILLO D. J. Jr., The three-dimensional arrangement of intergranal lamellae in chloroplasts, *J. Cell Sci.*, **6**: 243–255, 1970.
- [194] PAOLILLO D. J. Jr., RUBIN G., Reconstruction of the grana-fretwork system of a chloroplast, *Amer. J. Bot.*, **67**: 575–584, 1980.
- [195] PARK R. B., SANE P. V., Distribution of function and structure in chloroplast lamellae, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **22**: 395–430, 1971.
- [196] PARTHIER B., The cooperation of nuclear and plastid genomes in plastid biogenesis and differentiation, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **177**: 283–317, 1982.
- [197] PEAT A., BANBURY G. B., Occurrence of Triticale-like particles in a fungus, *Planta*, **79**: 268–270, 1968.
- [198] POINCELOT R. P., DAY P. R., An improved method for the isolation of spinach chloroplast envelope membranes, *Plant Physiol.*, **54**: 780–783, 1974.
- [199] PRIESTLEY D. A., WOOLHOUSE H. W., The chloroplast envelope of *Phaseolus vulgaris* L. II. Enzymic characteristics, *Plant Cell Physiol.* **21**: 709–717, 1980.
- [200] PUESCHEL C. M., COLE K. M., Phytoferritin in the red alga *Constantinea* (*Cryptonemiales*), *J. Ultrastruct. Res.*, **73**: 282–287, 1980.
- [201] PUNNETT T., Environmental control of photosynthetic enhancement, *Science*, **171**: 284–286, 1970.
- [202] RADUNZ A., SCHMID G. H., MENKE W., Antibodies to chlorophyll and their reactions with chloroplast preparations, *Z. Naturforsch.*, **26b**: 435–446, 1971.
- [203] REMY R., HOARAU J., LEDERE J. C., Electrophoretic and spectrophoto-

- metric studies of chlorophyll protein complexes, *Photochem. Photobiol.*, **25**: 151–158, 1977.
- [204] ROBARDS A. W., HUMPHERSON P. G., Phytoferritin in plastids of the cambial zone of willow, *Planta*, **76**: 169–178, 1967.
- [205] ROBARTS D. M., ZIELINSKI R. E., SCHLEICHER M., WATTERSON D. M., Analysis of suborganellar fractions from spinach and pea chloroplasts for calmodulin-binding proteins, *J. Cell Biol.*, **97**: 1644–1647, 1983.
- [206] ROBINSON S. P., Transport of glycerate across the envelope membrane of isolated spinach chloroplasts, *Plant Physiol.*, **70**: 1032–1038, 1982.
- [207] ROLLESTON F. S., Membrane-bound and free ribosomes, *Sub-Cell Biochem.*, **3**: 91–117, 1974.
- [208] ROUGHAN P. G., SLACK C. R., Long-chain acyl-coenzyme A synthetase activity of spinach chloroplasts is concentrated in the envelope, *Biochem. J.*, **162**: 457–459, 1977.
- [209] ROY H., ADARI H., COSTA K. A., Characterization of free subunits of ribulose 1.5-bisphosphate carboxylase, *Plant Sci. Lett.*, **16**: 305–318, 1979.
- [210] ROY H., BLOOM M., MILOS P., MONROE M., Studies on the assembly of large subunits of ribulose bisphosphate carboxylase in isolated pea chloroplasts, *J. Cell Biol.*, **94**: 20–27, 1982.
- [211] RYRIE I. J., ANDERSON J. M., GOODCHILD D. J., The role of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex in chloroplast membrane stacking, *Eur. J. Biochem.*, **107**: 345–354, 1980.
- [212] SABATINI D. D., KREIBICH G., Functional specialization of membrane-bound ribosomes in eukaryotic cells, [W:] *The Enzymes of Biological Membranes*, ed. A. Martonosi, Plenum Press, New York, 531–579, 1976.
- [213] SANDELIUS A. S., LILJENBERG C., Light-induced changes in the lipid composition and ultrastructure of plastids from potato tubers, *Physiol. Plant.*, **56**: 266–272, 1982.
- [214] SANE P. V., GOODCHILD D. J., PARK R. B., Characterization of photosystems I and II separated by a non-detergent method, *Biochim. Biophys. Acta*, **216**: 162–178, 1970.
- [215] SATOH K., Photosystem II reaction center complex purified from higher plants, [W:] *The Oxygen Evolving System of Photosynthesis*, eds. Y. Inoue, A. R. Crofts, Govindjee, N. Murata, G. Renger and K. Satoh, Academic Press, Tokyo, 27–38, 1983.
- [216] SATOH K., FORK D. C., A new mechanism for adaptation to changes in light intensity and quality in the red alga, *Porphyra perforata*. I. Relation to state 1 — state 2 transitions, *J. Cell Biol.*, **722**: 190–196, 1983.
- [217] SCHATZ G., How mitochondria import proteins from the cytoplasm, *FEBS Lett.*, **103**: 203–211, 1979.
- [218] SCHÄFER G., HEBER U., HELDT H. W., Glucose transport into spinach chloroplasts, *Plant Physiol.*, **60**: 286–289, 1977.
- [219] SCHIMPER A. F. W., Untersuchungen über die Chlorophyllkörper und die ihnen homologen Gebilde, *Jahrbücher Wiss. Bot.*, **16**: 1–247, 1885.
- [220] SCHMIDT R. J., RICHARDSON C. B., GILLHAM N. W., BOYNTON J. E., Sites of synthesis of chloroplast ribosomal proteins in *Chlamydomonas*, *J. Cell Biol.*, **96**: 1451–1463, 1983.
- [221] SCHWARZ H. P., KLOPPSTECH K., Effect of nuclear gene mutations on the structure and function of plastids in pea. The light-harvesting chlorophyll a/b protein, *Planta*, **155**: 116–123, 1982.

- [222] SECKBACH J., Iron content and ferritin in leaves of iron-treated *Xanthium pennsylvanicum* plants, *Plant Physiol.*, **44**: 816–820, 1969.
- [223] — Electron microscopical observations of leaf ferritin from iron-treated *Xanthium* plant: localization and diversity in the organelle, *J. Ultrastruct. Res.*, **39**: 65–76, 1972.
- [224] SHORE G. C., TATA J., Function for polyribosome-membrane interactions in protein synthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **472**: 197–236, 1977.
- [225] SIGRIST-NELSON K., AZZI A., The proteolipid subunit of the chloroplast ATPase complex. Reconstitution and demonstration of proton-conductive properties, *J. Biol. Chem.*, **255**: 10638–10643, 1980.
- [226] SIMPSON D. J., Freeze-fracture studies on barley plastid membranes. III. Location of the light-harvesting chlorophyll-protein, *Carlsberg Res. Commun.*, **44**: 305–336, 1979.
- [227] SINGER S. J., NICOLSON G. L., The fluid mosaic structure of cell membranes, *Science*, **175**: 720–731, 1972.
- [228] SPREY B., LAETSCH W. M., Chloroplast envelopes of *Spinacia oleracea* L. II. Ultrastructure of chloroplast envelopes and lamellae, *Z. Pflanzenphysiol.*, **78**: 146–163, 1976.
- [229] STAEHELIN L. A., Reversible particle movements associated with unstacking and restacking of chloroplast membranes in vitro, *J. Cell Biol.*, **71**: 136–158, 1976.
- [230] STAEHELIN L. A., Freeze-fracture studies of green plant and *Prochloron thylakoids*. A status report, [W:] *Photosynthesis III. Structure and Molecular Organization of the Photosynthetic Apparatus*, ed. G. Akoyunoglou, Balaban International Science Services, Philadelphia, 3–14, 1981.
- [231] STAEHELIN L. A., ARNTZEN C. J., Effects of ions and gravity forces on the supramolecular organization and excitation energy distribution in chloroplast membranes, *Ciba Found. Symp.*, **61**: 147–175, 1979.
- [232] — Regulation of chloroplast membrane function: protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components, *J. Cell Biol.*, **97**: 1327–1337, 1983.
- [233] STAEHELIN L. A., DE WIT M., Correlation of structure and function of chloroplast membranes at the supramolecular level, *J. Cell Biochem.*, **24**: 261–269, 1984.
- [234] STEINBACH K. E., BURKE J. J., ARNTZEN C. J., Evidence for the role of surface-exposed segments of the light-harvesting complex in cation-mediated control of chloroplast structure and function, *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**: 546–557, 1979.
- [235] STROTMANN H., BICKEL-SANDKÖTTER S., Structure, function, and regulation of chloroplast ATPase, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**: 97–120, 1984.
- [236] STRYER L., HAUGLAND R. P., Energy transfer: a spectroscopic ruler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**: 719–729, 1967.
- [237] SÜSS K.-H., Identification of chloroplast thylakoid membrane polypeptides. ATPase complex (CF₁-CF₀) and light-harvesting chlorophyll a/b protein (LHCP) complex, *FEBS Lett.*, **112**: 255–259, 1980.
- [238] SÜSS K.-H., Topology and association of the subunits of chloroplast and etioplast ATPase complex (CF₁-CF₀). A lactoperoxidase-catalyzed iodination and limited proteolysis study, *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, **177**: 143–155, 1982.

- [239] TAKAHASHI M., GROSS E. L., Use of immobilised light-harvesting chlorophyll a/b-protein to study the stoichiometry of self-association, *Biochem.*, **17**: 806-810, 1978.
- [240] TAO K.-L. J., JAGENDORF A. T., The ratio of free to membrane-bound chloroplast ribosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **324**: 518-532, 1973.
- [241] TEVINI M., LICHTENTHALER H. K., Untersuchungen über die Pigment — und Lipochinonausstattung der zwei photosynthetischen Pigmentsysteme, *Z. Pflanzenphysiol.*, **62**: 17-32, 1970.
- [242] THOMSON W. W., Ultrastructural development of chromoplast in Valencia oranges, *Bot. Gaz.*, **127**: 133-139, 1966.
- [243] THORNER J. P., Chlorophyll-proteins: light-harvesting and reaction center components of plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **26**: 127-158, 1975.
- [244] THORNER J. P., ALBERTE R. S., HUNTER R. S., SHIOZAWA J. A., KAN K. S., The organization of chlorophyll in the plant photosynthetic unit, *Brookhaven Symp. Biol.*, **28**: 138-152, 1977.
- [245] THORNER J. P., MARKWELL J. P., REINMAN S., Plant chlorophyll-protein complexes: recent advances, *Photochem. Photobiol.*, **29**: 1205-1216, 1979.
- [246] TUQUET C., GUILLOT-SALOMON T., DE LUBAC M., SIGNOL M., Granum formation and the presence of phosphatidyl-glycerol containing trans-hexadecenoic acid, *Plant Sci. Lett.*, **8**: 59-64, 1977.
- [247] TYMMS M. J., SCOTT N. S., POSSINGHAM J. V., DNA content of *Beta vulgaris* chloroplast during leaf cell expansion, *Plant Physiol.*, **71**: 785-788, 1983.
- [248] VAMBUTAS V. K., RACKER E., Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. I. Stimulation of photophosphorylation by a preparation of a latent, Ca^{++} -dependent adenosine triphosphatase from chloroplasts, *J. Biol. Chem.*, **240**: 2660-2667, 1965.
- [249] VAN BESOUW A., WINTERMANS J. F. G., Galactolipid formation in chloroplast envelopes. I. Evidence for two mechanisms in galactosylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **529**: 44-53, 1978.
- [250] VAN DER MARK F., DE LANGE T., BIENFAIT H. F., The role of ferritin in developing primary bean leaves under various light conditions, *Planta*, **153**: 338-342, 1981.
- [251] VAN DER MARK F., VAN DER BRIEL M. L., VAN OERS J. W. A. M., BIENFAIT H. F., Ferritin in bean leaves with constant and changing iron status, *Planta*, **156**: 341-344, 1982.
- [252] VAUGHN K. C., VIERLING E., DUKE S. O., ALBERTE R. S., Immunocytochemical and cytochemical localization of photosystems I and II, *Plant Physiol.*, **73**: 203-207, 1983.
- [253] VERNON L. P., KE B., MOLLENHAUER H. H., SHAW E. R., Composition and structure of spinach subchloroplast fragments obtained by the action of Triton X-100, *Progress Photosynth. Res.*, **1**: 137-148, 1969.
- [254] VIERLING E., ALBERTE R. S., P_{700} chlorophyll a-protein. Purification, characterization, and antibody preparation, *Plant Physiol.*, **72**: 625-633, 1983.
- [255] — Regulation of synthesis of the photosystem I reaction center, *J. Cell Biol.*, **97**: 1806-1814, 1983.
- [256] WAGENVOORD R. J., VERSCHOOR G. J., KEMP A., Photolabelling with 8-azido adenine nucleotides of adenine nucleotide-binding sites in isolated spinach chloroplast ATPase (CF_1), *Biochim. Biophys. Acta*, **634**: 229-236, 1981.

- [257] WEIER T. E., BENSON A. A., The molecular organization of chloroplast membranes, *Amer. J. Bot.*, **54**: 389-402, 1967.
- [258] WEIER T. E., STOCKING C. R., THOMSON W. W., DREVER J., The grana as structural units in chloroplasts of mesophyll of *Nicotiana rustica* and *Phaseolus vulgaris*, *J. Ultrastruct. Res.*, **8**: 122-143, 1963.
- [259] WERNER-WASHBURNE M., CLINE K., KEEGSTRA K., Analysis of pea chloroplast inner and outer envelope membrane proteins by two-dimensional gel electro-phoresis and their comparison with stromal proteins, *Plant Physiol.*, **73**: 569-575, 1983.
- [260] WESSELS T. S. C., Separation of the two photochemical systems of photosynthesis by digitonin fragmentation of spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **65**: 561-564, 1962.
- [261] WESTHOFF P., ALT J., NELSON N., BOTTOMLEY W., BÜNEMANN H., HERRMANN R. G., Genes and transcripts for the P₇₀₀ chlorophyll a apoprotein and subunit 2 of the photosystem I reaction center complex from spinach thylakoid membranes, *Plant Mol. Biol.*, **2**: 95-107, 1983.
- [262] WHATLEY J. M., Variation in the basic pathway of chloroplast development, *New Phytol.*, **78**: 407-420, 1977.
- [263] — A suggested cycle of plastid developmental intrerrelationship, *New Phytol.*, **80**: 489-502, 1978.
- [264] WHATLEY J. M., HAWES C. R., HORNE J. C., KERR J. D. A., The establishment of the plastid thylakoid system, *New Phytol.*, **90**: 619-629, 1982.
- [265] WIĘCKOWSKI S., Struktura błon tylakoidów, *Post. Biol. Kom.*, **2**: 147-164, 1975.
- [266] WILDMAN S. G., JOPE CH. A., ATCHISON B. A., Light microscopic analysis of the three-dimensional structure of higher plant chloroplasts. Position of starch grains and probable spiral arrangement of stroma lamellae and grana, *Bot. Gaz.*, **141**: 24-36, 1980.
- [267] WILLEY D. L., AUFFERET A. D., GRAY J. C., Structure and topology of cytochrome f in pea chloroplast membranes, *Cell*, **36**: 555-562, 1984.
- [268] WILLIAMS W. P., The two photosystems and their interaction, [W:] *Primary Processes of Photosynthesis*, ed. J. Barber, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 99-144, 1977.
- [269] WŁOCH E., Kompleks chlorofil a/b-białko zbierający energię świetlną, *Post. Biol. Kom.*, **8**: 107-125, 1981.
- [270] WOLLMAN F.-A., OLIVE J., BENNOUN P., RECOUVREUR M., Organization of the photosystem II centers and their associated antennae in the thylakoid membranes: a comparative ultrastructural, biochemical, and biophysical study of *Chlamydomonas* wild type and mutants lacking in Photosystem II reaction centers, *J. Cell Biol.*, **87**: 728-735, 1981.
- [271] WOŻNY A., Rola cytokinin w ontogenezie plastydów, *Post. Biol. Kom.*, **11(2)**: 1-49, 1984.
- [272] — Plastydowy DNA, *Post. Biol. Kom.*, **11(1)**: 71-92, 1984.
- [273] YAMAMOTO T., BURKE J., AUTZ G., JAGENDORF A. T., Bound ribosomes of pea chloroplast thylakoid membranes: location and release in vitro by high salt puromycin, and RNase, *Plant Physiol.*, **67**: 940-949, 1981.

Otrzymano: 25 lutego 1985.

Przyjęto: 24 kwietnia 1985.

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

AKROSYNA PLEMNIKÓW I JEJ INHIBITORY — WŁAŚCIWOŚCI
BIOCHEMICZNE ORAZ FUNKCJA W PROCESACH ROZRODU
ZWIERZĄT

ACROSIN OF SPERMATOOZA AND ITS INHIBITORS — BIOCHEMICAL
PROPERTIES AND FUNCTION IN THE PROCESSES OF ANIMAL
REPRODUCTION

Jerzy STRZEŻEK, Jadwiga TORSKA

Katedra Biochemii Zwierząt, Wydział Zootechniczny,
Akademia Rolniczo-Techniczna, Olsztyn—Kortowo, bl. 37

Streszczenie. Przedstawiono aktualne poglądy na powstawanie, lokalizację w układzie rozrodczym i właściwości fizykochemiczne poszczególnych składników systemu akrosynowego, tj. proakrosyny, akrosyny oraz naturalnych inhibitorów tego enzymu. Szczególną uwagę zwrócono na udział akrosyny w przebiegu procesów reprodukcyjnych u zwierząt oraz mechanizmy warunkujące zachowanie odpowiednio wysokiej aktywności wymienionego enzymu.

Summary. Recent views are presented as regards formation, location in the reproductive system, and physico-chemical properties of particular components of the acrosin system, viz. of proacrosin, acrosin, and natural inhibitors of this enzyme. Special attention was given to acrosin participation in the processes of animal reproduction, as well as to the mechanisms determining properly high activity of the enzyme.

WSTĘP

Akrosomy plemników charakteryzują się obecnością licznych enzymów hydrolitycznych, spośród których — ze względu na rolę w procesie zapłodnienia — na szczególną uwagę zasługują: hialuronidaza, kwaśna fosfataza, neuraminidaza oraz trypsynopodobny enzym — akrosyna [EC. 3.4.21.10] (tab. 1).

Funkcja biologiczna akrosyny polega na katalizowaniu reakcji hy-

TABELA 1

Enzymy hydrolityczne akrosomu plemnika

Hialuronidaza	N-acetylo- β -glukozaminidaza
Kwaśna fosfataza	Aspartyl amidaza
β -galaktozydaza	Amidaza arylowa
α -mannozydaza	Kwaśna proteaza
β -glukuronidaza	Kolagenaza
Neuraminidaza	Enzym penetracji komórek corona (CPE)
Arylosulfataza	RN-aza
Fosfolipaza A	DN-aza
	Akrosyna (EC 3.4.21.10.)

drolitycznego rozszczepiania sialoglikoproteinowej osłonki przejrzystej jaja (*zona pellucida*) w czasie procesu zapłodnienia [2, 11]. W reakcji tej omawiamy enzym współdziała z neuraminidazą.

Obecność akrosyny stwierdzono w ekstraktach plemników wielu gatunków zwierząt oraz człowieka, przy czym zwraca uwagę jej stosunkowo niska aktywność w ekstraktach plemników po ejakulacji w porów-

TABELA 2

Aktywność akrosyny w ekstraktach aksomowych plemników różnych gatunków zwierząt

*) 1 mU — ilość akrosyny powodująca zmianę absorpcji o 0,001/min w 253 nm z BAEE

Gatunek	Źródło plemników	mU *)/mg białka		
		zakres (mU)*	preinkubacja	
			pH 8,0	pH 3,0
Królik	ejakulat	0-20	9	950
	najądrze	112-573	400	830
Knur	ejakulat	0-91	8	1330
	najądrze	750-2390	1300	1360
Buhaj	ejakulat	0-1	1	120
	najądrze	0-24	5	130
Tryk	ejakulat	83-715	250	420
	najądrze	43-332	200	530
Ogier	ejakulat	0-138	25	460
	najądrze	0-1000	300	530
Małpa	ejakulat	74-240	83	120
Świnka morska	najądrze	1	1	4
Chomik	najądrze	0-0,3	0,3	4
Szczur	najądrze	0-1	1	3
Kogut	ejakulat	1800-2640	1660	830
	najądrze	880-2720	1850	500

naniu do obserwowanej w komórkach izolowanych z najądrzy czy też ekstraktach plemników ejakulowanych, poddanych inkubacji w roztworach o pH około 3,0 [116] (tab. 2).

Zjawisko to uwarunkowane jest występowaniem akrosyny w plemnikach ejakulowanych w formie nieaktywnego zymogenu, tzw. proakrosyny, stabilizowanego specyficznymi inhibitorami. Inhibitory akrosyny związane są również z plazmolemmą plemników [22].

Proakrosyna, akrosyna oraz naturalne inhibitory tego enzymu stanowią tzw. system akrosynowy plemników, którego prawidłowe funkcjonowanie warunkuje przebieg procesu zapłodnienia komórki jajowej.

Niniejsza praca dotyczy charakterystyki wymienionych białek akrosomowych oraz prezentuje obecne poglądy na ich funkcję w rozrodzie.

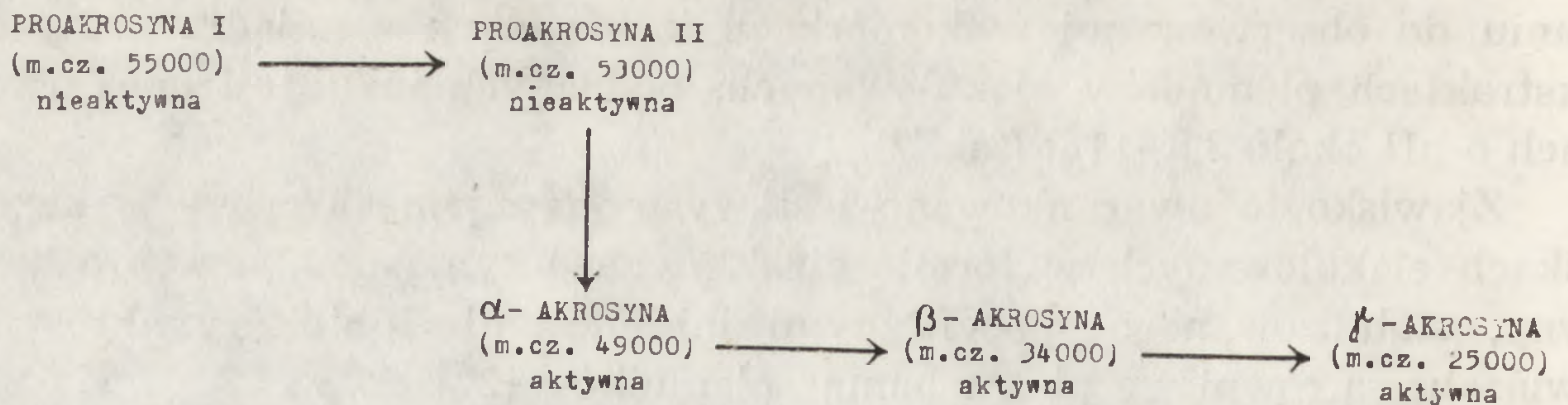
PROAKROSYNA

Zymogenowa forma akrosyny, tzw. proakrosyna, syntetyzowana w procesie spermatogenezy, pojawia się w haploidalnych spermatydach, po czym jej zawartość systematycznie wzrasta do momentu powstania plemników [46]. Obecność ziarnistości proakrosyny w obrębie akrosomu męskich komórek płciowych wskazywać może na wysoki stopień organizacji strukturalnej zymogenu, przypuszczalnie warunkującej prawidłowy przebieg proteolizy osłonki przejrzystej jaja [91, 111].

Proakrosynę izolowano i częściowo oczyszczono z jąder i plemników najądrzowych królika [49, 50] oraz ejakulowanych plemników knura [65]. Obecność zymogenu stwierdzono również w plemnikach najądrzowych chomika [51] oraz ejakulowanych plemnikach człowieka [66].

Masa cząsteczkowa proakrosyny waha się od 55000 u knura do 67000 u myszy. Aktywacja omawianego zymogenu przebiega w pH 8,0–8,5 i jest funkcją nieliniową [26]. Kontrola elektroforetyczna przebiegu procesu autoaktywacji proakrosyny wyodrębnionej z plemników knura wskazuje, że w miarę upływu czasu inkubacji pojawiają się 3 frakcje akrosynowe (α , β , γ) o tej samej specyficzności działania, różniące się masą cząsteczkową [65]. Przebieg omawianego procesu przedstawić można jako następujące po sobie reakcje (ryc. 1).

Proces aktywacji stymulowany jest dodatkiem czystych preparatów akrosyny lub trypsyny (stosunek enzym : zymogen = 1 : 20), jonami Ca^{2+} oraz zależy od stężenia proakrosyny w mieszaninie inkubacyjnej. Sugeruje się, że w warunkach fizjologicznych funkcję aktywatora, obok jonów wapniowych, pełnić może wolna akrosyna, występująca w plemnikach w stosunkowo niewielkich ilościach. Możliwe jest również proteolityczne działanie samego zymogenu [43].



Ryc. 1

AKROSYNA

W męskich komórkach płciowych ssaków akrosyna występuje w połączeniu z błoną wewnętrzną akrosomu [4, 13, 28, 32, 55, 76].

W ostatnim okresie wyizolowano oraz określono niektóre właściwości tego enzymu z plemników człowieka [30, 82], knura [23, 62, 80, 81, 121], królika [88, 89], tryka [9, 56, 84], buhaja [27] oraz koguta [11, 40, 59]. W stosowanych metodach oczyszczania etap wstępny stanowi filtracja żelowa ekstraktów akrosomowych z użyciem kwaśnego roztworu wymywającego. Procedura ta warunkuje oddzielenie akrosyny od inhibitorów tego enzymu. Dalsze postępowanie uwzględnia pochodzenie gatunkowe badanego materiału.

W tabeli 3 podano wartości masy cząsteczkowej akrosyny izolowanej z plemników różnych gatunków zwierząt. Ich znaczny rozrzut (od 22000 do 73000) uwarunkowany jest możliwościami tworzenia agregatów białko-

TABELA 3

Masa cząsteczkowa akrosyny różnych gatunków zwierząt

Gatunek	Zakres wartości
Królik	22 000-73 000
Knur	30 000-56 000
Buhaj	34 000-44 000
Tryk	30 000-34 000
Kogut	26 000

wych, powstałych w wyniku elektrostatycznego oddziaływania podjednostek akrosyny [29, 61, 91], oraz autolizą utworzonych produktów [27, 79]. Z tych też względów dokładne określenie masy cząsteczkowej enzymu jest niezmiernie utrudnione. Akrosyna knura np. ma masę cząsteczkową około 38000 [79]. Uzyskane preparaty zawierają jednakże dodatkowe formy tego enzymu o masach 37000, 34000, a nawet 10000. Ich obecność stwierdza się najczęściej w ekstraktach plemników nasienia przechowywanego przez pewien czas, co wskazuje na postępującą degradację cząsteczek akrosyny.

SKŁAD AMINOKWASOWY AKROSYNY

Akrosyna zaliczona jest do glikoprotein [79]. Zawartość węglowodanów w cząsteczce enzymu z plemników knura wynosi około 10⁰%. Zmiana ruchliwości elektroforetycznej pod wpływem neuraminidazy sugeruje, że różny udział węglowodanów w budowie akrosyny warunkować może powstawanie licznych form molekularnych tego enzymu [80].

W składzie aminokwasowym akrosyny, niezależnie od jej pocho-

TABELA 4

Skład aminokwasowy akrosyny i trypsyny (reszt/cząsteczkę)

Aminokwas	Akrosyna knura (m. cz. 30 000)	Akrosyna człowieka frakcja γ (m. cz. 25 000)	Trypsyna trzustkowa
Asp	23	21,2	21
Thr	20	9,7	10
Ser	18	26,6	24
Glu	27	19,6	21
Pro	40	6,2	9
Gly	34	32,4	20
Ala	19	13,6	13
Cys	8	nie oznaczano	4
Val	24	9,3	16
Met	6	nie oznaczano	1
Ile	17	9,4	12
Leu	21	13,2	12
Tyr	10	5,2	7
Phe	11	3,5	4
Lyz	16	11,0	11
His	6	4,1	3
Arg	25	6,3	6
Trp	3	nie oznaczano	3

dzenia gatunkowego, dominują seryna, prolina, kwasy glutaminowy oraz asparaginowy [82]. Zwraca uwagę zbliżony skład aminokwasowy (tab. 4) oraz podobna budowa centrum aktywnego omawianego enzymu do trypsyny trzustkowej [90].

Hamowanie aktywności akrosyny przez syntetyczne inhibitory proteinaz serynowych wskazuje na obecność seryny w centrum aktywnym tego enzymu. Funkcję pomocniczą w utrzymaniu katalitycznej aktywności akrosyny pełnią przypuszczalnie reszty histydyny.

Badania Źeleznej i Čechovej [21], dotyczące akrosyny knura, wykazały obecność w obu wyizolowanych formach enzymu (m.cz. 50000 i 35000) 12 reszt cysteinowych (tab. 5).

TABELA 5

Skład aminokwasowy formy α i β akrosyny knura

Aminokwas	Reszt/mol		Zmiany w procesie konwersji formy α		
	α	β	α	β	α - β
Asp	25,7	22,8	26	23	3
Thr	21,9	19,6	22	20	2
Ser	23,6	20,5	24	21	3
Glu	33,0	25,7	33	26	7
Pro	67,1	34,8	<u>67</u>	<u>35</u>	<u>32</u>
Gly	38,6	36,1	39	36	3
Ala	25,0	19,0	25	19	6
Cys	12,0	11,5	12	12	0
Val	26,7	22,1	27	22	5
Met	6,2	6,0	6	6	0
Ile	17,6	15,6	18	16	2
Leu	26,2	20,3	26	20	6
Tyr	11,6	8,8	12	9	3
Phe	12,8	10,0	13	10	3
His	5,9	4,6	6	5	1
Lys	19,0	15,8	19	16	3
Arg	27,0	21,6	27	22	5
Trp	11,5	10,5	11	10	1
Ogólnie			413	328	85

Znaczna zawartość aminokwasów hydrofobowych, szczególnie proliny, warunkuje powstanie hydrofobowych obszarów w cząsteczce akrosyny, uczestniczących przypuszczalnie w tworzeniu połączeń enzymu z błoną wewnętrzną akrosomu. Przejściu akrosyny α do β towarzyszy bowiem odłączenie hydrofobowej części enzymu i uwolnienie nowo powstałej formy do środowiska wewnątrzkomórkowego.

SUBSTRATY AKROSYNY

Oczyszczona akrosyna wykazuje aktywność endopeptydazową w stosunku do *azo*-kazeiny, zdenaturowanej hemoglobiny, żelatyny, fibrynogeny, immunoglobuliny G, kazeiny, rybonukleazy, lizozymu i łańcucha B insuliny. Nie hydrolizuje elastyny ani kolagenów, nie wykazuje również aktywności hydrolitycznej w stosunku do naturalnych substratów chymotrypsyny i innych endopeptydaz [29, 57, 62, 63, 72, 88, 114].

Omawiany enzym oddziałuje na typowe dla trypsyny substraty syntetyczne. Hydrolizuje estrowe i amidowe pochodne arginyłowe i lizyłowe, ze szczególną preferencją wiązań utworzonych przez grupy karboksylowe *L*-argininy [48].

Reakcje te wykorzystywane są do oznaczania aktywności akrosyny w nasieniu [14, 75]. W stosunku do większości syntetycznych substratów optimum pH działania enzymu zawiera się w granicach 8,0–8,5. Niektóre właściwości kinetyczne akrosyny plemników różnych gatunków zwierząt zestawiono w tab. 6.

TABELA 6

Niektóre właściwości kinetyczne akrosyny

Pochodzenie enzymu	Substrat	Optimum pH	K_m (M)
Knur	L – BAEE	8,5	5×10^{-5}
		8,0	3×10^{-4}
	DL – BAPA	7,8	4×10^{-4}
	DL – BLNA	8,0	7×10^{-4}
Tryk	L – BAEE	8,2	$1-3 \times 10^{-4}$
	L – TAME	8,2	$2,1 \times 10^{-5}$
	DL – BAPA	8,0	2×10^{-3}
	DL – BANA	8,0	2×10^{-4}
Królik	L – BAEE	8,0-8,4	$2,1-6,0 \times 10^{-5}$ $5,1 \times 10^{-6}$
	L – TAME	8,2-8,4	$2,4-3,3 \times 10^{-5}$
	DL – BAPA	8,0	$2,0 \times 10^{-3}$
	DL – BANA	8,0	$2,0 \times 10^{-4}$
Buhaj	DL – BAPA	8,0-78,	nie określono
	DL – BANA		
	L – TAME		
Kogut	L – BAEE	8,0	$0,9-4,2 \times 10^{-5}$
	L – TAME		$0,6-3,7 \times 10^{-5}$
	DL – BANA		$0,7-1,1 \times 10^{-4}$

L – BAEE: Ester etylowy N- α -benzoilo-L-argininyDL – BAPA: p-nitroanilid N- α -benzoilo-DL-argininyDL – BANA: β -naftyamid N- α -benzoilo-DL-argininy

L – TAME: ester metylowy p-toluenosulfonylo-L-argininy

DL – BLNA: p-nitroanilid-N- α -benzoilo-DL-lizyny

STABILNOŚĆ ENZYMU

Oczyszczone preparaty akrosyny są stabilne w roztworach kwaśnych o pH około 3,0 (akrosyna knura i człowieka w pH 2,3) oraz w temperaturze $+4^\circ\text{C}$. Wyjątek stanowi akrosyna ptaków, która w kwaśnych roztworach ulega inaktywacji [56, 80, 81]. W pH 6,5-8,0 akrosyna knura i człowieka jest stabilna w temperaturze $+4^\circ\text{C}$ przez 24 godz. Szybkie obniżenie wyjściowej aktywności enzymu w pH około 7,0 spowodowane

może być obecnością inhibitorów, adsorpcją akrosyny na powierzchni szkła lub autolizą cząsteczek enzymu, powstałą w wyniku modyfikującego działania detergentów stosowanych do ekstrakcji. Akrosyna ulega nieodwracalnej inaktywacji w pH powyżej 10. Liofilizowane preparaty enzymu, przechowywane w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$, zachowują aktywność w ciągu kilku miesięcy [48, 81].

WPLYW CZYNNIKÓW CHEMICZNYCH NA AKTYWNOŚĆ AKROSINY

Kationy jedno- i dwuwartościowe (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) aktywują lub stabilizują akrosynę, jednakże — w zależności od źródła gatunkowego enzymu — stwierdza się wyraźne różnice w rodzaju i stężeniu wymienionych jonów [56, 62, 63].

Stymulujący wpływ kationów na aktywność akrosyny związany jest przypuszczalnie z hamowaniem autolizy tego enzymu lub jego inaktywacji. Niektóre jony przeciwdziałają adsorpcji akrosyny na powierzchniach szklanych i plastikowych. Również dodatek niewielkich ilości białka ($0,1 \text{ mg/cm}^3$) obniża tempo inaktywacji akrosyny [56].

Omawiany enzym, z uwagi na swą glikoproteinową budowę, stosunkowo łatwo tworzy połączenia z węglowodanami, sterolami oraz poliaminami. Według Anderson i wsp. [1], fruktoza w stężeniach niższych od występujących fizjologicznie (poniżej 10 mM) hamuje aktywność akrosyny. Ten naturalny substrat energetyczny plemników pełnić więc może, obok inhibitorów akrosyny, funkcję regulatora aktywności enzymu w czasie transportu komórek w żeńskim układzie rozrodczym. Podobnie hamujący wpływ na aktywność akrosyny wywierają również siarczany steroli występujące w plemnikach. Bruck i Zimmerman [12] wykazali, że siarczany cholesterolu są specyficznymi, kompetycyjnymi inhibitorami omawianego enzymu. Przypuszcza się, że sulfatazy sterolowe, obecne w żeńskim układzie rozrodczym, stymulują dojrzewanie plemników do reakcji akrosomowej, hydrolizując występujące w akrosomach siarczany steroli.

Interesująca wydaje się funkcja poliamin w regulacji aktywności akrosyny i proakrosyny. Substancje te, naturalnie występujące w nasieniu człowieka i niektórych gatunków zwierząt, stymulują aktywność esterażową akrosyny [59] (tab. 7).

Wpływ poliamin na aktywność enzymu może być maskowany poprzez dodanie jonów wapniowych do mieszaniny inkubacyjnej. Jednak poliaminy, podobnie jak i jony wapniowe, chronią akrosynę przed autolizą. Zaskakujące jest obserwowane hamujące oddziaływanie omawianych substancji na przebieg procesu aktywacji proakrosyny. Zjawisko to spowodowane może być wiązaniem się poliamin w miejscach działania wolnej akrosyny, uczestniczącej zwykle w aktywacji zymogenu.

TABELA 7

Wpływ poliamin na aktywność i właściwości kinetyczne akrosyny
(* μ moli BAEE hydrolizowanego w ciągu min $\times 10^2$)

Poliaminy ⁺	Aktywność enzymu*		K _m (M $\times 10^4$)	V _{max} (μ moli/min/mg)
	-Ca ²⁺	+Ca ²⁺		
Bez dodatku	4,8	11,7	1,2	97
Spermina	11,1	12,5	1,3	175
Spermidyna	10,3	11,7	1,3	175
Kadaweryna	8,8	11,4	1,6	198
Putrescyna	7,2	11,7	1,6	198
1,3-diaminopropan	7,4	12,0	1,6	198

+ Stężenie poliamin w mieszaninie inkubacyjnej, 0,002 M bufor tris, pH 8,0; stężenie jonów Ca²⁺ 0,05 M.

NATURALNE INHIBITORY AKROSYNY

Oprócz wymienionych czynników, istotną rolę w regulacji aktywności akrosyny odgrywają naturalne inhibitory tego enzymu, obecne w plazmie nasienia, zaadsorbowane na zewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej w akrosomowym regionie plemników oraz zlokalizowane w obrębie tej struktury komórki [14, 22, 36, 38, 64, 98].

MIEJSCE SYNTEZY INHIBITORÓW

Plazmowe inhibitory akrosyny syntetyzowane są głównie przez komórki nabłonka gruczołów pęcherzykowych oraz, w mniejszym stopniu, komórki nabłonka przewodu najądrza w ogonie najądrzy [21, 24, 37, 110]. U knura i tryka obecność omawianych substancji stwierdzono również w komórkach nabłonka i wydzielinach nasieniowodu oraz kanalików nasiennych [24, 99, 100], u buhaja zaś w gruczołach bańki nasieniowodu [110].

Proces syntezy inhibitorów plazmowych podlega przypuszczalnie regulującemu działaniu testosteronu [83]. Ich zawartość w plazmie nasienia wykazuje znaczne różnicowanie gatunkowe, w obrębie zaś gatunku — zależność od wieku zwierząt [10, 103].

Drobnocząsteczkowe inhibitory akrosyny, występujące w obrębie akrosomu ejakulowanych plemników człowieka, knura i buhaja, wykazują właściwości antygenowe, odpowiadające inhibitorom z plazmy nasienia oraz identyczne lub zbliżone właściwości fizykochemiczne [53, 64, 101, 115]. Generalnie przyjmuje się więc, że są to te same substancje absorbowane przez plemniki z plazmy podczas ejakulacji lub transportu w najądrzach [19, 37, 77, 110]. Jednakże, in vitro, męskie komórki płciowe, izolowane z najądrzy knura, nie absorbują inhibitorów akrosyny.

Według Fritz i wsp. [24], w warunkach fizjologicznych w procesie tym przypuszczalnie uczestniczy nieznany czynnik, spełniający funkcję nośnika omawianych substancji lub też warunkujący ich modyfikację.

Do chwili obecnej jednoznacznie nie określono, czy w obrębie akrosomu plemników ejakulowanych inhibitory występują w formie wolnej, czy też tworzą połączenie z akrosyną lub proakrosyną. Według niektórych autorów [60, 87], wyższa zawartość akrosyny w plemnikach z najądrzy i kapacytowanych niż ejakulowanych wskazuje na obecność w tych komórkach kompleksu enzym-inhibitor. Przeważa pogląd, że omawiane substancje występują w męskich komórkach płciowych w formie wolnej [30]. Brana jest również pod uwagę możliwość przejściowego łączenia się inhibitorów wiązaniami niekowalencyjnymi z cząsteczką proakrosyny i uwalniania tych substancji podczas aktywacji proenzymu.

Zwraca uwagę fakt, że w ejakulowanych plemnikach ssaków molowa zawartość akrosyny i inhibitorów tego enzymu wyraża się stosunkiem 1:1 [10, 30], jednakże czynniki warunkujące utrzymanie stałego stosunku stężeń wymienionych substancji nie są znane.

WŁAŚCIWOŚCI INHIBITORÓW AKROSYNY

Plazmowe inhibitory akrosyny są białkami stabilnymi w środowisku kwaśnym. Wyizolowane z plazmy nasienia zachowują swoje właściwości w roztworach o pH 2,0–3,0 podczas ogrzewania do temperatury 75–100°C. Ich masy cząsteczkowe zawierają się w granicach 5000–13 000 [18, 25, 107].

W plazmie nasienia człowieka i buhaja stwierdzono obecność dwóch inhibitorów o różnych masach cząsteczkowych. Inhibitory HUSI-I (m.cz. 5400) i HUSI-II (m.cz. 12 700) z nasienia człowieka są zasadowymi polipeptydami [22, 73]. U buhaja w budowie inhibitora BUSI-II (m.cz. 6800) i w większym stopniu BUSI-I (m.cz. 8900) uczestniczy niezidentyfikowany składnik węglowodanowy, którego heterogenność przypuszczalnie warunkuje różne właściwości chromatograficzne i elektroforetyczne izoinhibitorów BUSI-I [15, 16, 120]. Masa cząsteczkowa licznych form molekularnych inhibitora z plazmy nasienia knura wynosi około 12 000, z czego 30% stanowią kwas sjałowy oraz węglowodany proste i ich aminowe pochodne [25]. U tego gatunku stwierdza się, zależnie od stosowanych metod izolacji i oczyszczania, również inhibitory o masie cząsteczkowej 6800, 5800 i 1600, być może powstałe z omawianego już tu inhibitora wskutek enzymatycznej degradacji lub też stopniowego odłączania części węglowodanowej w trakcie postępowania metodycznego [24].

Skład aminokwasowy inhibitorów z plazmy nasienia buhaja i knura przedstawiono w tab. 8.

TABELA 8

Skład aminokwasowy inhibitorów protaz z plazmy nasienia buhaja i knura

Aminokwas	Buhaj			Busi II	Knur		
	izoinhibitory BUSI I				izoinhibitory		
	A	B1	B2		A	A1	B
ASP	10	10	10	6	7	7	7
Thr	4	4	4	2	4	4	4
Ser	2	2	2	3	5	5	5
Glu	8	9	9	5	5	5	5
Pro	4	4	4	2	3	3	3
Gly	2	2	2	7	5	5	5
Ala	4	4	4	4	2	2	2
Cys	6	6	6	6	6	6	6
Val	1	1	1	3	1	1	1
Met	1	1	1	1	1	1	1
Ile	2	3	3	1	2	2	2
Leu	0	0	0	1	2	2	2
Tyr	3	5	5	2	3	3	3
Phe	4	6	6	2	5	5	5
Trp	0	0	0	0	1	1	1
Lys	3	3	3	8	5	4	6
His	2	2	2	2	3	3	3
Arg	1	1	1	2	5	6	6
Razem	57	63	63	57	65	65	67

Zawartość aminokwasów podano w molach na mol inhibitora.

Cechą wspólną budowy omawianych substancji jest niewielka zawartość lub brak tryptofanu w cząsteczce oraz obecność sześciu reszt cysteinowych, tworzących przypuszczalnie mostki dwusiarczkowe [15–17, 52, 108].

Inhibitory z plazmy nasienia wykazują zdolność kompetycyjnego hamowania aktywności niektórych enzymów proteolitycznych, ze szczególną preferencją proteinaz serynowych — trypsyny trzustkowej oraz akrosyny wyodrębnionej z plemników tego samego lub innego gatunku zwierząt [24, 25, 92, 117, 120]. Wyjątek stanowi inhibitor HUSI-I z nasienia człowieka nie oddziałujący na akrosynę [73] (tab. 9).

In vitro, w roztworach o pH około 8,0 kompleks akrosyna-inhibitor tworzy się ze stechiometrycznie równoważnych ilości obu składników w ciągu 1–5 min [24]. Przedstawiono w tab. 9 wartości stałej dysocjacji wskazują, że w tym pH rozpad powstałego połączenia jest bardzo powolny.

Hamowanie działania trypsyny przez inhibitory z nasienia człowieka i knura ma charakter „okresowy”. Ponowne ujawnienie się aktywności

tego enzymu w mieszaninie inkubacyjnej zachodzi znacznie szybciej niż w przypadku akrosyny [24, 25, 64]. Na uwagę zasługuje obecność w plazmie nasienia niektórych ssaków, inhibitorów o różnej specyficzności hamowania. HUSI-II z nasienia człowieka jest silnym inhibitorem akrosyny, HUSI-I zaś nie wpływa na aktywność tego enzymu, wykazuje natomiast zdolność hamowania aktywności elastazy z granulocytów [73]. Izoinhibitory BUSI-I z nasienia buhaja znacznie silniej oddziałują na akrosynę niż BUSI-II. Hamują ponadto aktywność katepsyny G i elastazy z ludzkich granulocytów [18, 92].

Mimo stwierdzonych różnic we właściwościach fizykochemicznych, omawiane substancje wykazują w obrębie danego gatunku zwierząt te same właściwości antygenowe. Stwierdza się również międzygatunkowe immunologiczne podobieństwo inhibitorów akrosyny [18, 24, 37, 115].

W plazmie nasienia niektórych gatunków ssaków, obok drobnocząsteczkowych inhibitorów proteinaz, występują również inhibitory trypsyny-akrosyny niestabilne w środowisku kwaśnym, o znacznie wyższej masie cząsteczkowej, zawierającej się w granicach 34 000–50 000 [14, 24, 98, 106, 107]. Ich pochodzenie, właściwości i funkcja fizjologiczna nie zostały do chwili obecnej dostatecznie określone. Nie wyjaśniony jest również przypuszczalny związek pomiędzy występującymi w układzie rozrodczym inhibitorami proteinaz o wysokiej i niskiej masie cząsteczkowej.

Jak stwierdzono tu już, inhibitory akrosyny, zlokalizowane w obrębie akrosomu plemników ejakulowanych, wykazują właściwości odpowiadające drobnocząsteczkowym inhibitorom tego enzymu, występującym w plazmie nasienia [14, 24, 73]. Pewnym zaskoczeniem jest więc stwierdzenie obecności w plemnikach knura inhibitora nie występującego w plazmie [109]. Inhibitor ten (m.cz. 7500, charakter glikoproteinowy), w odróżnieniu od inhibitorów plazmowych, jest specyficzny dla akrosyny, a ponadto zawiera w swej budowie tylko jeden mostek dwusiarczkowy, którego redukcja prowadzi do zaniku aktywności inhibitorowej. Wyniki wstępnych badań sugerują, że omawiana substancja występuje w plemnikach w ilości ekwimolarnej do ilości akrosyny.

BIOLOGICZNA FUNKCJA INHIBITORÓW

Inhibitory akrosyny, zlokalizowane w plemnikach, odgrywają przypuszczalnie istotną rolę w regulacji wewnątrzkomórkowej aktywności tego enzymu [109, 119]. Funkcja biologiczna inhibitorów plazmowych nie została w pełni określona. Substancje te nie przenikają ani przez błonę plazmatyczną, ani przez zewnętrzną błonę akrosomu, nie wywierają więc wpływu na aktywność akrosyny w nie uszkodzonych plemnikach

TABELA 9

Hamowanie aktywności proteinaz przez inhibitory z plazmy nasienia człowieka, buhaja i knura (wartości K_i)

Gatunek	Inhibitor	IzoINHIBITORY	Enzym							
			akrosyna	trypsyna	α -chymotrypsyna	plazmina	kaiikreina	katepsyna G	elastaza	
Człowiek	HUSI I		(-)	(+)	(+)				(+)	
	HUSI II		(+) 2×10^{-9}	(+)						
	BUSI I	A } B1 } B2 }	(+) $6,5 \times 10^{-10}$ *	(+) $8,1 \times 10^{-9}$	(+) $1,6 \times 10^{-6}$	(+)	(+) $1,6 \times 10^{-5}$	(+) $2,6 \times 10^{-6}$	(+) $1,1 \times 10^{-6}$	
Buhaj			(+) $5,8 \times 10^{-11}$ **							
	BUSI II	—	(+) $3,0 \times 10^{-6}$ * (+) $7,0 \times 10^{-6}$ **	(+) $5,0 \times 10^{-7}$	(+) $2,5 \times 10^{-5}$	(+)	(+) $1,0 \times 10^{-3}$	(-)	(-)	
Knur		A } A1 } B }	(+) $1,4 \times 10^{-9}$ **	(+) $3,2 \times 10^{-9}$	(+)	(+) $1,2 \times 10^{-5}$	(-)	(-)	(-)	

Objaśnienia: wartości stałych dysocjacji (K_i) kompleksu enzym — inhibitor podano w molach

* — akrosyna z plemników buhaja

** — akrosyna z plemników knura

[10, 24]. Uważa się więc, że plazmowe inhibitory akrosyny neutralizują katalityczne właściwości enzymu przedwcześnie uwalnianego (przed ejakulacją lub kapacytacją) z uszkodzonych lub obumarłych plemników [109, 113, 117]. Chronią w ten sposób białka nasienia i tkanki układu rozrodczego przed proteolityczną degradacją.

Substancje te pełnić mogą również inne funkcje. Przypuszcza się, że inhibitor BUSI-II z plazmy nasienia buhaja jest jednym z białek zasadowych, stabilizujących błony plazmatyczne plemników [18, 110]. Koinhibitory BUSI-I, wykazujące właściwości hamowania katepsyny G i elastazy, uczestniczyć mogą w mechanizmach ochronnych układu rozrodczego przed powstawaniem ognisk zapalnych w przypadkach patologicznych uszkodzeń granulocytów lub limfocytów [92]. Podobne właściwości wykazuje inhibitor HUSI-I z nasienia człowieka. Jednakże jego rola biologiczna jest bardziej jednoznaczna, ponieważ nie wywiera on wpływu na aktywność akrosyny [73].

MECHANIZM AKTYWACJI AKROSYNY W PROCESIE ZAPŁODNIENIA JAJA

Liczne badania, dotyczące systemu akrosynowego, pozwalają określić miejsce i funkcję w procesach rozrodu. Rola biologiczna akrosyny jest wprawdzie bezpośrednio związana z penetracją osłonki przejrzystej jaja, jednakże składniki systemu akrosynowego uczestniczą również w procesach poprzedzających tę reakcję.

Już w czasie ejakulacji na powierzchni plazmolemmy plemnika opłaszczają się białka wydzielin dodatkowych gruczołów płciowych. Obok wysokocząsteczkowych, termostabilnych glikoprotein, stanowiących czynnik dekapacytacji, na błonie plemnikowej wiążą się niskocząsteczkowe, plazmowe inhibitory akrosynowe [68]. System białek opłaszczających plemnik stabilizuje plazmolemmę oraz zapobiega zbyt wczesnemu uaktywnieniu enzymów akrosomalnych, związanych z zewnętrzną i wewnętrzną błoną tej struktury komórki.

W czasie wędrówki w żeńskich drogach płciowych plemniki podlegają zmianom przebiegającym w trzech ściśle ze sobą powiązanych fazach: kapacytacji, reakcji akrosomowej i zapłodnienia.

Procesowi kapacytacji towarzyszą przyspieszenie tempa metabolizmu plemników oraz zmiany na powierzchni plazmolemmy. Czynnikiem indukującymi kapacytację są wydzieliny gruczołów macicznych oraz błonka jajowodu, jak również albuminy surowicy krwi i komórki wzgórek jajonośnego (*cumulus oöphorus*). Plemniki są kapacytowane wyłącznie w estrus, a więc fazie pozostającej pod wpływem estrogenów [86]. Najbardziej istotne zmiany kapacytacyjne dotyczą plazmolemmy plemnika.

W czasie kapacytacji z powierzchni wymienionej błony oddysocjują zarówno wysokocząsteczkowe glikoproteiny, jak również plazmowe inhibitory akrosyny [47].

Zastosowanie znakowanych lektyn, a zwłaszcza konkanawaliny A, pozwoliło stwierdzić, że plemniki inkubowane 3 godz. w środowisku kapacytacyjnym zawierają większą liczbę miejsc receptorowych pozbawionych Con. A w regionie szczytowym akrosomu, podczas gdy region postakrosomalny wiąże tę substancję bez zmian [68, 105].

Omawiane zmiany kapacytacyjne plemników osiągają maksimum podczas łączenia się plazmolemmy z zewnętrzną błoną akrosomu. Zjawisko to, określane mianem reakcji akrosomowej, przejawia się tzw. wesikulacją, tj. fragmentacją błon z jednoczesnym rozpadem na pęcherzyki [71]. Towarzyszy mu uwolnienie pierwszego enzymu akrosomowego hialuronidazy katalizującej reakcję hydrolizy kwasu hialuronowego, stanowiącego składnik substancji międzykomórkowej *cumulus oöphorus* i *corona radiata* [2, 67]. Proces wesikulacji poprzedza odsłonięcie wewnętrznej błony akrosomalnej i przyczepienie plemników do osłonki *zoma pellucida*. Biochemiczny mechanizm reakcji akrosomowej poznany jest stosunkowo dobrze. Stwierdzono, że główną rolę w inicjacji połączenia błon akrosomalnych pełnią jony wapniowe. Zmiana szybkości transportu jonów Ca^{2+} przez błony plemnikowe zachodzi podczas kapacytacji plemników [85, 104].

W komórkach tych obecne są dwa systemy transportu jonów wapniowych — mitochondrialny oraz związany z plazmolemmą [5–7]. System mitochondrialny podlega regulującemu działaniu kalmoduliny, której obecność stwierdzono w plemnikach wielu gatunków zwierząt [41]. System transportu jonów Ca^{2+} przez plazmolemmę jest gatunkowo zróżnicowany. W przypadku plemników tryka stwierdzono obecność Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP-azy warunkującej około 14% membranowej aktywności ATP-azowej komórki [8], natomiast w plemnikach buhaja aktywność omawianego enzymu jest bardzo niewielka. U tego gatunku zwierząt transport jonów wapniowych sprzężony jest z transportem jonów Na^+ i niezależny od pH środowiska. Interesujące jest, że stosunek wymiany jonów $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ jest znacznie niższy w przypadku plemników ejakulowanych aniżeli plemników z najądrzy, nie opłaszczonych wydzielinami dodatkowych gruczołów płciowych [70]. Wskazywałoby to, że w czasie ejakulacji na plazmolemmie wiąże się specyficzny inhibitor wymiany jonów $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. W plazmie nasienia buhaja stwierdzono obecność tego typu białka inhibitorowego o masie cząsteczkowej około 15 000 oraz pI 8,3 [69]. Można przypuszczać, że w procesie kapacytacji białko jest usuwane lub podlega modyfikacji, umożliwiającej przyspieszenie transportu jonów wapniowych przez błony plemnikowe.

Znaczenie jonów Ca^{2+} w inicjacji reakcji akrosomowej zostało udo-

wodnione w badaniach z zastosowaniem przenośnika jonowego A23187 [33]. Preinkubacja plemników z wymienionym jonoforem, w obecności jonów Ca^{2+} , nie tylko prowadzi do wzrostu cytoplazmatycznego poziomu jonów Ca^{2+} , ale jednocześnie indukuje reakcję akrosomową [32, 104]. Mechanizm, w wyniku którego dochodzi do połączenia błon w obecności wysokich stężeń jonów wapniowych, nie jest dokładnie poznany. Yanagimachi i Usui [112] sugerują, że penetracja jonów wapniowych uczula błony akrosomowe, co przejawia się ich „pęcznieniem” i tendencją do zlewania.

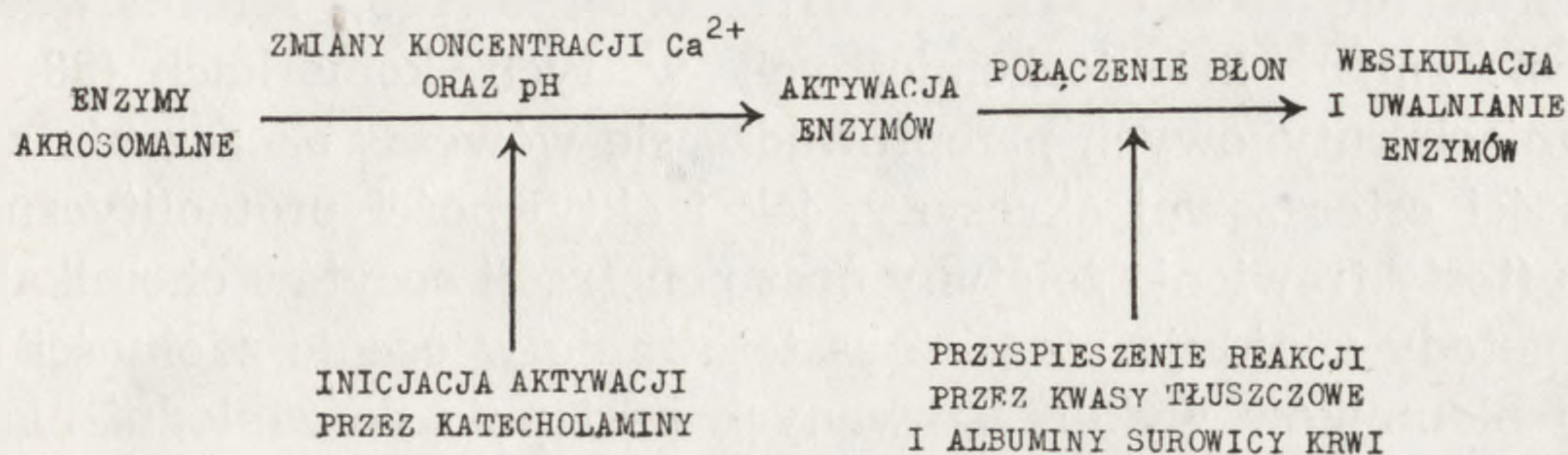
Reakcja ta hamowana jest przez antagonistów jonów Ca^{2+} . Rozważany jest również inny mechanizm tej reakcji, w którym główną rolę przypisuje się procesowi aktywacji proakrosyny. Aktywacja tego zymogenu jest ściśle związana z reakcją akrosomową i przebiega tylko w obecności jonów wapniowych, które prawdopodobnie przyczyniają się do zmiany pH środowiska z kwaśnego na obojętne lub zasadowe, co wiąże się z oddysocjowaniem inhibitorów akrosomowych. Inkubacja plemników w obecności jonoforu A 23187 oraz jonów Ca^{2+} prowadzi do wzrostu aktywności akrosyny w stopniu zależnym od stężenia jonów wapniowych w mieszaninie inkubacyjnej. Szybkość aktywacji zymogenu koreluje ze wzrostem aktywności tzw. rozpuszczalnej akrosyny [34].

Wpływ jonów wapniowych na wymienione procesy związany jest przypuszczalnie z dwoma drogami aktywacji systemu akrosomowego: proakrosyny oraz „wolnej” akrosyny. W drugim przypadku zjawisko dotyczyłoby tej ilości enzymu, która nie jest związana z wewnętrzną błoną akrosomalną [121]. Akrosyna „wolna”, aktywowana jonami wapniowymi, przyspieszać może tempo autoaktywacji zymogenu proakrosomowego. Wymienione mechanizmy przypuszczalnie nie działają w akrosomach plemników kapacytowanych równocześnie.

Proces aktywacji akrosyny wiąże się pośrednio z reakcją wesikulacji błon. Przypuszcza się bowiem, że akrosyna, obok cAMP, aktywuje fosfolipazy plemnikowe. Powstające produkty hydrolizy lipidów przyczyniają się do zmian przepuszczalności błon oraz ich połączenia. W reakcjach tych współdziałają katecholaminy [47]. Przebieg omawianych procesów ilustruje ryc. 2.

Powstająca aktywna akrosyna uczestniczy w penetracji plemników przez *zona pellucida*. Osłonka ta może wiązać męskie komórki płciowe zarówno zewnętrzną, jak i wewnętrzną powierzchnią, co sugeruje, że specyficzne miejsca wiążące zlokalizowane są w całej strukturze *zona pellucida*. Weserman, cyt. za [68], wyizolował trzy glikoproteiny charakterystyczne dla tej błony, spośród których jedna prawdopodobnie odpowiedzialna jest za wiązanie plemników. Plemniki wspomagane ruchem witki atakują omawianą osłonkę. Czas penetracji *zona pellucida* komórki

jajowej ssaków wynosi od kilku do kilkunastu minut (np. u chomika średnio 6 min). W momencie przejścia plemnika zapładniającego przez tę osłonkę następują jej zmiany biochemiczne, indukowane przypuszczalnie działaniem proteinaz [68]. Reakcja „zony” zapobiega polispermii. Plemnik zapładniający spotyka się z oolemmą, a następnie wnika do jaja [35].



Ryc. 2

UWAGI KOŃCOWE

Znaczenie fizjologiczne akrosyny, wprawdzie ściśle związane z aktywnością hydrolityczną tego enzymu i jego udziałem w penetracji osłonek jaja przez plemniki, nie ogranicza się tylko do tej funkcji. Akrosyna uwalniana z uszkodzonych plemników, w trakcie ich wędrówki w żeńskich drogach płciowych obniża lepkość śluzu szyjkowego, wspomagając na tej drodze ruch pozostałych komórek płciowych w tzw. powolnej fazie wędrówki do macicy i jajowodu. Enzym ten, podobnie jak kalikreina trzustkowa, katalizuje reakcję uwalniania kinin z kininogenu obecnego w plazmie nasienia. Powstałe substancje razem z prostaglandynami, oddziałując na mięśniówkę gładką żeńskich dróg płciowych, wywierają stymulujący wpływ na ruch plemników [45, 78].

Podobnie jak większość białek enzymatycznych, obecnych w męskich komórkach płciowych, akrosyna ma właściwości immunogenne. Pojawienie się specyficznych przeciwciał przeciwko temu enzymowi w wydzielinach macicy i jajowodu jest przyczyną nie tylko obniżenia ruchliwości plemników, ale również ich aktywności proteolitycznej [54, 102]. Występowanie tego rodzaju przeciwciał stwierdzono w wielu przypadkach klinicznej niepłodności samic [20]. Ich oddziaływanie na system akrosynowy plemników przejawia się w pierwszej fazie uszkodzeniem błon akrosomalnych, a następnie wiązaniem omawianych substancji na powierzchni komórek. W tym ostatnim przypadku zahamowaniu ulega tworzenie się kompleksu enzym-substrat.

W andrologii oznaczanie szybkości aktywacji proakrosyny oraz aktywności akrosyny wykorzystywane jest przy ocenie wartości biologicznej plemników oraz wpływu czynników środowiskowych na proces spermatogenezy [31, 45].

W postępowaniu technologicznym, podczas zamrażania nasienia zwierząt ulega uszkodzeniu przede wszystkim struktura akrosomowa plemników. Poza możliwością prowadzenia bardzo pracochłonnych i czasochłonnych badań morfologicznych i histochemicznych plemników, oznaczanie aktywności enzymów akrosomalnych, w tym także akrosyny, uwalnianych do środowiska zewnątrzkomórkowego, informować może o zakresie zmian kriobiochemicznych w tych komórkach [58, 93–97]. W badaniach rutynowych przeprowadza się wówczas oznaczenia zarówno aktywności esterazowej akrosyny, jak i aktywności proteolitycznej tego enzymu (testy trawienia żelatyny oraz penetracji oocytów chomika). Omawiane metody znajdują również zastosowanie w ocenie zdolności zapładniającej plemników wykorzystywanych następnie do zapłodnienia *in vitro* oocytów zwierzęcych [3, 42]. W tym ostatnim przypadku metoda długookresowej konserwacji zarodków zwierzęcych ma niezwykle znaczenie w sterowaniu pracą genetyczną w hodowli.

Wiele aspektów funkcji biochemicznej akrosyny w procesach rozrodu zwierząt wykorzystywanych jest w sterowaniu procesami reprodukcyjnymi u ludzi. Szczególne zainteresowanie wzbudzają syntetyczne inhibitory akrosynowe w zastosowaniu do antykoncepcji [118]. Mechanizm ich działania dotyczy blokowania reakcji akrosomowej lub wiązania plemników do *zona pellucida*. Poszukuje się również specyficznych związków chemicznych dla antykoncepcji męskiej. Stwierdzono, że *Gossypol*, roślina pochodna aldehydu diseskwiterpenowego, już w stężeniach 5,5–16,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ nasienia blokuje reakcję aktywacji proakrosyny do akrosyny [44].

Reasumując, funkcja podstawowej proteiny akrosomowej jest niezwykle wszechstronna. Wiele aspektów fizjologicznej roli akrosyny ma jeszcze charakter hipotetyczny. Związane jest to z niedostatkiem wiadomości o właściwościach biochemicznych oraz mechanizmie działania enzymu pochodzącego z plemników różnych gatunków zwierząt.

LITERATURA

- [1] ANDERSON R. A., OSWALD Ch., LETO S., ZANEVELD L. J. D., Inhibition of human acrosin by fructose and other monosacharidies, *Biol. Reprod.*, **22**: 1079–1082, 1982.
- [2] BEDFORD J. M., Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in euterian mammals, *Biol. Reprod.*, **28**: 108–120, 1983.
- [3] BRACKETT B. G., COFONE M. A., BOICE M. L., BOUSQUET D., Use of zona-free hamster ova to assess sperm fertilizing ability of bull and stallion, *Gamete Res.*, **5**: 217–227, 1982.
- [4] BRADFORD M. M., DUDKIEWICZ A. B., PENNY G. S., DYCKES D. F., BURLEIGH B. D., WOOLEY R. E., McRORIE R. A., Localization of pro-

- acrosin on the inner acrosomal membrane of spermatozoa in rabbits and hamsters, *Am. J. Vet. Res.*, **42**: 1082-1083, 1981.
- [5] BRADLEY M. P., VAN EERTEN M. T. W., RAYNS D. G., FORRESTER I. T., Membrane integrity and the regulation of calcium mammalian spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **20**: Suppl. 61A, 1979.
- [6] BRADLEY M. P., FORRESTER I. T., A sodium — calcium exchange mechanism in plasma membrane vesicles isolated from ram sperm flagella, *FEBS Lett.*, **121**: 15-18, 1980.
- [7] BRADLEY M. P., FORRESTER I. T., $[Ca^{2+} + Mg^{2+}]$ — ATPase and active Ca^{2+} — transport the plasma and membranes isolated from ram sperm flagella, *Cell Calcium*, **1**: 381-390, 1980.
- [8] BRADLEY M. P., FORRESTER I. T., Human and ram seminal plasma both contain a calcium — dependent regulator protein. *J. Androl.*, **3**: 289-296, 1982.
- [9] BROWN C. R., ANDANI Z., HARTREE E. F., Studies on ram acrosin. Isolation from spermatozoa activation by cations and organic solvents and influence of cations on its reactions with inhibitors, *Biochem. J.*, **149**: 133-146, 1975.
- [10] BROWN C. R., HARTREE E. F., An acrosin inhibitor in ram spermatozoa that does not originate from the seminal plasma, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**: 1909-1913, 1975.
- [11] BROWN C. R., HARTREE E. F., Comparison of neutral proteinase activities in cock and ram spermatozoa and observations on a proacrosin in cock spermatozoa, *J. Reprod. Fert.*, **46**: 155-164, 1976.
- [12] BRUCK P. J., ZIMMERMANN R. E., The inhibition of acrosin by sterol sulphates, *J. Reprod. Fert.*, **58**: 121-125, 1980.
- [13] CASTELIANI-CERESA L., BERRUTI G., COLOMBO R., Immunocytochemical localization of acrosin in boar spermatozoa, *J. Exp. Zool.*, **227**: 297-304, 1983.
- [14] ČECHOVÁ D., FRITZ H., Characterization of the proteinase inhibitors from bull seminal plasma and spermatozoa, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**: 401-408, 1976.
- [15] ČECHOVÁ D., JOŇAKOVÁ V., SEDLÁKOVÁ E., MACH O., Isolation of basic acrosin inhibitor from bull seminal plasma (BUSI-II) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**: 1753-1758, 1979.
- [16] ČECHOVÁ D., JOŇAKOVÁ V., HAVRÁNOVÁ M., SEDLÁKOVÁ E., MACH O., Isolation of acidic acrosin isoinhibitors (BUSI-I A, BUSI-I B1, BUSI-I B2) from bull seminal plasma, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**: 1759-1766, 1979.
- [17] ČECHOVÁ D., MELOUN B., Differences in the evolution of seminal plasma acrosin inhibitors and pancreatic secretory inhibitors. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**: 1497-1500, 1979.
- [18] ČECHOVÁ D., JOŇAKOVÁ V., Bull seminal plasma proteinase inhibitors, *Methods Enzymol.*, **80**: 792-803, 1981.
- [19] DIETL T., KRUCK J., SCHILL W.-B., FRITZ H., Localization of seminal plasma proteinase inhibitors in human spermatozoa as revealed by the indirect immunofluorescence technique, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**: 1333-1337, 1976.
- [20] DUDKIEWICZ A. B., Inhibition of fertilization in the rabbit by anti-acrosin antibodies, *Gamete Res.*, **8**: 183-197, 1983.

- [21] FINK E., KLEIN G., HAMMER R. MÜLLER-BARIDEFF G., FRITZ H., Protein protease inhibitors in male sex glands. In „Proc. 1 st. Inter. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors”, Munich 1970, Walter de Gruyter and Co., Berlin.
- [22] FINK E., JAUMANN E., FRITZ H., INGRISH H., WERLE E., Protease-Inhibitoren im menschlichen spermaplasma isolierung durch Affinitätschromatographie und Hemmverhalten, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **352**: 1591–1594, 1971.
- [23] FINK E., SCHIESSLER, ARNHOLD M., FRITZ H., Isolierung eines Trypsin-ähnlichen Enzymes (Akrosin) aus Eberspermien, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **353**: 1611–1637, 1972.
- [24] FRITZ H., SCHIESSLER H., SCHILL W.-B., TSCHESCHE H., HEIMBURGER N., WALLNER O., Low molecular weight proteinase (acrosin) inhibitors from human and boar seminal plasma and spermatozoa and human cervical mucus isolation, properties and biological aspects. In „Proteases and Biological Control”, Proc. Cold Spring Harbor Lab., New York, **2**: 737–766, 1975 (Reich E., Rifkin D. B., Shaw E., eds).
- [25] FRITZ H., TSCHESCHE H., FINK E., Proteinase inhibitors from boar seminal plasma, Methods Enzymol., **45**: 834–847, 1976.
- [26] FROMAN D. P., AMANN R. P., RICK P. M., OTAR T. T., Acrosin activity of canine spermatozoa as an index of cellular damage, J. Reprod. Fert., **70**: 301–308, 1984.
- [27] GARNER D. L., CULLISON R., Partial purification of bovine acrosin by affinity chromatography, J. Chromatog., **92**: 445–449, 1974.
- [28] GARNER D. D., EASTON M. P., Immunofluorescent localization of acrosin in mammalian spermatozoa, J. Exp. Zool., **200**: 157–162, 1977.
- [29] GILBOA E., ELKANA G., REGBI M., Purification and properties of human acrosin, Eur. J. Biochem., **39**: 85–92, 1973.
- [30] GOODPASTURE J. C., POLAKOSKI K. L., ZENEVELD L. J. D., Acrosin, pro-acrosin and acrosin inhibitor of human spermatozoa: extraction, quantitation and stability, J. of Andrology, **16**: 16–26, 1980.
- [31] GOODPASTURE J. C., ZAVOS P. M., COHEN M. R., ZANEVELD L. J. D., Effects of various conditions of semen storage on the acrosin system of human spermatozoa, J. Reprod. Fert., **63**: 397–405, 1981.
- [32] GREEN D. P. L., HOCKADAY A. R., The histochemical localization of acrosin guinea-pig sperm after the acrosome reaction, J. Cell Sci., **32**: 177–184, 1978.
- [33] GREEN D. P. L., The induction of the acrosome reaction in guinea-pig the divalent metal cation ionophore A 23187, J. Cell. Sci., **32**: 137–151, 1978a.
- [34] GREEN D. P. L., The activation of proteolysis in the acrosome reaction of guinea pig sperm, J. Cell. Sci., **32**: 153–164, 1978b.
- [35] GWATKIN R. B. L., Fertilization mechanism in man and mammals, Plenum Press, New York and London, 1977.
- [36] HAENDLE H., FRITZ H., TRAUTSCHOLD I., WERLE E., Über einen Hormonoabhängig Inhibitor für proteolytische Enzyme in Männlichen accessorigen Geschlechtsdrüsen und im sperma, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **343**: 185–188, 1965.
- [37] HIRSCHHAÜSER C., BAUNDER S., Immunologie localization of the human seminal plasma protease inhibitor in human spermatozoa, Fert. Steril., **23**: 393–398, 1973.

- [38] HIRSCHHAÜSER C., KIONKE M., Properties of a human seminal plasma inhibitor (HSI) for trypsin, *Fert. Steril.*, **22**: 360–365, 1971.
- [39] HO J. J. L., MEIZEL S., Electrophoretic detection of multiple forms of trypsin-like activity in spermatozoa of the domestic fowl, *J. Reprod. Fert.*, **23**: 177–179, 1970.
- [40] HO J. J. L., MEIZEL S., Biochemical characterization of an avian spermatozoa acrosin and comparison of its properties to those of bovine trypsin and mammalian acrosin, *Comp. Biochem. Physiol.*, **54B**: 213–218, 1976.
- [41] JONES H. P., LENZ R. W., PALERITZ B. A., CORMIER M., Calmodulin localization in mammalian spermatozoa, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **77**: 2772–2776, 1980.
- [42] KARP L. E., WILLIAMSON R. A., MOORE E. D., SHY K. K., PLYMATE S. R., SMITH C., Sperm penetration assay: Useful test in the evaluation of male fertility, *Obstet. Gynecol.*, **57**: 620–623, 1981.
- [43] KENNEDY W. P., POLAKOSKI K. L., Evidence for an intrazymogen mechanism in the conversion of proacrosin into acrosin, *Biochemistry*, **20**: 2240–2245, 1981.
- [44] KENNEDY W. P., Van der VEN H. H., STRAUS J. W., BHATTACHARYYA A. K., WALLER D. P., ZANEVELD L. J. D., POLAKOSKI K. L., Gossypol inhibition of acrosin and proacrosin and oocyte penetration by human spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **29**: 999–1009, 1983.
- [45] LEIDL W., WENDT V., Die Bedeutung des Spermienenzymes Akrosin bei der Fortpflanzung, *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **83**: 515–586, 1976.
- [46] LOC PHI-VAN, MÜLLER-ESTERL W., FLÖRKE S., SCHMIDT M., ENGEL W., Proacrosin and the differentiation of the spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **29**: 479–486, 1983.
- [47] MACK S., BHATTACHARYYA A. K., JOYCE C., Van der VEN H., ZANEVELD L. J. D., Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after in vitro capacitation, *Biol. Reprod.*, **28**: 1032–1042, 1983.
- [48] Mc RORIE R. A., WILLIAMS W. L., Biochemistry of mammalian fertilization, *Ann. Rev. Biochem.*, **43**: 777–803, 1974.
- [49] MEIZEL S., Biochemical detection and activation of an inactive form of a trypsin-like enzyme in rabbit testes, *J. Reprod. Fert.*, **31**: 459–462, 1972.
- [50] MEIZEL S., MUKERJI S. K., Proacrosin from rabbit epididymal spermatozoa: partial purification and initial biochemical characterization, *Biol. Reprod.*, **13**: 83–93, 1975.
- [51] MEIZEL S., MUKERJI S. K., Biochemical studies of proacrosin and acrosin from hamster epididymal spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **14**: 444–450, 1976.
- [52] MELOUN B., ČECHOVÁ D., Amino acid sequence of basic acrosin inhibitor from bull seminal plasma, *Coll. Czech. Chem.*, **44**: 2710–2720, 1979.
- [53] MIYAMOTO H., CHANG M. C., Effect of protease inhibitors on the fertilizing capacity of hamster spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **9**: 533–537, 1973.
- [54] MOLLOVA M., TARNYOR A., IVANOVA M., VALER B., Effect of isospermantibodies in follicular fluid and secretions of the oviduct and uterus on the motility and acrosomal proteolytic activity of spermatozoa. In „Immunology of Reproduction”. *Proc. Vth Int. Symp.*, Varna, 459–461, 1982.
- [55] MORTON D. B., Acrosomal enzymes: Immunological localization of acrosin and hyaluronidase in ram spermatozoa, *J. Reprod. Fert.*, **45**: 375–378, 1975.
- [56] MORTON D. B., The occurrence and function of proteolytic enzymes in the reproductive tract of mammals. In „Proteinases in Mammalian Cells and

- Tissues", 2: 445-500, 1977, Eds. A. J. Berrett, North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- [57] MULTAMÄKI S., NIEMI M., Trypsin-like proteolytic activity in acrosomal extract of bull spermatozoa, *Int. J. Fert.*, 17: 43-52, 1972.
- [58] PACE M. M., SULLIVAN J. J., ELIOTT F. I., GRAHAM E. F., COULTER G. H., Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 5 ml French straws, *J. Anim. Sci.*, 53: 693-701, 1981.
- [59] PARRISH R. F., POLAKOSKI K. L., Effect of polyamines on the activity of acrosin and the activation of proacrosin, *Biol. Reprod.*, 17: 417-422, 1977.
- [60] POLAKOSKI K. L., ZANEVELD L. J. D., WILLIAMS W. L., An acrosin-acrosin inhibitor complex in ejaculated boar spermatozoa, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 45: 381-383, 1971.
- [61] POLAKOSKI K. L., McRORIE R. A., WILLIAMS W. L., Purification of a proteolytic enzyme from rabbit sperm acrosomes, *Biol. Reprod.*, 6: 23-29, 1972.
- [62] POLAKOSKI K. L., McRORIE R. A., WILLIAMS W. L., Boar acrosin. I. Purification and preliminary characterization of a proteinase from boar sperm acrosomes, *J. Biol. Chem.*, 248: 8178-8182, 1973.
- [63] POLAKOSKI K. L., McRORIE R. A., Boar acrosin. II. Classification, inhibition and specificity studies of a proteinase from sperm acrosomes, *J. Biol. Chem.*, 248: 8183-8188, 1973.
- [64] POLAKOSKI K. L., WILLIAMS W. L., Isolation of proteinase inhibitors from boar sperm acrosomes and boar seminal plasma and effect on fertilization. In "Proteinase Inhibitors" — second International Research Conference, Bayer Symposium V, Springer Verlag, Berlin, 128-132, 1974. Fritz H., Tschesche W., Greene L. J., Truscheit E., eds.
- [65] POLAKOSKI K. L., PARRISH R. F., Boar proacrosin. Purification and preliminary activation studies of proacrosin isolated from ejaculated boar sperm, *J. Biol. Chem.*, 252: 1886-1894, 1977.
- [66] POLAKOSKI K. L., ZAHLER W. L., PAULSON J. D., Demonstration of proacrosin and quantitation of acrosin in ejaculated human spermatozoa.
- [67] ROGERS J., YANAGIMACHI R., Release of hyaluronidase from guinea pig spermatozoa through an acrosome reaction initiated by calcium, *J. Reprod. Fert.*, 44: 135-138, 1975.
- [68] ROGERS B. J., BENTWOOD B. J., Capacitation, acrosome reaction and fertilization. In „Biochemistry of Mammalian Reproduction", 203-230, 1982. Edited by Drs Zaneveld and Chatterton, Copyright by John Willey and Sons. Inc.
- [69] RUFO G. A., SINGH J. P., BABCOCK D. F., LARDY H. A., Purification and characterization of a calcium transport inhibitor protein from bovine seminal plasma, *J. Biol. Chem.*, 257: 4627-4632, 1982.
- [70] RUFO G. A., SCHOFF P. K., LARDY H. A., Regulation of calcium content in bovine spermatozoa, *J. Biol. Chem.*, 259: 2547-2552, 1984.
- [71] RUSSEL L., PETERSON R., FREUND M., Direct evidence for formation of hybrid vesicles by fusion of plasma and outer acrosomal membranes during the acrosome reaction in boar spermatozoa, *J. Exp. Zool.*, 208: 41-56, 1979.
- [72] SCHIESSLER H., FRITZ H., ARNHOLD M., FINK E., TSCHESCHE H., Eigenschaften der Trypsin-ähnlichen Enzyms (Acrosin) aus Eberspermin, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 353: 1638-1645, 1972.
- [73] SCHIESSLER H., ARNHOLD M., FRITZ H., Characterization of two prote-

- inase inhibitors from human seminal plasma and spermatozoa. In „Proteinase Inhibitors”, Bayer Symposium V, Springer-Verlag, Berlin, 147–155, 1974. Fritz H., Tschesche H., Greene L. J., Truscheit E., eds.
- [74] SCHILL W. B., Acrosin activity in human spermatozoa: methodological investigations, *Arch. Dermatol. Forsch.*, **248**: 257–273, 1973.
- [75] SCHILL W.-B., Quantitative determination of acrosin activity in human spermatozoa, *Fertil. Steril.*, **25**: 703–712, 1974.
- [76] SCHILL W.-B., SCHLEUNING W. D., FRITZ H., WENDT V., HEIMBURGER N., Immunofluorescent localization of acrosin in spermatozoa by boar acrosin antibodies, *Naturwissenschaften*, **62**: 540–541, 1975.
- [77] SCHILL W.-B., HEIMBURGER N., SCHIESSLER H., STOILA R., FRITZ H. Reversible attachment and localization of the acid-stable seminal plasma acrosin-trypsin inhibitors on boar spermatozoa as revealed by the indirect immunofluorescent staining technique, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**: 1473–1476, 1975.
- [78] SCHILL W.-B., Die Bedeutung von Acrosin und Proteinase-Inhibitoren die menschliche Fortpflanzung, *Fortschr. Med.*, **95**: 790–792, 1977.
- [79] SCHLEUNING W. D., FRITZ H., Some characteristics of highly purified boar sperm acrosin, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**: 125–130, 1974.
- [80] SCHLEUNING W. D., HELL R., SCHIESSLER H., FRITZ H., Boar acrosin, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**: 1915–1921, 1975.
- [81] SCHLEUNING W. D., FRITZ H., Sperm acrosin, *Methods Enzymol.*, **45**: 330–342, 1975.
- [82] SCHLEUNING W. D., HELL R., FRITZ H., Multiple forms of human acrosin: Isolation and properties, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**: 855–865, 1976.
- [83] SCHIRREN C., KAUKEL H., KETELS-HARKEN H., Acrosin and trypsin inhibitor activity in the human ejaculate following testosterone treatment in cases of autoagglutination of spermatozoa., *Andrologia*, **9**: 313–314, 1977.
- [84] SHAMS BARHAN G., SCHLEUNING W. D., TSCHESCHE H., FRITZ H., Occurrence of multiple forms of bull and ram acrosin during proenzyme activation and inhibition of activation by p-nitrophenyl p'-guanidinobenzoate, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**: 667–671, 1976.
- [85] SINGH J. P., BABCOCH D. F., LARDY H. A., Increased calcium — ion influx is a component of capacitation of spermatozoa, *Biochem. J.*, **172**: 549–556, 1978.
- [86] SINGHAS C. A., OLIPHANT G., Ultrastructural observations of the time sequence of induction of acrosomal membrane alterations by ovarian follicular fluid, *Fertil. Steril.*, **29**: 194–201, 1978.
- [87] STAMBAUGH R., BUCKLEY J., Identification and subcellular localization of the enzyme effecting penetration of the zona pellucida by rabbit spermatozoa, *J. Reprod. Fert.*, **19**: 423–432, 1969.
- [88] STAMBAUGH R., BUCKLEY J., Studies on acrosomal proteinase of rabbit spermatozoa, *Biochim. Biophys. Acta*, **284**: 473–477, 1972.
- [89] STAMBAUGH R., SMITH M., A comparison of several extraction procedures for rabbit acrosomal enzymes, *J. Reprod. Fert.*, **35**: 127–130, 1973.
- [90] STAMBAUGH R., Amino acid content of rabbit acrosomal proteinase and its similarity to human trypsin, *Science*, **186**: 745–746, 1974.
- [91] STAMBAUGH R., SMITH M., FALTAS S., An organized distribution of acrosomal proteinase in rabbit spermatozoas, *J. Exp. Zool.*, **193**: 119–122, 1975.
- [92] STANCIKOWÁ M., ČECHOWÁ D., TRNAVSKÝ K., Inhibition of leukocyte

- granule proteinases by natural inhibitors isolated from colostrum and bull seminal plasma, *Hoppe-Selyers Z. Physiol. Chem.*, **361**: 1129–1133, 1980.
- [93] STRZEŻEK J., TORSKA J., TAHA JASSIM AL-TAHA, GLOGOWSKI J., Biochemical methods could help improve bull semen freezing, *Practical Biotechnology*, 14–19, August 1981.
- [94] STRZEŻEK J., TORSKA J., TAHA JASSIM AL-TAHA, The use of enzymatic tests to get better frozen semen yields, *Practical Biotechnology*, 16–18, October 1981.
- [95] STRZEŻEK J., GLOGOWSKI J., MAGIERSKA E., LUBERDA Z., JABŁONOWSKA C., Some aspects of cryobiochemistry of boar semen. *Proc. 10-th Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem. Illinois 10–14 June*, 244–246, 1984.
- [96] STRZEŻEK J., ŚWIDOWICZ K., Kryobiochemische Veränderungen der Spermien und der biologische Wert von Bullensperma, *Zuchthygiene (w druku)*.
- [97] STRZEŻEK J., ŚWIDOWICZ K., HOSAJA M., TORSKA J., Möglichkeiten einer biochemischen Qualitäts — beurteilung von Bullensperma. *Vorträge 3 Symposium, Berlin*, 48–74, 1983.
- [98] SUOMINEN J. J. O., NIEMI M., Human seminal trypsin inhibitors, *J. Reprod. Fert.*, **29**: 163–172, 1972.
- [99] SUOMINEN J., SETCHELL B. P., Enzymes and trypsin inhibitor in the rete testis fluid of rams and boars, *J. Reprod. Fert.*, **30**: 235–245, 1972.
- [100] SUOMINEN J., KAUFMAN M. H., SETCHELL B. P., Prevention of fertilization in vitro by an acrosin inhibitor from rete testis fluid of the ram, *J. Reprod. Fert.*, **34**: 385–388, 1973.
- [101] SYNER F. N., KURRUS R., Comparison of molecular forms of trypsin acrosin isoinhibitors in human spermatozoa and seminal plasma. In „Abstracts of the 7th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 108–109, 1974, Ottawa.
- [102] SYNER F. N., KURRUS R., MOGHISSI K. S., Active immunization of female rabbits with purified rabbit acrosin and effect on fertility, *Fert. Steril.*, **32**: 468–473, 1979.
- [103] ŚMIGIELSKA J., STRZEŻEK J., Aktywność inhibitorów akrosyny w plazmie podczas zamrażania nasienia buhajów w ciekłym azocie, *Medycyna Wet.*, **8**: 500–501, 1979.
- [104] TALBOT P., SUMMERS R. G., HYLANDER B. L., KEOUGH E. M., FRANKLIN L. E., The role of calcium in the acrosome reaction: An analysis using ionophore A 23187, *J. Exp. Zool.*, **198**: 383–392, 1976.
- [105] TALBOT P., FRANKLIN L. E., Surface modification of guinea pig sperm during in vitro capacitation: An assessment using lectin-induced agglutination of living sperm., *J. Exp. Zool.*, **203**: 1–14, 1978.
- [106] TAUBER P. F., ZENEVELD L. J. D., PROPPING D., SCHUMACHER G. F. P., Components of human split ejaculates. II. Enzymes of proteinase inhibitors, *J. Reprod. Fert.*, **46**: 165–170, 1976.
- [107] TORSKA J., STRZEŻEK J., Niektóre właściwości biochemiczne wysokocząsteczkowego inhibitora proteinaz z plazmy nasienia buhaja, *Materiały Sympozjum „Zagadnienia biochemiczne męskiego układu rozrodczego w aspekcie płodności samca i konserwacji nasienia”*, 10–11, Olsztyn 1983.
- [108] TSCHESCHE H., KUPFER S., KLAUSER R., FINK E., E., FRITZ H., Structure, biochemistry and comparative aspects of mammalian seminal plasma acrosin inhibitors. In „Proteides of Biological Fluids”, *Proc. 23 vol. Colloq.*, 255–266, 1976, Pergamon Press, New York, Peeters H., eds.

- [109] TSCHESCHE H., WITTING R., DECKER G., MÜLLER-ESTERL W., FRITZ H., A new acrosin inhibitor from boar spermatozoa, *Eur. J. Biochem.*, **126**: 99–104, 1982.
- [110] VESELSKÝ L., ČECHOVÁ D., Distribution of acrosin inhibitors in bull reproductive tissues and spermatozoa, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361**: 715–722, 1980.
- [111] YANAGIMACHI R., TEICHMAN R. J., Cytochemical demonstration of acrosomal proteinase in mammalian and avian spermatozoa by a silver proteinate method, *Biol. Reprod.*, **6**: 87–97, 1972.
- [112] YANAGIMACHI R., USUI N., Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea-pig spermatozoa, *Exp. Cell. Res.*, **89**: 161–171, 1974.
- [113] ZANEVELD L. J. D., ROBERTSON R. T., KESSLER M., WILLIAMS W. L., Inhibition of fertilization in vivo by pancreatic and seminal plasma proteinase inhibitors, *J. Reprod. Fert.*, **25**: 387–392, 1971.
- [114] ZANEVELD L. J. D., POLAKOSKI K. L., WILLIAMS W. L., Properties of proteolytic enzyme from rabbit sperm acrosomes, *Biol. Reprod.*, **6**: 30–39, 1972.
- [115] ZANEVELD L. J. D., DRAGOJE B. M., SCHUMACHER G. F. B., Acrosomal proteinase and proteinase inhibitor of human spermatozoa, *Science*, **177**: 702–703, 1972.
- [116] ZANEVELD L. J. D., POLAKOSKI K. L., WILLIAMS W. L., A proteinase and proteinase inhibitor of mammalian sperm acrosomes, *Biol. Reprod.*, **9**: 219–225, 1973.
- [117] ZANEVELD L. J. D., SCHUMACHER G. F. B., FRITZ H., FINK E., JAU-MANN E., Interaction of human sperm acrosomal proteinase with seminal plasma proteinase inhibitors, *J. Reprod. Fert.*, **32**: 525–529, 1973.
- [118] ZANEVELD L. J. D., Sperm enzyme inhibitors for vaginal and other contraception, *Res. Frontiers in Fert. Regulation*, **2**: 1–14, 1982.
- [119] ZIMMERMAN R. E., BURCK P. J., The loss of a low molecular weight acrosin inhibitor from acrosomes during capacitation, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **158**: 491–495, 1978.
- [120] ŽELEZNA B., HAVRANOVÁ M., ČECHOVÁ D., SEDLAKOVÁ E., Inhibitory properties of bull seminal plasma proteinase inhibitors, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **36**: 461–463, 1980.
- [121] ŽELEZNÁ B., ČECHOVÁ D., Boar acrosin isolation of two active forms from boar ejaculated sperm, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **363**: 757–766, 1982.

Otrzymano: 18.01.85.

Przyjęto: 13.05.85.

Adres: Katedra Biochemii Zwierząt A.R-Tech., Olsztyn — Kortowo, bl. 37.

ONKOGENY

ONCOGENES

Marek JAKÓBISIAK

Zakład Transplantologii Instytutu Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie. Onkogeny znaleziono pierwotnie u niektórych retrowirusów onkogenicznych. Onkogeny wirusowe (*v-onc*) powstały z homologicznych onkogenów komórkowych (*c-onc*). Te ostatnie regulują, jak się wydaje, proliferację i różnicowanie się komórek. Większość onkogenów komórkowych koduje prawdopodobnie czynniki wzrostowe, ich receptory lub wewnątrzkomórkowe mediatory czynników wzrostowych. Istnieje kilka dróg aktywacji onkogenów komórkowych przekształcających je w geny zdolne do indukowania onkogenezy. Są to: transdukcja przez retrowirusy, insercja promotora lub wzmacniacza w pobliżu *c-onc*, mutacje punktowe, translokacje chromosomalne i amplifikacja *c-onc*. W pracy dyskutowane są niektóre przypuszczalne mechanizmy odpowiedzialne za transformację nowotworową komórek przy współdziałaniu aktywowanych onkogenów. Nie można wykluczyć, że czynność aktywowanych onkogenów stanowi wspólną drogę różnych rodzajów onkogenezy.

Summary. Oncogenes have originally been found in some oncogenic retroviruses. Viral oncogenes (*v-onc*) have originated from homologous cellular oncogenes (*c-onc*). The latter seem to regulate cellular proliferation and differentiation. Most of them probably code for growth factors, their receptors or intracellular mediators of growth factors. There are several mechanisms activating cellular oncogenes into transforming genes capable of inducing oncogenesis. They include: transduction by retroviruses, promoter (enhancer) insertion near *c-onc*, point mutations, chromosomal translocations, and amplification of *c-onc*. Some probable mechanisms of cellular transformation by activated oncogenes are discussed. It cannot be excluded that the function of activated oncogenes constitutes a common pathway for different types of oncogenesis.

WSTĘP

Odkrycie onkogenów bardzo zbliżyło nas do zrozumienia procesu powstawania nowotworów. Wiemy obecnie, że proces przekształcania się komórek normalnych w nowotworowe jest następstwem czynności określonych genów, tzw. onkogenów, i że w poznanych przypadkach do onko-

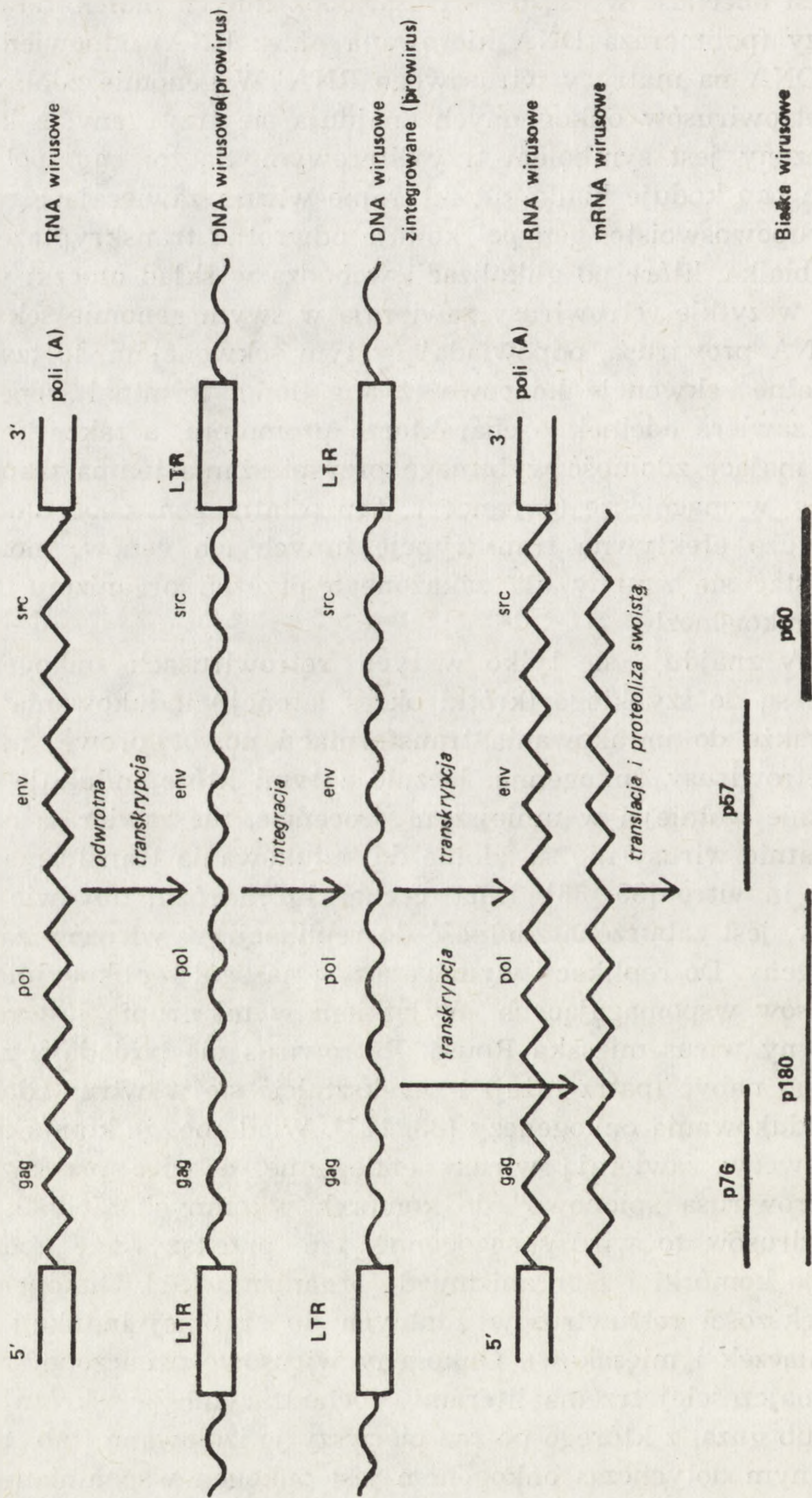
genezy dochodzi w wyniku czynności kodowanych przez onkogeny białek [180]. W wielu przypadkach poznano już budowę tych genów, a także budowę kodowanych przez nie białek. Nadal jednak dokładny mechanizm transformacji nowotworowej nie został wyjaśniony. W następstwie odkrycia onkogenów wielokrotnie czyniono próby tłumaczenia transformacji nowotworowej czynnością określonego pojedynczego onkogenu. Tłumaczenia takie nie wytrzymują na ogół jednak próby czasu i zostają podważane przez kolejne obserwacje i eksperymenty. Coraz więcej danych przemawia za tym, że czynność onkogenów jest wypaczoną w jakiś sposób czynnością normalnych genów odpowiedzialnych za wzrost i różnicowanie się komórek. Prawdopodobnie dopóki nie zostaną wyjaśnione mechanizmy leżące u podstaw tych skomplikowanych procesów, dopóty nie zrozumiemy procesu onkogenezy. Na razie coraz więcej zwolenników zyskuje hipoteza zakładająca współdziałanie w procesie transformacji nowotworowej co najmniej dwóch, a prawdopodobnie wielu onkogenów. Rozróżniamy onkogeny wirusowe (*v-onc*) i onkogeny komórkowe (*c-onc*). Onkogeny wirusowe stwierdzono dotychczas tylko w genomie niektórych retrowirusów. Onkogeny komórkowe natomiast rezydują w genomie wielu organizmów. Występują one nie tylko u kręgowców, gdyż geny zbliżone budową do onkogenów komórkowych zidentyfikowano nawet u muszki owocówki [88.]. Postęp w badaniu onkogenów osiągnięto dzięki wprowadzeniu nowych technik badawczych. Zastosowanie endonukleaz restrykcyjnych umożliwiło przecinanie łańcucha DNA w specyficznych miejscach i jego izolację na określone fragmenty. Fragmenty te można dalej oczyszczać przez poddanie ich elektroforezie w żelu agarozowym. W badanym DNA lub RNA można identyfikować odcinki homologiczne w stosunku do określonego już i wyznakowanego fragmentu kwasu nukleinowego, stosując technikę hybrydyzacji. Fragmenty DNA sprzężone z określonym wektorem można poddać amplifikacji w organizmie bakterii, a następnie izolować duże ilości tego DNA. Dzięki technice transfekcji odcinki DNA poddane precypitacji przy użyciu fosforanu wapnia można wprowadzić do określonych komórek zwierzęcych zdolnych do integracji badanego DNA w swym genomie i uzyskać ekspresję wprowadzonych genów. Najczęściej używanymi do tego celu komórkami są fibroblasty linii NIH 3T3.

ONKOGENY WIRUSOWE

Zdolność wirusów do indukowania nowotworów zasugerowały już na początku obecnego wieku wyniki pionierskich badań Rousa. Do wirusów zdolnych do onkogenezy należą zarówno niektóre RNA, jak i niektóre DNA wirusy. Onkogenne wirusy RNA należą do retrowirusów.

Retrowirusy onkogenne mają pewne wspólne cechy [26, 53, 86]. Jedną z nich jest obecność w cząstce wirusa, obok innych białek, odwrotnej transkryptazy (polimeraza DNA kierowana przez RNA) odpowiedzialnej za syntezę DNA na matrycy wirusowego RNA. W genomie zdolnych do replikacji retrowirusów onkogennych znajdują się trzy geny, z których każdy oznaczony jest symbolem trzy literowym. Są to: *gag*, *pol* i *env* (ryc. 1). Gen *gag* koduje białka strukturalne wirusa zawierające również antygeny grupowoswoiste, gen *pol* koduje odwrotną transkryptazę, a gen *env* koduje białka, które po glikolizacji wchodzą w skład otoczki wirusa. Oprócz tego wszystkie retrowirusy zawierają w swym genomie sekwencje końcowe. DNA prowirusa, odpowiadający tym sekwencjom, to tzw. długie powtarzalne sekwencje końcowe (z ang. long terminal repeats — LTR). LTR zawiera odcinek o charakterze promotora, a także geny regulatorowe, mające zdolność wybitnego przyspieszania tempa transkrypcji, czyli tzw. wzmacniacze (enhancer). Ten ostatni gen, choć umożliwia wirusom bardzo efektywną transkrypcję innych ich genów, może, jak wykazemy, stać się zgubny dla zakażonego przezeń organizmu, współdziałając w onkogenezie.

Onkogeny znajdują się tylko w tych retrowirusach onkogennych, które zdolne są do szybkiego (krótki okres latencji) indukowania nowotworów, a także do indukowania transformacji nowotworowej *in vitro*. Pozostałe retrowirusy onkogenne, łącznie z tymi które indukują nowotwory znacznie wolniej i w mniejszym procencie, nie zawierają onkogenów. Te ostatnie wirusy nie są zdolne do indukowania transformacji nowotworowej *in vitro* [55, 86]. Inną cechą, która różni obydwie grupy retrowirusów, jest zaburzona zdolność do replikacji u wirusów zawierających onkogeny. Do replikacji wymagają one na ogół replikacyjnie sprawnych wirusów wspomagających. Wyjątkiem w tej grupie jest replikacyjnie sprawny wirus mięsaka Rousa. Retrowirus nie posiadający onkogeny może go nabyć (patrz niżej) i przekształcić się w wirus zdolny do szybkiego indukowania onkogenezy [83, 137]. Wiadomo, że komórki większości kręgowców zawierają wirusy endogenne, a więc przekazywane w postaci prowirusa „pionowo” do komórek potomnych. Jednak większość retrowirusów to wirusy egzogenne, tzn. przekazywane „poziomo” z komórki do komórki i z organizmu do organizmu [91]. Onkogeny wykryto u większości retrowirusów zdolnych do szybkiej indukcji nowotworów (białaczek i mięsaków). Onkogeny wirusowe oznaczone są literą *v* (virus) i najczęściej trzema literami pochodzącymi ze skrótu nazwy zwierzęcia lub guza, z którego po raz pierwszy je izolowano (tab. 1). Najlepiej poznanym dotychczas onkogenem jest onkogen wspomnianego wirusa mięsaka Rousa oznaczony symbolem *v-src* od nazwy nowotworu (sarcoma — mięsak), który indukuje u kur. Okazało się, że onkogen ten



Rys. 1. Genom retrowirusa onkogennego na przykładzie wirusa mięsaka Rousa

TABELA 1

Onkogeny niektórych retrowirusów

Wirus	Onkogen	Gospodarz	Nowotwór	Produkt białkowy	Lokalizacja chromosomalna odpowiedniego proto-onc u człowieka
Mięsaka Rousa (RSV)*	<i>v-src</i>	kura	mięsak	p60	1 i 20
Mięsaka Fujinami (FSV)	<i>v-fps</i>	kura	mięsak	p140	
Mięsaka Yamaguchi (Y73)	<i>v-yes</i>	kura	mięsak	p90	
Mięsaka Rochester 2 (UR2)	<i>v-ros</i>	kura	mięsak	p68	
Mielocytomatozy, szczep MC29	<i>v-myc</i>	kura	rak, mięsak, białaczka mielocytarna	p110	8q24
Ptasiej erytroblastozy (AEV)	<i>v-erb A</i>	kura	erytroleukemia	p75	17
	<i>v-erb B</i>	kura	mięsak	p65	
Ptasiej mieloblastozy (AMV)	<i>v-myb</i>	kura	białaczka mieloblastyczna	p130	6q22-q24
Siateczkowosródbłonkowicy, szczep T (REV-T)	<i>v-rel</i>	indyk	białaczka limfatyczna		
Mięsaka Moloney'a (mo-MuSV)	<i>v-mos</i>	mysz	mięsak	p37	8q22
Białaczki Abelsona (A-MuLV)	<i>v-abl</i>	mysz	białaczka wywodząca się z limfocytów B	p120	9q34
Mysiego osteosarcoma (FBJ-MuSV)	<i>v-fos</i>	mysz	mięsak	p55	14q21-q31
Mysiego mięsaka 3611	<i>v-raf</i>	mysz			
Szczurzego mięsaka Harvey'a (Ha-MuSV)	<i>v-Ha-ras</i>	szczur, mysz	erytroleukemia	p21	11
Balb-MuSV	<i>v-bas</i>	mysz	mięsak	p21	12
Szczurzego mięsaka Kirstena (Ki-MuSV)	<i>v-Ki-ras</i>	szczur	mięsak	p21	
Kocięgo mięsaka Snyder-Theilen (ST-FeSV)	<i>v-fes</i>	kot	mięsak	p85	15q24-q25
Kocięgo mięsaka Gardner-Rasheeda (GR-FeSV)	<i>v-fgr</i>	kot	mięsak		
Kocięgo mięsaka SM (SM-FeSV)	<i>v-fms</i>	kot	mięsak	p170	
Małpiego mięsaka (SiSV)	<i>v-sis</i>	małpa, kot	mięsak	p28	22q11-1ter

* Dla ułatwienia podano powszechnie używane skróty nazw angielskich.

można uszkodzić w taki sposób, że staje się on wrażliwy na podwyższoną temperaturę [111]. Jest on aktywny w temperaturze około 35°C, ale ulega inaktywacji w temperaturze około 39°C. Jeżeli komórki zakazi się wirusem w niższej temperaturze, to ulegają one transformacji w ciągu kilkunastu godzin. Podwyższenie temperatury hodowli powoduje cofnięcie się cech świadczących o transformacji. Jeżeli temperaturę znowu obniży się, to komórki ponownie ulegają transformacji. Doświadczenia te sugerowały, że pojedynczy gen wirusowy (onkogen) odpowiedzialny jest za transformację nowotworową komórek i że czynność tego genu musi być utrzymana dla zachowania przez te komórki wzrostu typu nowotworowego. Bezpośredniego dowodu na poparcie tej hipotezy dostarczyły badania, w których izolowano z transformowanych wirusem Rousa komórek odcinek DNA odpowiadający *v-src* i wbudowywano go do DNA komórek normalnych, uzyskując ekspresję genu i transformację nowotworową tych komórek [37].

Identyfikacja białka kodowanego przez onkogen *v-src* była zaskoczeniem, gdyż okazało się, że jest nim kinaza białkowa swoista dla tyrozyny [28, 90]. Ma ona ciężar cząsteczkowy 60 kd, stąd jej symbol — p60. Związana jest z wewnętrzną powierzchnią błony komórkowej [33] i odpowiedzialna za przenoszenie reszt fosforanowych na tyrozinę zawartą w białkach. Okazało się wkrótce, że również onkogeny innych retrowirusów kodują kinazy białkowe (tab. 2). Wiadomo, że fosforylacja białek może istotnie wpływać na ich funkcje. Skłoniło to do przypuszczeń, że transformacja nowotworowa komórek, indukowana przez onkogeny retrowirusów, jest uwarunkowana przez jeden wspólny mechanizm. Taka uproszczona koncepcja wydaje się obecnie mało prawdopodobna, tym bardziej, że poznano onkogeny kodujące inne białka (tab. 2). Zidentyfikowano dotychczas około 20 onkogenów wirusowych (tab. 1) i prawdopodobnie liczba ta wzrośnie w przyszłości [12].

Dwa geny *erb A* i *erb B* wirusa ptasiej erythroblastozy (AEV) indukującego u ptaków zarówno mięsaka, jak i białaczkę, podejrzewano o udział w onkogenezie [199]. Wyniki późniejszych badań sugerują jednak, że prawdopodobnie tylko *erb B* odpowiedzialny jest za indukcję nowotworów u kur [65], choć u człowieka *c-erb A* podejrzewany jest o współudział w powstawaniu niektórych ostrych białaczek szpikowych [43]. Produkt *v-erb B* wydaje się glikoproteidem i lokalizuje się go w komórce w połączeniu z błonami [145]. Choć nie ma on prawdopodobnie aktywności kinazy białkowej fragment tego białka, sądząc z sekwencji nukleotydów *v-erb B*, wykazuje zaskakującą homologię z kinazami białkowymi [12]. Ostatnio natomiast wykazano podobieństwo tego onkogenu do genu kodującego receptor dla EGF [50]. Nadal więc zarówno funkcja, jak i dokładna lokalizacja produktu onkogenu *v-erb B* może być jedynie tematem domysłów. W jądrze komórkowym zlokalizowano m. in. białka

kodowane przez onkogeny *v-myb* [12] i *v-myc* [48], ale mało wiadomo na temat ich funkcji.

W żadnym ze wspomnianych tu przypadków nie można wytłumaczyć transformacji nowotworowej komórek czynnością białka kodowanego przez określony onkogen. Do osiągnięcia tego celu zbliżyły nas dopiero badania onkogenu *v-sis*, należącego do wirusa małpiego mięsaka.

TABELA 2

Białka kodowane przez niektóre onkogeny wirusowe

Onkogen	Nowotwór indukowany	Właściwości kodowanego białka	Lokalizacja w komórce	Referencje
<i>abl</i>	Białaczka z limfocytów B	Kinaza białkowa (tyrozynowa)	Błona komórkowa	12
<i>erb B</i>	Erytroleukemia	Podobne do receptora dla EGF ¹	Błona komórkowa i błona cytoplazmatyczna	50
<i>mos</i>	Mięsak	Rozpuszczalne białko cytoplazmatyczne		139
<i>myb</i>	Białaczka mieloblastyczna	Wiąże DNA	Jądro komórkowe	101
<i>myc</i>	Białaczka mielocytarna	Podobne do TCGF ²	Jądro komórkowe	7, 136
<i>ras</i>	Erytroleukemia	Kinaza białkowa (treoninowa)	Błona komórkowa	169
<i>sis</i>	Mięsak	Podobne do PDGF ³	?	49, 203
<i>src</i>	Mięsak	Kinaza białkowa (tyrozynowa)	Błona komórkowa (wewnętrzna powierzchnia)	28, 90

¹ z ang. Epidermal growth factor — czynnik wzrostowy komórek nabłonkowych.

² z ang. T cell growth factor — czynnik wzrostowy limfocytów T, czyli interleukina 2 [136]. Według innych doniesień białko kodowane przez ten onkogen jest wewnątrzkomórkowym mediatorem w odpowiedzi na PDGF [7].

³ z ang. Platelet-derived growth factor — płytkowy czynnik wzrostowy.

Okazało się, że kodowane przez białko p28 ma zbliżoną sekwencję aminokwasową do płytkowego czynnika wzrostowego PDGF [49, 203]. Wiadomo natomiast, że płytkowy czynnik wzrostowy jest głównym czynnikiem mitogennym surowicy, działającym na komórki pochodzenia mezenchymatycznego [45]. Nawet jednak i w tym przypadku prawdziwy mechanizm onkogenezy indukowanej przez *v-sis* nie jest znany.

Istnienie wirusów, które w wyniku mutacji utraciły zdolność indukowania transformacji nowotworowej komórek, ułatwiło identyfikację onkogenów wirusowych. Porównanie bowiem genomu mutantów i wirusów wyjściowych umożliwiło identyfikację i izolację fragmentu odpowiadającego onkogenowi wirusowemu [52, 111].

ONKOGENY KOMÓRKOWE CZYLI PROTOONKOGENY

Nieoczekiwanie okazało się, że geny homologiczne w stosunku do onkogenów wirusowych pod względem sekwencji nukleotydów obecne są w genomie wszystkich komórek kręgowców, a nawet u organizmów niższych, np. owadów [88, 170]. Pierwszy onkogen wykryty w normalnych komórkach ptasich okazał się homologiczny w stosunku do *v-src* [183]. Już jednak wyniki wcześniejszych doświadczeń nasunęły podejrzenie obecności onkogenów w normalnych komórkach. Okazało się bowiem, że retrowirusy niezdolne do szybkiego indukowania nowotworu nabywały tę zdolność w wyniku replikacji w komórkach normalnych zwierząt [12, 81]. Obecnie wiadomo, że retrowirusy nie posiadające onkogenów mogą je nabyć w wyniku rekombinacji z genami zakażonych przez siebie komórek [137]. Onkogeny komórkowe są więc protoplastami onkogenów wirusowych i określa się je jako protoonkogeny. Oznacza się je takim samym trójliterowym symbolem jak homologiczne onkogeny wirusowe i dodaje literę *c* (z ang. cellular — komórkowy). Za tym, że onkogeny komórkowe są własnymi genami komórki i nie są pochodzenia wirusowego przemawiają następujące obserwacje:

obecność w nich intronów przy braku ich w *v-onc*;

ich ścisła lokalizacja w genomie, w przeciwieństwie do przypadkowego lokowania się w genomie komórki genów pochodzących od retrowirusów;

w genomie normalnych komórek protoonkogeny nie są związane z genami retrowirusów [198].

Z kolei za tym, że onkogeny wirusowe są obce dla wirusa przemawia brak ich udziału w replikacji i formowaniu się wirusów, dzięki czemu retrowirusy mogą, jak już wspomniano, całkowicie „się bez nich obejść”.

Fakt, że źródłem powstania onkogenów wirusowych są geny obecne w normalnych komórkach wydaje się pozornie trudny do przyjęcia i był zaskoczeniem dla wielu badaczy. Retrowirusy okazały się chimerami, w których genomie obecne są sekwencje „własne” wirusa i sekwencje „obce”, pochodzące z komórek. W DNA komórek człowieka znaleziono m.in. geny homologiczne w stosunku do następujących onkogenów wirusowych: *v-myc*, *v-myb*, *v-mos*, *v-Ha-ras*, *v-Ki-ras*, *v-bas*, *v-abl*, *v-fes*, *v-sis*, *v-src* [10, 23, 38, 39, 77, 204] (tab. 2). Niektóre onkogeny występują w genomie człowieka w więcej niż jednej kopii. Na przykład *c-myc*, występuje w czterech kopiach w genomie [40], *c-Ha-ras* i *c-Ki-ras* — w dwóch kopiach [23], a *c-src* również w dwóch kopiach [11]. W genomie danego organizmu występują onkogeny komórkowe homologiczne w stosunku do onkogenów różnych wirusów, łącznie z onko-

genami należącymi do wirusów niezdolnych do zakażenia danego organizmu [51]. Komórki ptasie zawierają onkogeny homologiczne w stosunku do onkogenów występujących w retrowirusach ptasich, ale także onkogeny homologiczne w stosunku do onkogenów retrowirusów zakażających komórki ssaków, np. wirusa białaczki Abelsona, wirusa mięsaka Moloneya i wirusa kociego mięsaka. Komórki ssaków zawierają zarówno onkogeny homologiczne w stosunku do onkogenów retrowirusów zakażających ssaki, jak i onkogeny homologiczne w stosunku do onkogenów retrowirusów ptasich [51], takich jak np. wirusa mielocytomatozy, wirusa mięsaka Rousa, wirusa ptasiej mieloblastozy i wirusa mięsaka Fujinami. Zdarzają się wykryte w wyniku transfekcji onkogeny komórkowe, do których nie znaleziono dotychczas odpowiadających im onkogenów wirusowych. Albo wirusy takie istnieją, choć nie zostały jeszcze wykryte, albo wspomniane onkogeny komórkowe nie zostały jeszcze „przywłaszczone”, przez wirusy. Onkogenem takim jest np. *c-B-lym 1* wykryty zarówno w komórkach wywodzącego się z limfocytów B chłoniaka kur [72], jak i w chłoniaku Burkitta u ludzi [46], a także *c-N-ras*.

Onkogeny komórkowe homologiczne w stosunku do określonego onkogenu wirusowego występują u człowieka, u innych kręgowców, a nawet u owadów. Takim onkogenem jest np. *c-src* wykryty nie tylko u ssaków (człowiek, mysz), ptaków (kura) i ryb (łosoś) [179], ale również u muszki owocówki [88].

Utrzymanie się u człowieka i zwierząt podobnych onkogenów komórkowych sugeruje, że kodowane przez nie białka spełniają jakieś podstawowe czynności biologiczne. Produkty białkowe onkogenów można podzielić na kilka grup lub klas:

1. Kinazy białkowe swoiste dla tyrozyny (*abl, fes, fgr, fps, ros, src, yes*). Spokrewnione z tą grupą są białka o podobnej sekwencji aminokwasów, ale nie wykazujące aktywności kinazowej (*fms, mil, mos, raf*).
2. Czynniki wzrostowe (*sis*).
3. Wiążące GTP (*Ha-ras, Ki-ras, N-ras*).
4. Jądrowe (*B-lym, fos, myc, myb, ski*).
5. Inne (*erb A, ets, rel*).

Transkrypcję onkogenów *c-fos, c-abl, c-Ha-ras, c-mos* i *c-fms* stwierdzono na różnych etapach rozwoju zarodkowego u myszy [36, 126, 127]. Ekspresja tych genów zmieniała się w embriogenezie i była zróżnicowana w poszczególnych narządach. Pojawiała się również w regenerującej wątrobie [73, 108]. Istnieją sugestie, że *c-myb* i *c-myc* biorą udział w utrzymaniu proliferacji komórek krwiotwórczych szeregu granulocytarnego [70], a *c-fos* także w różnicowaniu się komórek [128], np. w kierunku makrofagów [70]. *c-myc* uczestniczy również w proliferacji komórek cytotrofoblastu [144], limfocytów T w odpowiedzi na czynniki mi-

togenne [143] i prawdopodobnie wielu innych komórek [184]. Ekspresja *c-myc*, *c-fos* i *c-Ki-ras* zmienia się w cyklu komórkowym [18, 75]. Wydaje się również, że produkt białkowy onkogenu *c-myc* jest wewnątrzkomórkowym mediatorem odpowiedzi komórek na działanie płytkowego czynnika wzrostowego [7]. Z kolei produkt genu *c-src* — białko p60 obecne jest w dużych ilościach w tkance nerwowej w okresie rozwoju [177]. Obserwacje te w połączeniu z podobieństwem niektórych onkogenów do genów kodujących czynniki wzrostowe, takie jak płytkowy czynnik wzrostowy [49, 203], czynnik wzrostowy limfocytów T [136], czy transferyna [46], lub do genów kodujących receptory dla czynników wzrostowych, np. receptora dla czynnika wzrostowego komórek nabłonkowych [50] (tab. 2), skłaniają do przypuszczenia, że onkogeny komórkowe biorą udział w regulacji wzrostu i różnicowania się komórek.

Dochodzimy tu do pewnych niejasności. Jeżeli onkogeny obecne są we wszystkich komórkach i nawet w normalnych określonych warunkach dochodzi do ich ekspresji, to dlaczego nie prowadzą one bezpośrednio do onkogenezy, tylko dopiero w wyniku transdukcji, „przechwycone” z jednych komórek przez retrowirusy i wprowadzone do genomu innych komórek? Po pierwsze wydaje się, że onkogeny komórkowe mogą indukować onkogenezę bezpośrednio i bez współdziałania retrowirusów zawierających onkogeny (patrz niżej). Po drugie okazuje się, że onkogen komórkowy i homologiczny w stosunku do niego onkogen wirusowy nie są identyczne.

RÓZNICE MIĘDZY ONKOGENAMI WIRUSOWYMI I KOMÓRKOWYMI

Porównując sekwencje nukleotydów onkogenu wirusowego i homologicznego onkogenu komórkowego można stwierdzić wiele różnic (ryc. 2). Różnice te obejmują:

Mutacje punktowe w *v-onc*;

Delecje — pewne odcinki *c-onc* mogą być nieobecne w *v-onc*;

Brak intronów w *v-onc*;

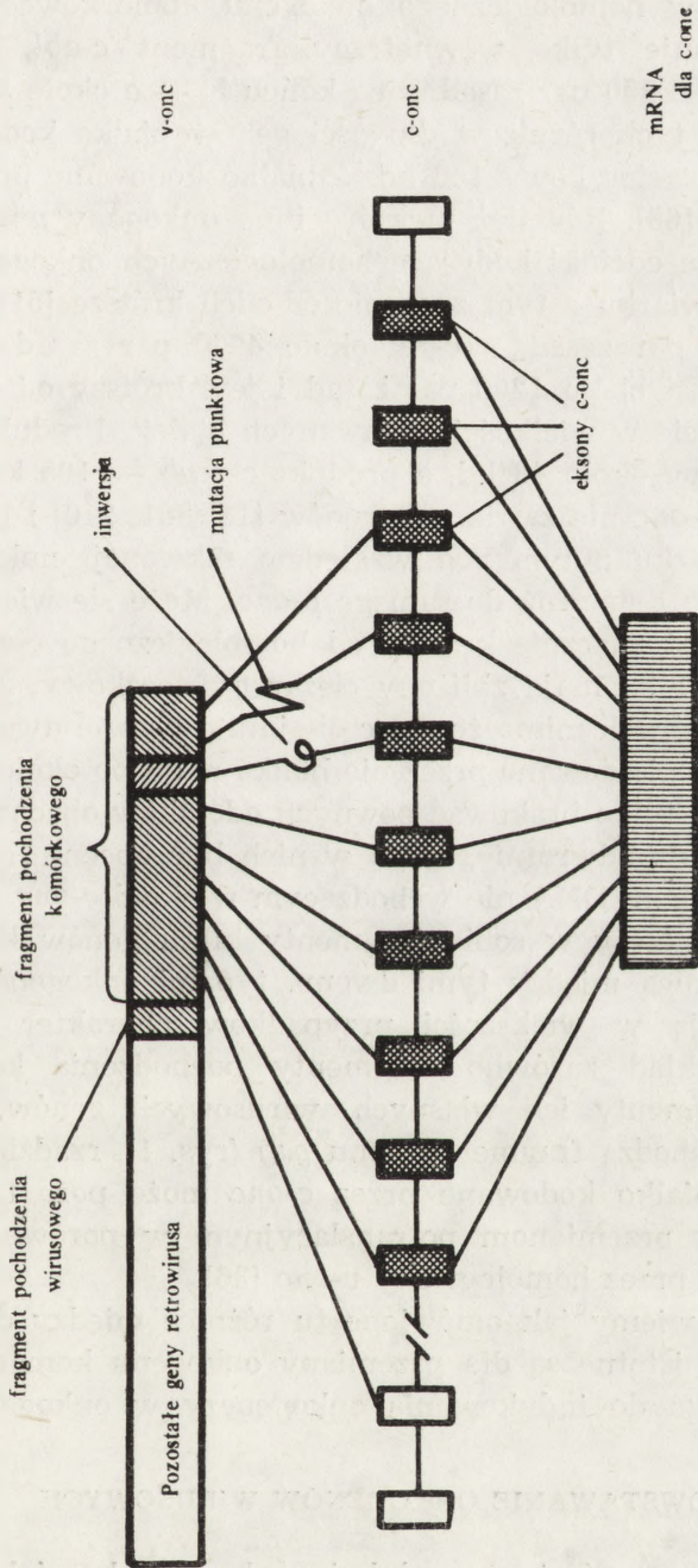
W *v-onc* mogą być obecne odcinki DNA komórkowego, których nie ma w *c-onc*;

Inwersje — odcinki *v-onc* mogą być odwrócone o 180° w stosunku do odpowiednich odcinków w *c-onc*;

W skład *v-onc*, oprócz odcinków pochodzenia komórkowego, wchodzi często odcinki genów retrowirusa, np. gen *gag*.

Takie onkogeny wirusowe mają więc charakter chimer.

Mutacje punktowe mogą obejmować 1–2% długości *v-onc* [51, 192], a onkogeny wirusowe homologiczne w stosunku do określonego *c-onc*



Rys. 2. Schemat różnic między onkogenami komórkowymi i wirusowymi

i pochodzące od różnych szczepów danego wirusa mogą różnić się nieznacznie między sobą [164, 210]. W onkogenie wirusowym może brakować pewnych odcinków homologicznego onkogeny komórkowego. Na przykład *v-abl* obejmuje tylko wewnętrzny fragment *c-abl*. Na końcu 3' *c-abl* jest dłuższy o 850 par zasad, a na końcu 5' — o około 350 par zasad [201]. W wyniku tych różnic w długości genów białko kodowane przez *c-abl* ma ciężar cząsteczkowy 160 kd, a białko kodowane przez *v-abl* — zaledwie 120 kd [69]. Również niektóre inne onkogeny wirusowe obejmują tylko pewne odcinki kodujące homologicznych onkogenów komórkowych i są w związku z tym znacznie od nich krótsze [51]; *v-rel* obejmuje około 1400 par zasad, a *c-rel* około 4000 par zasad [25]. *V-myb* obejmuje natomiast około 1200 par zasad i jest krótszy od *c-myb* [100]. Ma to swoje odbicie w wielkości kodowanych białek. Produkt *v-myb* ma ciężar cząsteczkowy około 48 kd, a produkt *c-myb* — 105 kd [16]. Należy pamiętać, że *v-onc* nie zawiera intronów [12, 201, 210] i bardziej zbliżony jest w związku z tym pod względem sekwencji nukleotydów do mRNA dla danego *c-onc* niż do samego *c-onc*. Może się więc zdarzyć, iż mimo że *v-onc* jest znacznie krótszy od homologicznego *c-onc*, to kodowane przez nie białka mają zbliżony ciężar cząsteczkowy. Jest to jedną z przyczyn, dla których mimo że *c-src* obejmuje prawie dwa razy więcej par zasad niż *v-src*, kodowane przez nie białka mają po około 60 kd [175]. W *v-onc* może nie tylko brakować pewnych odcinków obecnych w homologicznym *c-onc*, ale odwrotnie, mogą w nich być obecne fragmenty odpowiadające odcinkom DNA nie wchodzącym w skład *c-onc*. *V-onc* w takich przypadkach łączy w sobie fragmenty kilku genów komórkowych [51]. Kolejną różnicą między tymi dwoma typami onkogenów jest fakt, że onkogeny mają w większości przypadków charakter chimer, tzn. wchodzi w ich skład zarówno fragmenty pochodzenia komórkowego, jak również fragmenty ich własnych, wirusowych genów. Najczęściej w skład *v-onc* wchodzi fragmenty genu *gag* (rys. 1), rzadziej fragmenty genu *env* [51]. Białko kodowane przez *c-onc* może poza tym podlegać intensywniejszym przemianom potranslacyjnym w porównaniu z białkiem kodowanym przez homologiczny *v-onc* [36].

Niestety nie wiemy jak omówione tu różnice między *c-onc* i *v-onc* i które z nich są istotne są dla przemiany onkogeny komórkowego, potencjalnie zdolnego do indukowania onkogenezy w onkogen wirusowy.

POWSTAWANIE ONKOGENÓW WIRUSOWYCH

Można przypuszczać, że transdukcja onkogeny komórkowego przez retrowirus, czyli włączenie tego onkogeny do genomu retrowirusa w jednej komórce i przeniesienie tego onkogeny do innej komórki dotyczy

prawdopodobnie także innych genów komórkowych, ale w przypadku onkogenów może mieć szczególnie poważne konsekwencje. Proces transdukcji onkogenów komórkowych przez wirusy może się skończyć przeniesieniem i włączeniem ich, już jako onkogenów wirusowych, do genomu innych komórek. Na tym etapie są to już jednak onkogeny gotowe do natychmiastowego indukowania transformacji nowotworowej, czyli onkogeny aktywowane.

Mechanizm włączania onkogenu komórkowego do genomu wirusa nie jest jednak poznany, podobnie jak nie jest poznany proces rekombinacji wirusowego DNA i DNA komórkowego prowadzący do integracji prowirusa z genomem komórki. Cały proces transdukcji onkogenu komórkowego przez retrowirus zaczyna się prawdopodobnie właśnie od takiej integracji. DNA powstały dzięki odwrotnej transkrypcji na matrycy RNA wirusowego musi włączyć się jako prowirus obok onkogenu komórkowego [33]. Rekombinacji, która łączy DNA wirusowy i komórkowy, towarzyszy delecja eliminująca terminator transkrypcji genów wirusowych i prawdopodobnie promotor onkogenu komórkowego. Przyпуска się, że proces rekombinacji zapoczątkowujący włączenie prowirusa do genomu komórki przypadkowo tylko może zajść w miejscu położenia onkogenu komórkowego. Niektóre nowsze dane sugerują, że rekombinacja ta nie musi jednak przypadkowo tylko dotyczyć miejsca położenia onkogenu komórkowego, a przynajmniej nie zawsze jest przypadkowa. Na końcach 3' i 5' onkogenu komórkowego *c-fos* wykryto krótkie sekwencje homologiczne w stosunku do odcinków genomu wirusa mysiego osteosarcoma FBJ, między którymi włączany jest ten onkogen [200]. Sekwencja homologiczna na końcu 5' obejmuje pięć nukleotydów, a na końcu 3' — dziesięć nukleotydów. Również otrzymanie onkogenu *abl* przez wirusa białaczki Abelsona zaszło dzięki krótkiemu odcinkowi homologicznemu, znajdującemu się w genomie wirusa i w onkogenie komórkowym *c-abl*. Umożliwiło to prawdopodobnie integrację prowirusa w pobliżu *c-abl* w genomie komórki [202]. Rekombinacja między genami pochodzenia wirusowego i onkogenem zachodzi raczej na poziomie DNA, a nie RNA. Przemawia za tym fakt, że dochodzi do niej nie tylko w obrębie eksonów, ale także w obrębie intronów [12, 200, 210]. Na przykład zarówno w przypadku *v-myb* [100], jak i *v-fos* [200] rekombinacja, w wyniku której powstały te wirusowe onkogeny, zaszła prawdopodobnie na jednym końcu w obrębie eksonu, a na drugim w obrębie intronu. Wydaje się, że również rekombinacja prowadząca do powstania *v-src* zaszła na końcu 5' w obrębie intronu [210].

Następnym etapem powstawania onkogenu wirusowego jest transkrypcja i obróbka powstałego w jej wyniku RNA, podczas której ulegają usunięciu introny. Mający charakter chimery RNA włączony jest następ-

nie do formujących się wirusów, a one po opuszczeniu komórki gotowe są do zakażenia innych komórek. Ten sam onkogen komórkowy może ulec transdukcji przez różne retrowirusy. Na przykład zarówno *v-mht* obecny w genomie wirusa ptasiego raka MH2, jak i onkogen *v-raf* obecny w wirusie mięsaka mysiego pochodzą ze wspólnego onkogenu komórkowego i są w 95% identyczne. Drobne różnice, obejmujące delecje i połączenie z różnymi sekwencjami w genomie wirusa, sprawiły jednak, że te dwa onkogeny mają różne zdolności onkogenne [93].

AKTYWACJA ONKOGENÓW KOMÓRKOWYCH

Jeżeli aktywacja onkogenu komórkowego ma ogólnie oznaczać zmianę, która powoduje, że czynność uprzednio normalnego genu kieruje komórkę na drogę onkogenezy, to aktywacja ta może przebiegać dwoma zasadniczymi drogami. Po pierwsze, onkogen komórkowy może ulec zmianie lub zmianom strukturalnym, co powoduje zmiany w kodowanym przez niego białku i wypaczenie jego funkcji. Po drugie, wzrosnąć może tempo transkrypcji tego genu, zwiększając jego ekspresję w komórce. Ta druga zmiana jest oczywiście zmianą czysto ilościową. Aktywacja onkogenów komórkowych przez zmiany jakościowe w ich strukturze, a co za tym idzie w strukturze kodowanych przez nie białek, jest procesem udowodnionym. Natomiast dowody na istnienie aktywacji onkogenów komórkowych wyłącznie poprzez zwiększenie ich ekspresji w komórce nie są do końca przekonujące. Dlatego ten mechanizm, choć bardzo prawdopodobny, należy na razie uznać za hipotetyczny. Badacze którzy powątpiewają w istnienie tego mechanizmu aktywacji wolą używać w stosunku do onkogenów komórkowych terminu protoonkogeny, aby podkreślić odmienną strukturę obydwu typów genów.

Do proponowanych mechanizmów aktywacji onkogenów komórkowych należą następujące procesy:

- transdukcja przez retrowirusy;
- sprzęganie *in vitro* *c-onc* z sekwencjami LTR;
- integracja prowirusa w genomie komórki w pobliżu *c-onc*;
- mutacje punktowe;
- translokacje chromosomalne;
- amplifikacja;
- uwolnienie spod kontroli genów regulatorowych.

Wśród wymienionych tu znajdują się zarówno mechanizmy udowodnione, jak i przypuszczalne, nie tylko zachodzące w sposób naturalny, ale także indukowane eksperymentalnie.

TRANSDUKCJA PRZEZ RETROWIRUSY

Najwcześniej i najlepiej poznany proces prowadzącym do aktywacji onkogenów komórkowych jest ich transdukcja przez retrowirusy. Onkogen komórkowy „włączony” do genomu retrowirusa, zwany od tego momentu wirusowym, jest w pełni gotowy do indukcji onkogenezy i inicjuje ten proces, jeżeli tylko wbudowany zostaje ponownie do genomu innych komórek [83, 137]. Wszystkie poznane dotychczas onkogeny wirusowe różnią się jakościowo w stosunku do homologicznych onkogenów komórkowych [51]. Jest to ważnym argumentem podkreślającym rolę zmian jakościowych w aktywacji onkogenów komórkowych. Nie wyklucza to jednak innego mechanizmu aktywacji. W DNA prowirusa znajdują się, jak już wspomniano (rys. 1), na obydwu końcach długie powtarzalne sekwencje końcowe, czyli sekwencje LTR zawierające odcinki o charakterze promotorów i odcinki o charakterze wzmacniaczy. Geny regulatorowe o charakterze wzmacniaczy występują również w genomie organizmów wyższych i odznaczają się następującymi cechami:

wybitnie przyspieszają proces transkrypcji genów sąsiadujących z nimi;

oddziałują na geny leżące po obydwu ich stronach w nici DNA;

wywierają swój efekt nawet na geny oddalone o kilka tysięcy par zasad [134].

Biorąc pod uwagę wymienione cechy wydaje się oczywiste, że również onkogen wirusowy wbudowany do genomu komórki zakażonej pozostaje pod nasilającym transkrypcję wpływem wzmacniaczy. Nie jest to prawdopodobnie bez znaczenia dla onkogenezy indukowanej przez retrowirusy posiadające onkogeny. Przemawiają za tym również wyniki doświadczeń, w których *in vitro* sprzęga się onkogeny komórkowe z długimi powtarzalnymi sekwencjami retrowirusów.

SPRZĘGANIE *IN VITRO* ONKOGENÓW KOMÓRKOWYCH Z DŁUGIMI POWTARZALNYMI SEKWENCJAMI KOŃCOWYMI RETROWIRUSÓW

Połączenie *in vitro* izolowanego onkogenu komórkowego z sekwencjami LTR i wbudowanie tak utworzonego kompleksu do genomu fibroblastów linii NIH 3T3 powoduje ich transformację nowotworową. Wykazano to posługując się sekwencjami LTR wirusa mięsaka Moloney'a i onkogenem mysim *c-mos* [13]. Powstały kompleks transformował komórki NIH 3T3 nie mniej skutecznie niż klonowane odcinki zawierające onkogen wirusowy *v-mos* wraz z sekwencjami LTR. Obserwacje te potwierdzone zostały również na innym układzie. Do transfekcji komórek NIH 3T3 użyto tym razem „chimery” powstałej z połączenia wirusowych sekwencji LTR z onkogenem homologicznym do *c-Ha-ras* izolowanym

z normalnych komórek ludzkich [22]. W wyniku transfekcji komórki NIH 3T3 ulegały nie tylko transformacji nowotworowej, ale również wykazywały wysoką ekspresję kodowanego przez *c-Ha-ras* białka p21. Wyniki tych eksperymentów przemawiają na korzyść modelu ilościowego aktywacji onkogenów komórkowych i sugerują, że prawdopodobnie samo tylko zwiększenie transkrypcji *c-onc* pochodzącego z normalnych (nie-nowotworowych) komórek jest wystarczające do indukowania onkogenezy. Dla ostrożności należy jednak zaznaczyć, że nie wszystkie tego typu eksperymenty zakończyły się powodzeniem. Na przykład onkogen homologiczny w stosunku do *c-mos* i pochodzący z komórek ludzkich, w przeciwieństwie do mysiego *c-mos*, nie ulegał aktywacji po sprzężeniu go z odpowiednimi sekwencjami pochodzącymi z wirusa mięsaka Moloney'a [204]. Oczywiście w tym konkretnym przypadku powodem różnic w zachowaniu mysiego i ludzkiego *c-mos* mogą być także jakościowe różnice istniejące między tymi dwoma homologicznymi onkogenami komórkowymi. Duesberg [51] cytuje również nie opublikowane dane, pochodzące z różnych laboratoriów, potwierdzające niepowodzenia przy próbach transformacji komórek NIH 3T3 przez kompleksy powstałe w wyniku łączenia wirusowych sekwencji LTR i onkogenów *c-myc* i *c-src* *.

INTEGRACJA PROWIRUSA W GENOMIE KOMÓRKI W POBLIŻU ONKOGENU KOMÓRKOWEGO

Naturalnym odpowiednikiem opisanego w poprzednim podrozdziale procesu jest zjawisko, które może zajść w komórkach zakażonych przez retrowirusy. Syntetyzowany w komórce DNA wirusowy wraz z sekwencjami LTR (rys. 1) włącza się do genomu zakażonej komórki. Jeżeli nawet wirus ten nie zawiera onkogeny, to jego integracja w pobliżu onkogeny komórkowego może mieć poważne konsekwencje. Należy bowiem pamiętać, że wzmacniacze obecne w wirusowych sekwencjach LTR nie tylko intensywnie stymulują proces transkrypcji, ale wpływem swoim mogą objąć nawet odległe geny. Przypuszcza się, że onkogen komórkowy, który znalazł się w zasięgu oddziaływania wzmacniaczy wirusowych sekwencji LTR może ulec intensywnej transkrypcji inicjując onkogenezę. Pewne obserwacje wydają się potwierdzać taką możliwość. Należą do nich

* Obecnie możliwe jest sprzężanie izolowanego onkogeny komórkowego z genami regulatorowymi wrażliwymi na określony hormon. W komórkach, które wbudują do swego genomu tak utworzony gen transkrypcja onkogeny znajduje się pod kontrolą hormonu, dzięki czemu można ją regulować. Niestety wyniki badań z użyciem tak otrzymanych genów nie dały dotychczas definitywnej odpowiedzi na pytanie, czy samo tylko zwiększenie ekspresji nie zmienionego *c-onc* może indukować onkogenezę [92, 185].

badania wirusa ptasiej leukozy (z ang. avian leukosis virus — ALV). Wirus ten nie zawiera onkogenu i indukuje m. in. mięsaki, białaczki oraz chłoniaki wywodzące się z limfocytów B u kur dopiero po wielu miesiącach (3–12) od momentu zakażenia [173]. W niektórych, ale nie we wszystkich przypadkach tak indukowanych chłoniaków stwierdzono integrację wirusowego DNA w odległości około 5000 par zasad od komórkowego onkogenu *c-myc* [85]. W 80% tego typu chłoniaków prowadzi to do podwyższonej nawet 100-krotnie transkrypcji *c-myc* w transformowanych komórkach [85, 140, 206]. Wzmoczona ekspresja *c-myc* zachodziła w trzech różnych konfiguracjach: (a) prowirus po stronie 5' *c-myc*; (b) prowirus po stronie 5' *c-myc*; lecz odwrócony, jeżeli chodzi o kierunek transkrypcji; (c) prowirus po stronie 3' *c-myc*. W innych badaniach sekwencje LTR wirusa ptasiej erytoblastozy wykryto w genomie transformowanych tym wirusem komórek w odległości około 500 par zasad od onkogenu komórkowego *c-erb B* [64].

Obserwacje te skłaniają do przypuszczeń, że retrowirusy nie zawierające onkogenów indukują onkogenezę w wyniku integracji prowirusa wraz z sekwencjami LTR w pobliżu *c-onc*, co prowadzi do podwyższonej ekspresji kodowanego przez dany onkogen białka. Nie można wykluczyć, że bardzo wiele wirusów może indukować onkogenezę na tej drodze i być może zachodzi ona częściej niż onkogeneza indukowana przez retrowirusy zawierające onkogeny. Grupa ta może obejmować nie tylko retrowirusy [12].

Należy jednak pamiętać, że sugerowany tu mechanizm onogenezy, zwany w literaturze angielskojęzycznej „promotor/enhancer insertion”, nie jest w pełni udowodniony. Nie we wszystkich chłoniakach indukowanych przez ALV stwierdzono obecność prowirusa w pobliżu *c-myc* i podwyższoną ekspresję tego onkogenu. Również długi okres latencji wymagany do rozwoju nowotworu w tym układzie nasuwa pewne wątpliwości co do słuszności proponowanego modelu onogenezy. Nawet zakładając, że integracja wirusowego DNA zachodzi przypadkowo i w związku z tym istnieje teoretycznie małe prawdopodobieństwo wbudowania się go w pobliżu *c-myc*, to jednak, biorąc pod uwagę wysokie miano wirusów ALV w organizmie zakażonego kurczęcia i wysoką liczbę zakażonych limfocytów, obliczono, że proponowany tu model onogenezy nie jest zupełnie zgodny z tak długim okresem latencji [51].

Wydaje się, że DNA prowirusa nie koniecznie musi być wbudowany w pobliżu onkogenu komórkowego, aby wzmacniać jego ekspresję. Na przykład geny regulatorowe obecne w sekwencjach LTR wirusa ludzkiej białaczki wywodzącej się z limfocytów T (z ang. human T cell leukemia virus — HTLV) zdolne są prawdopodobnie do stymulowania transkrypcji nawet odległych genów przez kodowane przez siebie czynniki [176]. Wi-

rusy HTLV, pierwsze zidentyfikowane dotychczas retrowirusy onkogenne człowieka prawdopodobnie nie zawierają onkogenów [27, 167].

Retrowirusy mogą prawdopodobnie indukować onkogenezę również inną drogą. Wirusowy DNA wbudowując się do genomu komórki może powodować różnego typu mutacje w wyniku insercji (z ang. insertion mutagenesis), które mogą prowadzić do inaktywacji genów regulatorowych oddziałujących supresyjnie na ekspresję onkogenów.

MUTACJE PUNKTOWE

Klonowanie onkogenów komórkowych pochodzących z niektórych nowotworów człowieka umożliwiło porównanie sekwencji nukleotydów w tych onkogenach z sekwencją nukleotydów w analogicznych onkogenach pochodzących z komórek normalnych. Badania te dały zaskakujące wyniki. Okazało się, że np. onkogen komórkowy *c-Ha-ras* 1 izolowany z komórek raka pęcherza człowieka wykazywał obecność mutacji punktowej w kodonie 12. Mutacja ta powodowała obecność w nim tyminy zamiast guaniny. Powodowało to zastąpienie glicyny przez walinę w odpowiednim miejscu kodowanego przez ten onkogen białka p21 [19, 150, 151, 191, 194] (tab. 3). Mutacja ta nie prowadziła do zwiększonej produkcji białka

TABELA 3

Niektóre mutacje punktowe obecne w onkogenach komórkowych izolowanych z nowotworów

Onc	Nowotwór	Miejsce zmienionego kodonu	Zmiana nukleotydu	Zmiana aminokwasu
<i>Ha-ras</i> 1	Rak pęcherza EJ/T24/J82	12	G → T	gly → val
<i>Ha-ras</i> 1	Rak płuc Hs 242	61	A → T	glu → le
<i>Ki-ras</i> 2	Rak płuc Calu-1	12	G → T	gly → cys
<i>Ki-ras</i> 2	Rak okrężnicy SW 480	12	G → T	gly → val
<i>N-ras</i>	Neuroblastoma SK-N-SH	61	C → A	glu → lys

p21 [191]. Jest rzeczą charakterystyczną, że homologiczny onkogen wirusowy, a więc gotowy do indukowania onkogenezy, również ma identyczną mutację. Znaczenie tej mutacji podkreśla również fakt, że podczas gdy zmutowany *c-Ha-ras* zdolny jest do transformacji komórek NIH 3T3, to niezmutowany *c-Ha-ras*, izolowany z komórek normalnych, nie ma tych właściwości. W dodatku badania nad onkogenem komórkowym *c-Ki-ras* 2, należącym do tej samej grupy onkogenów komórkowych co *c-Ha-ras* 1, dały podobne wyniki (tab. 3). Zarówno *c-Ki-ras* 2 izolowany z komórek raka płuc, jak i *c-Ki-ras* 2 izolowany z raka okrężnicy posiadały mutację punktową dotyczącą kodonu 12 [20, 118, 171]. Również uzyskana in vitro

spontaniczna mutacja *c-Ha-ras* 1 w obrębie kodonu 12, powodująca zastąpienia guaniny przez adeninę i w konsekwencji glicyny przez kwas asparaginowy, prowadziła do nabycia przez ten onkogen zdolności do indukowania transformacji nowotworowej komórek NIH 3T3 [158]. Analiza komputerowa przewidywanej struktury kodowanego przez ten onkogen białka p21 wykazała, że zastąpienie glicyny w miejscu 12 nie tylko przez walinę lub kwas asparaginowy, ale także przez inne aminokwasy, powinno dać tę samą zmianę konformacyjną [158]. Przewidywania te potwierdzone zostały przez wyniki doświadczeń, w których onkogen *c-Ha-ras* 1 poddawano *in vitro* mutacji w obrębie kodonu 12 i transformowano nim fibroblasty szczurze. Okazało się, że podstawienie glicyny przez każdy inny aminokwas, z wyjątkiem proliny, nadawało kodowanemu przez ten onkogen białku właściwości transformujące [130, 165]. W obrębie onkogenów należących do grupy *ras* izolowanych z komórek nowotworowych znaleziono również mutacje prowadzące do zmiany jednego nukleotydu w obrębie kodonu 61. Na przykład *c-Ha-ras* 1 pochodzący z raka płuc miał w obrębie tego kodonu tyminę w miejscu adeniny, co powodowało, że w pozycji 61 białka p21 znajdowała się leucyna zamiast kwasu glutaminowego [211]. Podobne wyniki dały również badania odkrytego stosunkowo niedawno u ludzi onkogenu *c-N-ras* znalezionego pierwotnie w komórkach neuroblastoma [172]. Onkogen ten wykryto również w komórkach mięsaka [80], a także w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej [125]. Jak dotąd nie opisano homologicznego w stosunku do niego onkogenu wirusowego. Otóż w onkogenie tym, izolowanym z komórek neuroblastoma, znaleziono również mutację w obrębie kodonu 61, powodującą wystąpienie adeniny w miejscu cytozyny i w konsekwencji lizyny w miejscu kwasu glutaminowego w kodowanym przezeń białku [193] (tab. 3).

Cytowane tu obserwacje sugerują, że zmiany pojedynczych aminokwasów w dwóch „strategicznych” miejscach białka p21 nadają temu białku właściwości indukowania transformacji nowotworowej. Analiza komputerowa trójwymiarowego modelu tego białka sugeruje, że aminokwasy w pozycji 12 uczestniczą w tworzeniu miejsca mającego zdolność wiązania nukleotydów [207], a konkretnie GTP (gwanozynotrójfosforanu) [61]. Zwrócono również uwagę, że sekwencja aminokwasów obecnych w białku p21 w pobliżu miejsca 12 wykazuje pewną homologię w stosunku do podjednostki beta ATP-azy mitochondrialnej w miejscu, w którym enzym ten najprawdopodobniej wiąże nukleotydy [66]. Dalsze badania prowadzone w tym kierunku doprowadziły do odkrycia, które może okazać się bardzo istotne przy próbach wyjaśnienia mechanizmów onkogenezy. Okazało się bowiem, że o ile normalne białko p21 ma właściwości GTP-azy, o tyle białko kodowane przez zmutowane onkogeny *ras*, ma-

jące właściwości indukowania onkogenezy *in vitro*, nie wykazuje aktywności tego enzymu [117]. Jest to o tyle dziwne, że zarówno normalne białko p21, jak i produkt aktywowanego onkogenu *ras* wykazują podobne powinowactwo przy wiązaniu GTP i podobną lokalizację w komórce [61, 62].

Mimo tych odkryć nadal należy odnosić się z dużą dozą sceptycyzmu w stosunku do hipotez próbujących wiązać aktywację onkogenów komórkowych z mutacjami punktowymi. Powinno się pamiętać, że mutacje te stwierdzono w liniach komórkowych wyprowadzonych z odpowiednich nowotworów. Nie stwierdzono tych mutacji w 50 przypadkach pierwotnych raków człowieka, w tym raków pęcherza, okrężnicy i płuc [59], a także w 14 przypadkach raka pęcherza i nerki [51]. Nie można wykluczyć, że mutacje te są raczej wynikiem, a nie przyczyną transformacji nowotworowej. Mogły one zajść już w trakcie rozwoju nowotworu, albo nawet w trakcie pasażu izolowanych komórek nowotworowych *in vitro* [51]. Za taką możliwością przemawiają pośrednio obserwacje wskazujące na wzrastającą zdolność *c-ras* do indukowania transformacji nowotworowej w trakcie kolejnych pasażu zawierających go komórek.

TRANSLOKACJE CHROMOSOMALNE

Wprowadzenie precyzyjnych metod identyfikacji chromosomów i ich odcinków doprowadziło do wykrycia wielu aberracji chromosomalnych, towarzyszących określonym nowotworom. Obecnie wiadomo, że większość chorób nowotworowych człowieka charakteryzuje się pewnymi powtarzalnymi defektami chromosomalnymi. Dotyczą one, na przykład, ponad 90% wszystkich ostrych białaczek. Zagadnienie to omówione jest szerzej w pracach przeglądowych poświęconych temu problemowi [21, 156, 212]. Interpretacja znaczenia tych aberracji chromosomalnych dla mechanizmu powstawania nowotworów bardzo pogłębiła się wraz z odkryciem onkogenów komórkowych. Najbardziej interesujący przebieg mają badania translokacji chromosomalnych obserwowanych u człowieka w chłoniaku Burkitta i w bardzo podobnym do niego mysim plazmocytoma. Zastanawiając się nad znaczeniem wzajemnej translokacji odcinków chromosomu 8 i 14 w chłoniaku Burkitta i chromosomu 15 i 12 w mysim plazmocytoma George Klein zaproponował, że nowotwory te powstają przez aktywację onkogenów komórkowych w wyniku ich przeniesienia w takie miejsce na chromosomie, w którym znajdują się bardzo aktywne pod względem transkrypcji geny kodujące immunoglobuliny [95]. W myśl tej hipotezy translokacje te byłyby imitacją fizjologicznie zachodzących w prekursorach limfocytów B translokacji zbliżających geny VDJ z genami C dla immunoglobulin. Wiadomo bowiem, że na chromosomie 14

człowieka i 12 myszy znajdują się geny kodujące łańcuchy ciężkie immunoglobulin, i że geny te są bardzo aktywne w komórkach syntetyzujących przeciwciała. W rzadszych przypadkach translokacje w chłoniaku Burkitta dotyczą chromosomu 8 i 2 lub 22, a wiadomo, że na chromosomach 2 i 22 znajdują się z kolei geny dla łańcuchów lekkich immunoglobulin [106]. Wkrótce okazało się, że zgodnie z tą hipotezą onkogen *c-myc* ulega translokacji w sąsiedztwo miejsca zawierającego geny dla łańcuchów ciężkich immunoglobulin zarówno w chłoniaku Burkitta, jak i w plazmocytoza u myszy, choć w nowym miejscu *c-myc* ułożony jest w odwrotnym kierunku w sensie transkrypcji niż geny dla immunoglobulin [2, 34, 41, 56, 96, 109, 135, 168, 195]. Proces rekombinacji prawdopodobnie ułatwia istnienie odcinków homologicznych w *c-myc* i w genach dla łańcuchów ciężkich [54]. W przypadku rzadziej występujących w chłoniaku Burkitta translokacji *c-myc* pozostaje na miejscu, natomiast w jego sąsiedztwo przeniesiony zostaje gen dla łańcucha lekkiego kappa [57]. Obserwacje te były tym bardziej znamienne, że mniej więcej w tym samym czasie poznano geny regulatorowe o charakterze wzmacniaczy, występujące wraz z genami kodującymi immunoglobuliny i zdolne do aktywacji genów sąsiadujących z nimi po obydwu stronach na nici DNA [112, 119, 134, 155]. Badanie aktywności *c-myc* wykazało, zgodnie z przewidywaniami, jego zwiększoną transkrypcję po przeniesieniu go w wyniku translokacji zachodzącej w limfocytach chłoniaka Burkitta [8, 132]. Zarówno w komórkach mysiego plazmocytoza, jak i chłoniaka Burkitta ilość mRNA odpowiadającego *c-myc* ulega kilkakrotnemu zwiększeniu w porównaniu z normalnymi komórkami limfoidalnymi [142]. Sugerowało to aktywację *c-myc* w wyniku opisanych translokacji [41, 56, 156, 168, 195] zgodnie z wcześniejszą hipotezą. Wydawało się więc, że tajemnica mechanizmu onkogenezy przynajmniej w przypadku tych dwóch nowotworów jest bliska wyjaśnienia. Wyłaniający się prosty schemat onkogenezy prowadzącej do rozwoju chłoniaka Burkitta i mysiego plazmocytoza skomplikował się jednak bardzo w wyniku dalszych obserwacji. Okazało się, że np. w mysim plazmocytoza *c-myc* nie dostaje się po translokacji pod wpływ wzmacniacza związanego z genem dla łańcucha ciężkiego *gamma*, gdyż wzmacniacz ten zostaje w wyniku tej wzajemnej translokacji „zabrany” z miejsca swego normalnego położenia [129]. Analogiczną sytuację stwierdzono w limfocytach pochodzących z chłoniaka Burkitta [146]. Ponadto wykazano, że translokacja *c-myc* połączona jest z istotnymi zmianami w jego strukturze [182]. W większości przypadków przenoszone są tylko dwa eksony z końca 3', natomiast ekson pierwszy (od końca 5') pozostaje na miejscu [181, 205]. W tych rzadkich przypadkach chłoniaka Burkitta, w których translokacji ulega cały onkogen *c-myc*, w jego pierwszym eksonie obserwuje się mutacje [147]. Ekson pierwszy

onkogenu *c-myc* podlega więc delecji albo mutacji i być może właśnie w tym eksonie tkwi tajemnica aktywacji *c-myc*. Choć w normalnych komórkach ekson pierwszy podlega transkrypcji, to jednak z powodu zawartości kodonów terminujących nie ulega translacji. Przypuszcza się, że ekson ten spełnia funkcje regulatorowe i hamuje ekspresję pozostałych dwóch eksonów. Albo jest on miejscem wiązania się jakiegoś inhibitora, albo obecność odpowiadającego mu fragmentu mRNA hamuje translację pozostałego odcinka. Jest rzeczą charakterystyczną, że wirusowy onkogen *v-myc* nie zawiera odcinka odpowiadającego pierwszemu eksonowi.

Istnieją jednak obserwacje, które podważają udział *c-myc* w powstawaniu chłoniaków. Opisano przypadki chłoniaków Burkitta, w których w ogóle nie obserwowano translokacji [99]. Około 15% wszystkich plazmocytoza u myszy również nie zawiera żadnych translokacji [98]. Z kolei w pewnych chłoniakach człowieka translokacji do chromosomu 14 ulegają odcinki innych chromosomów, a więc nie zawierających *c-myc* [213]. W dodatku zdrowi ludzie mogą posiadać limfocyty z translokacjami charakterystycznymi dla chłoniaka Burkitta [97]. Zdolność limfocytów B transformowanych wirusem Epsteina-Barr do produkcji czynników wzrostowych dla limfocytów B może również sugerować zupełnie odmienny mechanizm onkogenezy w chłoniaku Burkitta [71]. Wiadomo, że wirus Epsteina-Barr partycypuje w tym mechanizmie, a nie stwierdzono dotychczas, aby onkogen *c-myc* kodował czynniki wzrostowe limfocytów B.

W komórkach niektórych chłoniaków Burkitta i mysich plazmocytoza można wykryć również aktywowany onkogen *c-mos*. W trakcie tej aktywacji prawdopodobnie podlega on mutacji, a jego transkrypcja jest istotnie wzmożona [149]. Być może w procesie onkogenezy dochodzi tu do współdziałania dwóch onkogenów.

Innym nowotworem, w którym dochodzi do charakterystycznej translokacji komórkowego onkogenu jest przewlekła białaczka szpikowa u człowieka. W białaczce tej obserwuje się w ramach tzw. translokacji Philadelphia przeniesienie *c-abl* z chromosomu 9 na chromosom 22, na którym, jak wiadomo, znajduje się gen dla łańcucha lekkiego lambda [44]. Nie wiadomo jednak, czy przeniesiony *c-abl* podlega w swym nowym miejscu transkrypcji. W różnych przypadkach przewlekłej białaczki szpikowej u ludzi obserwowano też translokacje z osiemnastu różnych chromosomów na chromosom 22, co dalej podważa hipotezę sugerującą, że ewentualna aktywacja *c-abl* jest kluczowym momentem w powstawaniu tej białaczki [96]. Mimo bardzo atrakcyjnych hipotez dotyczących znaczenia opisanych tu translokacji onkogenów komórkowych dla mechanizmu onkogenezy, nadal nie wiadomo, w jakim stopniu translokacje te wpływają na aktywność przeniesionych onkogenów.

AMPLIFIKACJA

Komórki niektórych nowotworów człowieka zawierają dwie formy pokrewnych zaburzeń chromosomalnych [12]. Są to tzw. podwójne drobne chromosomy (z ang. double minute chromosomes) oraz regiony barwiące się homogennie (z ang. homogeneously staining regions). Podwójne małe chromosomy są znacznie mniejsze niż chromosomy normalne i nie mają centromerów. Regiony barwiące się homogennie charakteryzują się natomiast tym, że nie mają po zabarwieniu prążkowania charakterystycznego dla normalnych odcinków chromosomów. Te obydwie formy zaburzeń chromosomalnych są — jak się okazuje — miejscem, w którym doszło do amplifikacji znajdujących się tam genów [160]. DNA w określonym miejscu chromosomu ulega zwielokrotnieniu (nawet 100-krotnemu), a następnie odcinki takie oddzielają się od chromosomu, tworząc podwójne drobne chromosomy [12]. W komórkach jednego z nowotworów pochodzących z okrężnicy człowieka znaleziono regiony barwiące się homogennie, a wśród DNA, który uległ w tych regionach amplifikacji wykryto onkogen *c-myc* [4]. *c-myc* występował w tych miejscach aż w 50 kopiach i proporcjonalnie wzrastało w tych komórkach stężenie mRNA odpowiadającego temu onkogenowi [4]. W komórkach pochodzących z raka okrężnicy znaleziono również poddany 10-krotnej amplifikacji onkogen *c-myb* [5]. Oczywiście fakty te nie wyjaśniają, w jakim stopniu i czy w ogóle nadmierna ekspresja *c-myc* odpowiedzialna jest za transformację nowotworową, jaka zaszła w tych komórkach. Podany przykład amplifikacji onkogenu komórkowego w komórkach nowotworowych nie jest przykładem odosobnionym. 10-krotną amplifikację *c-myc* stwierdzono w komórkach linii HL60 wyprowadzonej z ludzkiej białaczki szpikowej [29, 42]. Amplifikację onkogenu komórkowego *c-N-myc* obserwuje się u ludzi w neuroblastoma [17, 163] i w retinoblastoma [105]. Onkogen ten występuje w normalnych komórkach w jednej kopii w chromosomie 2, natomiast w opisanych guzach ulega 20–140-krotnej (neuroblastoma) i 10–200-krotnej (retinoblastoma) amplifikacji. W neuroblastoma wykazać go można w homogennie barwiących się regionach różnych chromosomów [17, 163]. Amplifikację *c-N-myc* zaobserwowano również w komórkach izolowanych z 38% świeżych (nie leczonych) przypadków neuroblastoma, choć nie znaleziono jej w komórkach innych nowotworów [17], a w dodatku amplifikacja ta koreluje dodatnio ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej i towarzyszy jej wzmożona ekspresja *c-N-myc* [162]. 5-krotną amplifikację i wzmożoną ekspresję onkogenu *c-myb* zaobserwowano w komórkach ostrej białaczki szpikowej [141]. W komórkach linii Y1, wyprowadzonej z mysiego nowotworu nadnerczy, wykryto obydwie formy amplifikacji DNA, a w nich *c-Ki-ras* w 30–60 kopiach podlegający wzmożonej ekspresji [161]. Onkogen *c-Ki-ras* 2 poddany u-

miarkowanej (3–6-krotnej) amplifikacji wykryto również w ludzkich komórkach linii LX-1, wyprowadzonej z raka płuc, i komórkach linii SW 480, wyprowadzonej z raka okrężnicy [116].

Amplifikacji onkogenów komórkowych w niektórych nowotworach towarzyszy — jak widać — ich translokacja, a często także wzmożona ekspresja. W jednej z prac próbowano dopatrzeć się nawet związku między amplifikacją onkogenu i stopniem złośliwości nowotworu [17]. Tym nie mniej należy stwierdzić, że w żadnym dotychczas zbadanym przypadku nie udowodniono, że amplifikacja onkogenu komórkowego była koniecznym warunkiem onkogenezy [208]. W tych nowotworach, w których dochodzi do amplifikacji określonego onkogenu i podwyższonej jego ekspresji, spotyka się też przypadki, w których tej podwyższonej ekspresji nie towarzyszy amplifikacja [115]. Nie ma więc, jak wydawało się wcześniej, bezpośredniej zależności między amplifikacją onkogenu i wzmożoną jego ekspresją. W dodatku kilkakrotną amplifikację niektórych onkogenów obserwuje się w normalnych komórkach niektórych szczepów myszy i chomików [24]. Nie można wykluczyć, że amplifikacja określonych onkogenów, obserwowana w komórkach niektórych nowotworów, nie jest zjawiskiem pierwotnym, lecz wtórnym.

UWOLNIENIE SPOD KONTROLI GENÓW REGULATOROWYCH

Na razie tylko pewne pośrednie argumenty przemawiają za aktywacją onkogenów komórkowych w wyniku uwolnienia się ich spod kontroli genów regulatorowych. Za taką możliwością przemawiają np. obserwacje, podczas których duże fragmenty DNA (30 kb) izolowane z normalnych komórek nie miały właściwości indukowania transformacji nowotworowej fibroblastów NIH 3T3, a mniejsze fragmenty (1–5 kb) miały takie właściwości (30). Zarówno w neuroblastoma, jak i w retinoblastoma, dwóch rzadkich nowotworach wieku dziecięcego, pierwotną zmianą leżącą u podłoża onkogenezy wydaje się utrata lub inaktywacja określonych genów [115, 124, 153]. Istnieją przypuszczenia, że są to geny odpowiedzialne za hamowanie ekspresji pewnych onkogenów.

Pierwszym warunkiem rozwoju neuroblastoma lub retinoblastoma może być pewien defekt chromosomalny o charakterze dziedzicznym. Może to być wrodzona delecja określonych genów chromosomu 1 w przypadku neuroblastoma lub chromosomu 13 w przypadku retinoblastoma. Delecja ta obejmuje prawdopodobnie pewne geny regulatorowe, ale wydaje się ona jedynie usposabiać do rozwoju tych nowotworów. Przed powstaniem nowotworu chronią prawdopodobnie geny regulatorowe obecne w homologicznych chromosomach nie dotkniętych delecją. Przypuszcza się, że dopiero inaktywacja tych ostatnich genów jest warunkiem zainicjowa-

nia procesu onkogenezy. Zgodnie z tą hipotezą, w komórkach izolowanych ze świeżych przypadków retinoblastoma, a także w komórkach linii Y79 wyprowadzonej z tego nowotworu dochodzi do aktywacji onkogenu *c-N-myc* [105]. Oczywiście cytowane obserwacje nie dostarczają jednak bezpośredniego dowodu na poparcie tej hipotezy.

UDZIAŁ ONKOGENÓW KOMÓRKOWYCH W INDUKOWANIU NOWOTWORÓW PRZEZ CZYNNIKI KANCEROGENNE CHEMICZNE I FIZYCZNE

Olbrzymia większość wszystkich nowotworów złośliwych, występujących u ludzi, wywołana jest prawdopodobnie przez czynniki kancerogenne chemiczne i fizyczne pochodzące z otaczającego nas środowiska. Dlatego też jeżeli, zgodnie z pewnymi przypuszczeniami, proces onkogenezy ma zachodzić poprzez aktywację określonych onkogenów, muszą one również brać udział w onkogenezie indukowanej przez czynniki kancerogenne chemiczne i fizyczne. Niektóre obserwacje chyba rzeczywiście potwierdzają taką możliwość. Zapoznawszy się z różnymi mechanizmami aktywacji onkogenów można wyobrazić sobie wiele sytuacji, w których czynniki kancerogenne chemiczne i fizyczne mogą w niej uczestniczyć. Czynniki kancerogenne mogą prawdopodobnie aktywować onkogen komórkowy, oddziałując nań zarówno bezpośrednio lub pośrednio. Bezpośrednie oddziaływanie obejmować może, takie procesy jak np. indukcja mutacji punktowych lub translokacji. Pośrednie oddziaływanie natomiast może być wywołane np. przez wpływ na geny regulatorowe, pod których kontrolą znajdują się określone onkogeny. Wiadomo, że aktywacja niektórych genów, w tym onkogenów, może być poprzedzona ich hipometylacją [47, 76, 152]. Okazało się, że pewne kancerogeny, nawet te, które prawdopodobnie nie łączą się kowalentnie z DNA indukują hipometylację DNA [14, 209].

Zgodnie z niektórymi podanymi tu przypuszczeniami stwierdzono aktywację onkogenów komórkowych w komórkach transformowanych przez kancerogeny chemiczne [9, 32, 189]. W raku sutka indukowanym u szczurów przez podawanie nitrozometylmocznika stwierdzono *c-Ha-ras* 1 aktywowany przez pojedyncze mutacje punktowe [188]. Mutacje dotyczyły „strategicznego” kodonu 12 (tab. 3). Aktywację tego onkogenu zaobserwowano również w chemicznie indukowanym raku skóry i brodawczaku u myszy [9]. W indukowanym przez podawanie metylcholantrenu mięsaku mysim dochodzi natomiast do aktywacji onkogenu *c-Ki-ras* [58], a w indukowanym chemicznie również u myszy chłoniaku wykryto aktywny *c-N-ras* [78]. Aktywacja *c-Ki-ras* zachodzi również pod wpływem promieniowania jonizującego, prowadząc do powstania chłoniaków

u myszy. Również i w tym przypadku, podobnie jak przy podawaniu kancerogenów chemicznych, mutacja dotyczy kodonu 12 [79]. W płodowych komórkach świnki morskiej, transformowanych przy użyciu nitrozozwiązków lub węglowodorów policyklicznych, również dochodzi do aktywacji onkogenów komórkowych z grupy *ras* [189]. W wyniku bezpośredniego oddziaływania *in vitro* kancerogenu chemicznego na izolowany onkogen komórkowy uzyskano aktywację tego onkogenu, co wyklucza pośrednictwo innych czynników i związków w tym procesie [110]. Ekspresja *c-myc* zmienia się w cyklu komórkowym, a w komórkach transformowanych chemicznie regulacja ta ulega zaburzeniu [18].

Wydaje się, że aberracje chromosomalne mogą prowadzić do aktywacji onkogenów. Z kolei pewne kancerogeny chemiczne indukują określone aberracje chromosomalne. Białaczki i mięsaki indukowane u szczurów w wyniku podawania kancerogenów takich jak np. pochodne metylcholantrenu i antracenu charakteryzują się częstym występowaniem trisomii chromosomu 2 [121].

MECHANIZM ONKOGENEZY

Onkogeneza jest prawdopodobnie konsekwencją zaburzeń wzrostu i różnicowania się komórek. Wiele argumentów przemawia za udziałem onkogenów w obydwu tych procesach. Aktywacja onkogenu, czyli proces przekształcania się normalnego genu uczestniczącego w regulacji wzrostu i różnicowania się komórek w gen indukujący onkogenezę została w niektórych przypadkach poznana dosyć szczegółowo. Mimo to jednak sam mechanizm onkogenezy i bezpośredniego udziału w nim aktywowanych onkogenów pozostaje nadal tylko domeną hipotez i przypuszczeń. Na usprawiedliwienie tej niewiedzy należy dodać, że trudno jest wyjaśnić mechanizm zaburzonego w wyniku aktywacji onkogenu procesu wzrostu i różnicowania się komórek, jeżeli proces ten nie jest do końca poznany w odniesieniu do komórek normalnych.

Za udziałem onkogenów we wzroście i różnicowaniu się komórek przemawia:

zmieniająca się ekspresja onkogenów w embriogenezie;

zmiana ekspresji onkogenów w regeneracji wątroby;

podobieństwo niektórych onkogenów do genów dla takich czynników wzrostowych, jak PDGF i TCGF, lub receptora dla EGF (skrótów objaśnione są w dopiskach do tab. 2);

kodowanie przez niektóre onkogeny, np. *abl*, *fes*, *fgr*, *fps*, *ros*, *src* i *yes* kinazy białkowej swoistej dla tyrozyny, której aktywność mają również receptory dla EGF, PDGF i insuliny [63, 87].

Receptory dla EGF i PDGF są białkami transbłonowymi. Ich fragment wystający ponad błonę komórkową tworzy receptor dla czynnika wzrostowego, natomiast fragment wewnątrzkomórkowy ma aktywność kinazową. Aktywność kinazowa zależy prawdopodobnie od zmian konformacyjnych powstałych w części receptorowej w wyniku związania czynnika wzrostowego. Kinaza białkowa swoista dla tyrozyny wydaje się więc bardzo ważnym ogniwem zarówno w fizjologicznej regulacji wzrostu komórek, jak i w transformacji nowotworowej. Niskocząsteczkowe transformujące czynniki wzrostowe produkowane przez niektóre komórki nowotworowe i zdolne do blokowania receptorów dla EGF i do indukowania odwracalnej transformacji nowotworowej fibroblastów szczurzych i ludzkich *in vitro* również mają zdolność aktywacji kinazy białkowej swoistej dla tyrozyny [196, 197]. W obrębie wszystkich onkogenów, których produkty białkowe wykazują aktywność tej kinazy, znajduje się bardzo podobny odcinek obejmujący około 250 kodonów. Ten właśnie fragment odpowiada za kodowanie czynności kinazowej.

Wiadomo, że kinazy białkowe przez fosforylację wywierają istotny wpływ na funkcję białek, np. aktywność enzymów. Niestety mało wiadomo na temat białek, których reszty tyrozynowe ulegają fosforylacji pod wpływem wspomnianej kinazy. Nie wiadomo również, jaka jest zasadnicza różnica między czynnością kinazy białkowej, uczestniczącej w procesach fizjologicznych, a czynnością kinazy uczestniczącej w onkogenezie. W normalnych komórkach fosfotyrozyna stanowi zaledwie około 0,03% ufosforylowanych aminokwasów [120]. W wyniku transformacji nowotworowej indukowanej przez wirusy, których onkogeny kodują ten enzym, ilość fosfotyrozyny w komórce wzrasta 5–10 razy [63].

Kinazy swoiste dla tyrozyny kodowane przez *v-ros* i *v-src* mają również zdolność fosforylacji występującego w błonie komórkowej fosfatydyloinozytolu do 4,5-dwufosforanu fosfatydyloinozytolu [107, 113, 187]. Z kolei ten ostatni związek prawdopodobnie pośredniczy w przekazywaniu wewnątrzkomórkowych sygnałów podczas odpowiedzi komórek na niektóre hormony, neurotransmitery, a także czynniki wzrostowe [113]. Istnieją sugestie, że przyłączenie przez receptor komórkowy odpowiedniego czynnika wzrostowego czy hormonu powoduje aktywację enzymu, który rozkłada 4,5-dwufosforan fosfatydyloinozytolu. W wyniku tej reakcji powstaje trójfosforan inozytolu i dwuacyloglicerol. Ostatni z wymienionych związków aktywuje kinazę białkową C (zależną od wapnia i fosfolipidów) [114, 133]. Nie znane są białka fosforylowane w komórce przez kinazę białkową C. Analogicznie do kinazy białkowej A, przez aktywację której cAMP wywiera swój wpływ na aktywność określonych enzymów, można przypuszczać, że również kinaza białkowa C sprawuje ważną rolę w regulacji proliferacji i różnicowania się komórek [114].

Okazało się, że kinaza swoista dla tyrozyny, kodowana przez *v-src*, czyli białko p60, występuje szczególnie obficie związana z wewnętrzną powierzchnią błony komórkowej w płytkach przylegania [154], a więc w strukturach odpowiedzialnych za kontakty komórek z otaczającym je podłożem. Wiadomo, że płytki te ulegają dezintegracji, a kontakty z podłożem ulegają istotnym zaburzeniom w komórkach nowotworowych. Substratem dla wspomnianej kinazy jest winkulina — białko związane z mikrofilamentami aktynowymi cytoszkieletu, których pęczki promieniście „zbiegają się” i kończą w płytkach przylegania [166]. Winkulina leżąc między zakończeniami mikrofilamentów i błoną komórkową łączy je prawdopodobnie z hipotetycznym białkiem kotwiczącym [166]. W normalnych komórkach winkulina zawiera bardzo niewiele reszt fosfotyrozyny, a w następstwie transformacji nowotworowej komórek fosforylacja ta wzrasta 20-krotnie. Wydaje się, że fosforylacja reszt tyrozynowych winkuliny jest katalizatorem dezintegracji płytek przylegania.

Innym powiązaniem między onkogenami i cytoszkieletem komórki jest połączenie białka kodowanego przez *v-fms* z siecią filamentów pośrednich [6]. Winkulina nie jest jedynym białkiem podlegającym fosforylacji pod wpływem kinazy białkowej kodowanej przez *v-src*. W komórkach transformowanych przez wirus mięsaka Rousa ilość ufosforylowanych reszt tyrozynowych wzrasta około 10-krotnie [55, 63]. W przypadku białka p60 należy pamiętać, że zwiększone tempo fosforylacji jego substratu następuje nie tylko w wyniku zwiększonej ekspresji kodującego go onkogenu *src*. Okazało się bowiem, że zwiększona aktywność kinazowa białka p60 może być wywołana przez bezpośrednią interakcję z białkiem kodowanym przez niektóre wirusy polyoma [15]. Wirusy te prawdopodobnie w ten właśnie sposób indukują transformację nowotworową komórek. Stanowi to przykład onkogenezy indukowanej przez nie posiadające onkogenów wirusy DNA. Białko p60 ma również zdolność do fosforylacji swoich własnych reszt tyrozynowych [55], czyli zdolność do autofosforylacji. Nie wiemy jednak, jakie jest znaczenie tego zjawiska. Z rozważań tych wynika, że fosforylacja reszt tyrozynowych wydaje się istotnym ogniwem w łańcuchu regulacji obejmujących zarówno kształt, jak i wzrost komórek, chociaż olbrzymia większość grup fosforanowych połączonych z białkiem w komórce związana jest z seryną i treoniną.

Należy dodać, że niektóre onkogeny, mimo podobieństwa ich sekwencji nukleotydowych do genów kodujących kinazę białkową swoistą dla tyrozyny, nie kodują białek wykazujących aktywność tego enzymu *in vitro*. Za przykład może posłużyć *v-mos* i *v-raf*, a także *v-fms* i *v-mil*. [89]. Komórki zakażone przez wirusy zawierające te onkogeny nie wykazują zwiększonej zawartości białek z ufosforylowanymi resztami tyrozynowymi.

Wśród białek kodowanych przez onkogeny znajdują się również inne kinazy, np. białkowa swoista dla treoniny [169]. Białko kodowane przez wirusowy onkogen *v-Ha-ras* ma zdolność do fosforylacji swojej własnej treoniny w pozycji 59, używając GTP jako donora grupy fosforanowej [169]. Okazało się, że zmiana glicyny na walinę w miejscu 12 zwiększa zdolność do autofosforylacji tego białka [67]. Jednak właśnie kinazy swoiste dla tyrozyny wydają się odgrywać dominującą rolę w regulacji wzrostu normalnych komórek. Jak wspomniano, kodowane są one nie tylko przez onkogeny, ale także związane są z receptorami dla niektórych hormonów i czynników wzrostowych.

Nie wiadomo jednak, czy uczestniczące w procesie onkogenezy kinazy białkowe aktywowanych onkogenów są zbyt aktywne, czy raczej mają zmienioną swoistość substratową. W związku z udziałem kinaz białkowych swoistych dla tyrozyny zarówno w normalnym wzroście komórek, jak i w procesie onkogenezy, ważna rola w tych procesach musi przypadać również odpowiednim fosfatazom. Do wzrostu fosforylacji reszt tyrozynowych dochodzić może bowiem również w wyniku spadku aktywności swoistych fosfataz [63].

Niektóre białka kodowane przez onkogeny podobne są do pewnych czynników wzrostowych lub ich receptorów komórkowych (tab. 2). Onkogen *v-sis* należący do wirusa małpiego mięsaka koduje np. białko p28 zbliżone budową do jednego z dwóch łańcuchów płytkowego czynnika wzrostowego [49, 203]. Czynniki te zbudowane są z dwóch podobnych łańcuchów polipeptydowych [186]. Stymuluje on proliferację komórek pochodzenia mezenchymatycznego. Produkowany jest przez megakariocyty i magazynowany w ziarnistościach alfa płytek krwi [45, 186]. Aktywowany *c-sis* wykryto w komórkach ludzkiego osteosarcoma [74], a także obok innych onkogenów w komórkach ludzkiej białaczki wywodzącej się z limfocytów T. Białaczka ta indukowana jest przez retrowirusy HTLV, które prawdopodobnie nie zawierają onkogenów [27, 167].

Podobnie jak w przypadku kinaz białkowych kodowanych przez aktywowane onkogeny, tak i w tym przypadku nie wiadomo, czy czynnik wzrostowy kodowany przez *v-sis* indukuje onkogenezę, ponieważ jest produkowany w nadmiernych ilościach, czy dlatego, że uwalniany jest w sposób ciągły, a nie tylko okresowo, czy też dlatego, że będąc zmieniony w stosunku do normalnego czynnika wzrostowego sprawuje swą funkcję wadliwie. Sugeruje się, że dla transformacji nowotworowej komórek ważniejsza może okazać się nie tyle nadmierna produkcja danego czynnika wzrostowego, ile jego synteza w nieodpowiednim okresie wzrostu i różnicowania się komórek określonego typu, albo w nieodpowiedniej fazie cyklu komórkowego. Pewne onkogeny podlegające transkrypcji w embriogenezie spełniają prawdopodobnie istotną rolę dla wzrostu i różnicowa-

nia, ale w następnych etapach transkrypcja ich ulega przerwaniu. Jeżeli w następstwie aktywacji onkogenu jego transkrypcja utrzymuje się, albo wznowiona jest w komórkach, które już ją przerwały, to może to prowadzić do wzrostu niekontrolowanego i onkogenezy. Sugerowano również, że u podstaw onkogenezy indukowanej przez *v-sis* może leżeć aktywacja tego genu w komórkach produkujących równocześnie receptor dla PDGF i wrażliwych na działanie mitogenne zarówno PDGF, jak i białka p28. Dawałoby to możliwość stymulowania wzrostu komórki bez wydzielania czynnika wzrostowego poza komórkę na zasadzie stymulacji autokrynowej [203]. P28 łączyłoby się z receptorami dla PDGF już w pęcherzykach wydzielniczych, albo na jeszcze wcześniejszym etapie, np. tuż po glikolizacji, jakiej białko to podlega w aparacie Golgiego. Badania późniejsze wykazały jednak wydzielanie czynnika wzrostowego podobnego do PDGF przez komórki transformowane wirusem małpiego mięsaka [138]. Produkt białowy onkogenu *v-erb B* przypomina budową fragment śródbłonowy i cytoplazmatyczny receptora dla EGF [50], a więc fragment efektorowy odpowiedzialny za aktywność kinazową. Nie zawiera on natomiast fragmentu regulatorowego odpowiedzialnego za wiązanie EGF. Istnieją przypuszczenia, nie poparte na razie dowodami eksperymentalnymi, że brak odcinka regulatorowego sprawia, że produkt białowy *v-erb B* wykazuje stałą aktywność kinazową [87]. Do receptora dla EGF podobne jest również białko kodowane przez onkogen komórkowy *c-neu* wykryty w niektórych glejakach u szczurów [159].

Pewien onkogen komórkowy (*B-lym 1*), dla którego nie znaleziono dotychczas homologicznego onkogenu wirusowego, a który wykryto w chłoniakach wywodzących się z limfocytów B zarówno u kur [72], myszy [104] i u człowieka [46], wykazuje podobieństwo sekwencji swych nukleotydów do genu kodującego transferynę [46]. Transferyna jest białkiem wiążącym żelazo i wymagana jest do wzrostu większości komórek *in vitro*. Ekspresja receptora dla transferyny koreluje ze zdolnością komórek do proliferacji. Potwierdzeniem jej roli jest hamowanie proliferacji komórek przez podanie przeciwciał przeciw jej receptorowi, nawet jeżeli doostarczy się komórce żelaza drogą alternatywną. Obserwacje te sugerują ważną funkcję transferyny i jej receptora w regulacji wzrostu wielu komórek [31] i są podstawą do przypuszczeń, że *B-lym 1* może indukować onkogenezę imitując „wadliwie” czynność transferyny. Sugerowano również podobieństwo białka kodowego przez onkogen *c-ras* do receptora dla transferyny [61], ale nie potwierdziły tego kolejne badania [84].

Jeżeli chodzi o produkt białkowy onkogenu *c-ras*, czyli białko p21, to jego połączenie z wewnętrzną powierzchnią błony komórkowej i jego właściwości wiązania i hydrolizy GTP oraz utrata tej ostatniej właści-

wości w wyniku aktywacji onkogeny wywołanej mutacją w pozycji 12 [117, 190] wydaje się również odnosić do mechanizmów regulujących ważne procesy życiowe komórki. Chodzi o to, że białko p21 wykazuje również podobieństwo do związanych z błoną komórkową tzw. białek G wiążących GTP [68, 89]. Białka te pośredniczą w przekazywaniu bodźców między receptorami powierzchniowymi dla niektórych hormonów i cyklazą adenylową, regulując tym samym jej aktywność. Dla swej aktywności białka te wymagają połączenia z GTP [89]. Istnieją przypuszczenia, że utrata właściwości GTP-azowych przez białka pochodzące ze zmutowanego onkogeny *c-ras* może prowadzić do nadmiernej (wzmoczonej lub nieprzerwanej) aktywności białek wiążących GTP. Jednak podobieństwo białka p21 do białek wiążących GTP sugeruje, że samo ono może również pośredniczyć w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu bodźców w odpowiedzi na określone hormony i jego deformacja w wyniku mutacji *c-ras* prowadzi do zaburzeń w sprawowaniu tych czynności. Potwierdzeniem roli produktu białkowego pochodzącego ze zmutowanego onkogeny *c-ras* są wyniki doświadczeń, w których badano właściwości białek syntetyzowanych u *E. coli* po wprowadzeniu do jej genomu zmutowanego *c-ras*, albo odpowiedniego protoonkogeny. Po mikroiniekcji do komórek spoczynkowych pierwsze z otrzymanych białek indukowały w ciągu kilku godzin zmiany morfologiczne i intensywną proliferację, natomiast białko kodowane przez protoonkogen nie wywoływało takich zmian [60].

Białka kodowane przez niektóre onkogeny wykryć można w jądrze komórkowym związane z DNA [1, 3, 12, 82, 123]. Konsekwencje tego połączenia są nieznane, ale może ono wpływać na ekspresję genów przez takie mechanizmy jak metylacja lub hipometylacja odpowiednich odcinków DNA, zmiana ich wrażliwości na działanie DNA-azy I, wiązanie promotorów lub innych regionów regulatorowych [123]. Jednym z onkogenów, którego produkt białkowy lokuje się w jądrze komórkowym, jest *c-myc* i jego wirusowy odpowiednik *v-myc* [1, 3, 82] oraz *c-myb* i *v-myb* [101], a także *c-fos* i *v-fos* [36]. Gwałtowny wzrost ekspresji onkogeny *c-myc* w wyniku pobudzenia proliferacji komórek spoczynkowych [94] mitogenami skłania do przypuszczeń, że kodowane przez nie białko bierze udział w regulacji proliferacji komórek. Jest rzeczą charakterystyczną, że białka kodowane przez onkogeny *myc* i *myb* podobne są nie tylko pod względem lokalizacji, ale także sekwencji aminokwasów [148]. Nieco późniejsze badania wykazały, że w odpowiedzi na czynniki wzrostowe aktywacja *c-myc* poprzedzona jest aktywacją i ekspresją *c-fos* [35, 75]. Nie można wykluczyć, że produkty białkowe tych onkogenów są wewnątrzkomórkowymi mediatorami uczestniczącymi w odpowiedzi na działanie czynników wzrostowych.

Nie zawsze znamy właściwości kodowanych przez onkogeny białek, choć ich efektywność w indukowaniu transformacji nowotworowej komórek jest czasami bardzo wysoka. Sugeruje się, że wystarcza do tego celu np. obecność w komórce zaledwie dziesięciu cząsteczek białka kodowanego przez *c-mos* [98].

ONKOGENEZA JAKO PROCES WIELOETAPOWY, W KTÓRYM WSPÓLDZIAŁAJĄ RÓŻNE ONKOGENY

Wykrycie onkogenów wywołało falę hipotez i teorii próbujących sprowadzić proces onkogenezy do aktywacji pojedynczego genu komórkowego. Obecnie coraz więcej danych przemawia za uznaniem onkogenezy za proces wieloetapowy, w którym uczestniczy więcej niż jeden onkogen i aktywacja ich musi zachodzić prawdopodobnie w określonej kolejności. Pogląd taki wydaje się bliższy wieloletnim obserwacjom wskazującym na istnienie pewnych określonych etapów w powstawaniu nowotworów, np. w procesie onkogenezy indukowanej przez kancerogeny chemiczne.

W wielu nowotworach wykrywa się więcej niż jeden aktywowany onkogen [174]. Przykładem takiego nowotworu może być chłoniak Burkitta, a także chłoniak kur wywodzący się z limfocytów B. W obydwu nowotworach dochodzi prawdopodobnie do aktywacji zarówno onkogenu *c-B-lym 1*, jak i onkogenu *c-myc* [31]. Przypuszcza się, że *c-myc* indukuje wczesne preneoplastyczne zmiany w limfocytach B, natomiast *c-B-lym 1* konieczny jest dla późniejszego etapu onkogenezy.

W pewnych modelach doświadczalnych transformację nowotworową komórek otrzymano dopiero po wprowadzeniu do nich dwóch onkogenów, na przykład, *ras* i *myc*, podczas gdy żaden z nich podany oddzielnie nie dawał tego efektu [98]. Wykazano, że onkogen *c-Ha-ras 1* izolowany z raka pęcherza człowieka indukował tylko ograniczoną proliferację szczurzych fibroblastów zarodkowych, natomiast wprowadzony razem z *v-myc* prowadził do pełnej transformacji nowotworowej [103]. Swoje zdolności transformacyjne w stosunku do komórek nerki szczurzej onkogen *c-Ha-ras 1* wykazywał również dopiero po wprowadzeniu go razem z genem E1A adenowirusów [157]. Z kolei fibroblasty izolowane ze skóry właściwej chomika i proliferujące nieprzerwanie po traktowaniu kancerogenami chemicznymi ulegały transformacji nowotworowej dopiero po wprowadzeniu do nich onkogenu *Ha-ras* [131]. Doświadczenia te są w pozornej sprzeczności ze znaną zdolnością onkogenów z grupy *ras* do bezpośredniej transformacji nowotworowej fibroblastów linii NIH 3T3 bez współdziałania innych onkogenów lub czynników. Należy jednak pamiętać,

że fibroblasty mysie linii NIH 3T3, używane najczęściej do indukowania onkogenezy *in vitro*, nie są komórkami normalnymi [98]. Komórki te używane są do ujawniania obecności onkogenów ze względu na łatwość, z jaką integrują obcy DNA i wbudowują go do swego genomu. Dzięki użyciu tych komórek badania onkogenów można było rozszerzyć z onkogenów wirusowych na komórkowe. Jest to jednak wysoce aneuploidalna ustalona linia komórkowa i nie można wykluczyć, że nieprzerwana proliferacja tych komórek („nieśmiertelność”) wiąże się już z aktywacją jakiegoś onkogenu w tych komórkach, a wprowadzenie onkogenu *ras* prowadzi tylko do kolejnego etapu na drodze do onkogenezy. Jeżeli przyjąć takie założenie, to nie dziwi brak zdolności transformacyjnych onkogenów *ras* w stosunku do komórek linii nie ustalonych bez jednoczesnego wprowadzenia innych onkogenów. Wydaje się, że fibroblasty NIH 3T3 są szczególnie wrażliwe na oddziaływanie onkogenów z grupy *ras* [98]. Sugeruje się, że onkogeny z tej grupy zdolne są do transformacji nowotworowej tylko komórek linii ustalonych. Ze wspomnianą hipotezą stoją jednak w sprzeczności późniejsze obserwacje wskazujące na zdolność *c-Ha-ras* 1 do indukcji transformacji nowotworowej komórek linii nie ustalonych [178].

Doświadczenia wykazujące zdolność aktywowanych onkogenów do transformacji nowotworowej komórek linii nie ustalonych przemawiają przeciwko skrajnie sceptycznym sugestiom, które transformację fibroblastów NIH 3T3 próbowały interpretować jako swego rodzaju artefakt w związku z tym, że nie są to komórki normalne. Należy jednak pamiętać, że nawet w przypadku użycia fibroblastów NIH 3T3 próby wykrywania obecności aktywowanych onkogenów w komórkach nowotworowych kończą się niepowodzeniem tzn. brakiem transformacji w około 80–90% [208]. W badaniach materiału pochodzącego od człowieka próby te udały się m.in. w stosunku do: raków (płuc, pęcherza, sutka, trzustki, okrężnicy), białaczki limfatycznej i szpikowej, chłoniaków, mięsaków i neuroblastoma [102].

Wydaje się, że wzrost i różnicowanie się komórek regulowane są przez misterną sieć interakcji wielu czynników. Sieć ta rozciąga się od błony komórkowej do chromatyny jądrowej. Prawdopodobnie onkogeny i kodowane przez nie białka odpowiadają czynnikom sprawującym ważne funkcje na różnych etapach tej regulacji, a zaburzenie jej, w wyniku aktywacji onkogenów, może prowadzić do transformacji nowotworowej komórki [12]. Aktywacja onkogenów prowadzi do jakościowej lub ilościowej zmiany czynności tych genów. Nie można wykluczyć, że aktywacja onkogenów jest wspólnym ogniwem dla wszystkich procesów onkogenezy.

Można przypuszczać, że dla utrzymania proliferacji wymagana jest

obecność czynników wzrostowych, które oddziałują na komórki przez receptory w błonie komórkowej. Receptory z kolei aktywują wewnątrzkomórkowe mediatory, które w efekcie inicjują fazę S cyklu komórkowego. W regulacji tej można więc z dużym uproszczeniem wyróżnić trzy zasadnicze etapy, z których każdy sprowadza się do czynności określonego białka lub białek. Należą do nich: czynnik wzrostowy, receptor błonowy dla czynnika wzrostowego i mediator wewnątrzkomórkowy czynnika wzrostowego. Aktywność każdego z nich podlegać może oczywiście kontroli sprawowanej przez inne czynniki. Onkogeny mogą kodować białka uczestniczące bezpośrednio lub pośrednio w tej regulacji.

LITERATURA

- [1] ABRAMS H. D., ROHRSCHEIDER L. R., EISENMAN R. N., Nuclear localization of the putative transforming protein of avian myelocytomatosis virus, *Cell*, **29**: 427-439, 1982.
- [2] ADAMS J. M., GERONDAKIS S., WEBB E., MITCHELL J., BERNARD O., CORY S., Transcriptionally active DNA region that rearranges frequently in murine lymphoid tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **79**: 6966-6970, 1982.
- [3] ALITALO K., RAMSAY G., BISHOP J. M., PFFIFER S. O., COLBY W. W., LEVINSON A. D., Identification of nuclear protein encoded by viral and cellular myc oncogenes, *Nature*, **306**: 274-277, 1983.
- [4] ALITALO K., SCHWAB M., LIN C. C., VARMUS H. E., BISCHOP J. M., Homogenously staining chromosomal regions contained amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-onc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **80**: 1707-1711, 1983.
- [5] ALITALO K., WINQVIST R., LIN C. C., DE LA CHAPELLE A., SCHWAB M., BISHOP J. M., Aberrant expression of an amplified c-myb oncogene in two cell lines from a colon carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **81**: 4534-4538, 1984.
- [6] ANDERSON S. J., GONDA M. A., RETTENMEIER, C. W., SHERR C. J., Subcellular localization of glycoproteins encoded by the viral oncogene, v-fms, *J. Virol* (w druku).
- [7] ARMELIN H. A., ARMELIN M. C. S., KELLY K., STEWART T., LEDER P., COCHRAN B. H., STILES C. D., Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor, *Nature*, **310**: 655-660, 1984.
- [8] AR-RUSHDI A., NISHIKURA K., ERIKSON J., WATT R., ROVERA G., CROCE C. M., Differential expression of the translocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma, *Science*, **222**: 190-193, 1983.
- [9] BALMAIN A., PRAGNELL I. B., Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene, *Nature*, **303**: 72-74, 1983.
- [10] BERGMANN D. G., SOZA L. M., BALUDA M. A., Vertebrate DNAs contain nucleotide sequences related to the transforming gene of avian myeloblastosis virus, *J. Virol.*, **40**: 4504-4555, 1981.
- [11] BISHOP J. M., Cellular oncogenes and retroviruses, *Ann. Rev. Biochem.*, **52**: 301-354, 1983.

- [12] BISHOP J. M., *Oncogenes, leukemia and differentiation*, [W:] Normal and neoplastic hematopoiesis. UCLA symposia on molecular and cellular biology — New series, Vol. 9, red. D. W. Golde, P. A. Marks, Alan R Liss Inc., New York, 1–30, 1983.
- [13] BLAIR D. G., OSKARSSON M., WOOD T. G., MCCLEMENTS W. L., FISCHINGER P. J., VANDE WOUDE G. F., Activation of transforming potential of a normal cell sequence: a molecular model for oncogenesis, *Science*, **212**: 941–943, 1981.
- [14] BOEHM T. L. J., DRAHOVSKY D., Alteration of enzymatic methylation of DNA cytosines by chemical carcinogens: a mechanism involved in the initiation of carcinogenesis, *J. Natl. Cancer Inst.*, **71**: 429–433, 1983.
- [15] BOLEN J. B., THIELE C. J., ISRAEL M. A., YONEMOTO W., LIPSICH L. A., BRUGGE J. S., Enhancement of cellular src gene product associated tyrosyl kinase activity following polyoma-virus-encoded middle tumor antigen, *Cell*, **38**: 767–777, 1984.
- [16] BOYLE W. J., LIPSICK J. S., REDDY E. P., BALUDA M. A., Identification of the leukemogenic protein of avian myeloblastosis virus and of its normal cellular homologue, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **80**: 2834–2838, 1983.
- [17] BRODEUR G. M., SEEGER R. C., SCHWAB M., VARMUS H. E., BISHOP J. M., Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage, *Science*, **224**: 1121–1124, 1984.
- [18] CAMPISI J., GRAY H. E., PARDEE A. B., DEAN M., SONENSHEIN G. E., Cell-cycle control of c-myc but not c-ras expression is lost following chemical transformation, *Cell*, **36**: 241–247, 1984.
- [19] CAPON D. J., CHEN E. Y. LEVINSON A. D., SEEBURG P. H., GOEDEL D. V., Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue, *Nature*, **302**: 33–37, 1983.
- [20] CAPON D. J., SEEBURG P. H., MCGRATH J. P., HAYFLICK J. S., EDMAN U., LEVINSON A. D., GOEDEL D. V., Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations, *Nature*, **304**: 507–513, 1983.
- [21] CHAGANTI R. S. K., Significance of chromosome change to hematopoietic neoplasms, *Blood*, **62**: 515–524, 1983.
- [22] CHANG E. H., FURTH M. E., SCOLNICK E. M., LOWY D. R., Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus, *Nature*, **294**: 479–483, 1982.
- [23] CHANG E. H., GONDA M. A., ELLIS R. W., SCOLNICK E. M., LOWY D. R., Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **79**: 4848–4852, 1982.
- [24] CHATTOPADHYAY S. K., CHANG E. H., LANDER M. R., ELLIS R. W., SCOLNICK E. M., LOWY D. R., Amplification and rearrangement of oncogenes in mammalian species, *Nature*, **296**: 361–363, 1982.
- [25] CHEN I. S. Y., WILHELMSSEN K. C., TEMIN H. M., Structure and expression of c-rel, the cellular homolog to the oncogene of reticuloendotheliosis virus strain T, *J. Virol.*, **45**: 104–113, 1983.
- [26] CHROBOCZEK J., ZAGÓRSKI W., *Wirusologia molekularna*, PWN, Warszawa, 266–286, 1983.

- [27] CLARKE M. F., WESTIN E., SCHMIDT D., JOSEPHS S. F., RATNER L., WONG-STAAL F., GALLO R. C., REITZ M. S., Transformation of NIH3T3 cells by a human c-sis cDNA clone, *Nature*, **308**: 464–467, 1984.
- [28] COLLETT M. S., ERIKSON R. L., Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus gene product, *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **75**: 2021–2024, 1978.
- [29] COLLINS S., GROUDINE M., Amplification of endogenous myce-related DNA sequences in a human myeloid leukemia cell line, *Nature*, **298**: 679–681, 1982.
- [30] COOPER G. M., Cellular transforming genes, *Science*, **218**: 801–806, 1982.
- [31] — Activation of transforming genes in neoplasms, *Br. J. Cancer*, **50**: 137–142, 1984.
- [32] COOPER C. S., PARK M., BLAIR D. G., TAINSKY M. A., HUEBNER K., CROCE C. M., VANDE WOUDE G. F., Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line, *Nature*, **311**: 29–33, 1984.
- [33] COURTNEIDGE S. A., LEVINSON A., BISHOP J. M., The protein encoded by the transforming gene of avian sarcoma virus (pp60^{src}) and a homologous protein in normal cells (pp60^{proto-src}) are associated with the plasma membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **77**: 3783–3787, 1980.
- [34] CREWS S., BARTH R., HOOD L., PREHN J., CALAME K., Mouse c-myc oncogene is located on chromosome 15 and translocated to chromosome 12 in plasmocytomas, *Science*, **218**: 1319–1321, 1982.
- [35] CURRAN T., Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc, *Nature*, **312**: 716–720, 1984.
- [36] CURRAN T., MILLER A. D., ZOKAS L., VERMA I. M., Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis, *Cell*, **36**: 259–268, 1984.
- [37] CZERNILOFSKY A. P., LEVINSON A. D., VARMUS H. E., BISHOP J. M., TISCHER E., GOODMAN H. M., Nucleotide sequence of the avian sarcoma virus oncogene (SRC) and proposed amino acid sequence for gene product, *Nature*, **287**: 198–203, 1980.
- [38] DALLA-FAVERA R. D., BREGNI R., ERIKSON J., PATTERSON D., GALLÓ R. C., CROCE C. M., Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that translocated in Burkitt lymphoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **79**: 7824–7828, 1982.
- [39] DALLA-FAVERA R. D., GELLMANN E. P., GALLO R. C., WONG-STAAL F., A human onc gene homologous to the transforming gene (v-sis) of simian sarcoma virus, *Nature*, **292**: 31–35, 1981.
- [40] DALLA-FAVERA R. D., GELLMANN E. P., MARTINOTTI S., FRANCHINI G., PAPAS T. K., GALLO R. C., WONG-STAAL F., Cloning and characterization of different human sequences related to the onc gene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus (MC29), *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **79**: 6497–6501, 1982.
- [41] DALLA-FAVERA R. D., MARTINOTTI S., GALLO R. C., Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas, *Science*, **219**: 963–967, 1983.
- [42] DALLA-FAVERA R. D., WONG-STAAL F., GALLO R. C., Onc gene amplification in promyelocytic leukemia cell line HL-60 and primary leukemia cells of the same patient, *Nature*, **299**: 61–63, 1982.
- [43] DAYTON A. I., SELDEN J. R., LAWS G., DORNEY D. J., FINAN J., TRIP-

- PUTI P., EMANUEL D. S., ROVERA G., NOWELL P. C., CROCE C. M., A human c-erb A oncogene homologue is closely proximal to the chromosome 17 breakpoint in acute promyelocytic leukemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **81**: 4495-4499, 1984.
- [44] De KLEIN A., VAN WESSEL A. D., GROSSVELD G., BARTRAM C. R., HAGEMEYER A., BOOTSMA B., SPURR N. K., HEISTERKAMP N., GROFFEN J., STEPHENSON J. R., A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia, *Nature*, **300**: 765-767, 1982.
- [45] DEUEL T. F., HUANG J. S., Platelet-derived growth factor: purification, properties, and biological activities, *Progr. Hematol.*, **13**: 201-221, 1983.
- [46] DIAMOND A., COOPER G. M., RITZ J., LANE M. A., Identification and molecular cloning of the human Blym transforming gene activated in Burkitt lymphomas, *Nature*, **305**: 112-116, 1983.
- [47] DOERFLER W., DNA methylation and gene activity, *Ann. Rev. Biochem.*, **52**: 93-124, 1983.
- [48] DONNER P., GREISER-WILCKE J., MOELLING K., Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product myelocytomatosis virus, *Nature*, **296**: 262-266, 1982.
- [49] DOOLITTLE R. F., HUNKAPILLER M. W., HOOD L. E., DEWARE S. G., ROBBINS K. C., AARONSON S. A., ANTONIADES H. N., Simian sarcoma virus onc gene v-sis is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor, *Science*, **221**: 275-276, 1983.
- [50] DOWNWARD J., YARDEN Y., MAYES E., SCRACE G., TOTTY N., STOCKWELL P., ULLRICH A., SCHLESINGER J., WATERFIELD M. D., Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences, *Nature* **307**: 521-527, 1984.
- [51] DUESBERG P. H., Retroviral transforming genes in normal cells?, *Nature*, **304**: 219-225, 1983.
- [52] DUESBERG P. H., VOGT P. K., Differences between ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **67**: 1673-1680, 1970.
- [53] DULBECCO R., RNA — containing viruses: retroviridae, [W:] *Microbiology*, red. B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsburg, Harper and Row, 1243-1261, 1980.
- [54] DUNNICK W., SCHELL B. E., DERY C., DNA sequences near the site of reciprocal recombination between a c-myc oncogene and an immunoglobulin switch region, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **80**: 7269-7273, 1983.
- [55] ELLIS R. W., DEFEO D., SCOLNICK E. M., SHARP M., *Oncogenes*, *Ann. Rep. Med. Chemistry*, **18**: 225-235, 1983.
- [56] ERIKSON J., AR-RUSHDI A., DRWINGA H. L., NOWELL P. C., CROCE C. M., Transcriptional activation of the translocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **80**: 820-824, 1983.
- [57] ERIKSON J., NISHIKURA K., AR-RUSHDI A., FINAN J., EMANUEL B., LENOIR G., NOWELL P. C., CROCE C. M., Translocation of an immunoglobulin k locus to a region 3' of an rearranged c-myc oncogene enhances c-myc transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **80**: 7581-7585, 1983.
- [58] EVA A., AARONSON S. A., Frequent activation of c-Kis as a transforming gene in fibrosarcomas induced by methylcholanthrene, *Science*, **220**: 955-956, 1983.

- [59] FEINBERG A. P., VOGELSTEIN B., DROLLER M. J., BAYLIN S. B., NELKIN B. D., Mutation affecting the 12th amino acid of the c-Ha-ras oncogene product occurs infrequently in human cancer, *Science*, **220**: 1175-1177, 1983.
- [60] FERAMISCO J. R., GROSS M., KAMATA T., ROSENBERG M., SWEET R. W., Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells, *Cell*, **38**: 109-117, 1984.
- [61] FINKEL T., COOPER G. M., Detection of a molecular complex between ras proteins and transferrin receptor, *Cell*, **36**: 1115-1121, 1984.
- [62] FINKEL T., DER C. J., COOPER G. M., Activation of ras genes in human tumors does not affect localization, modification, or nucleotide binding properties of p21, *Cell*, **37**: 151-158, 1984.
- [63] FOULKES J. G., Phosphotyrosyl-protein phosphatases, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **107**: 163-180, 1983.
- [64] FUNG Y. K. T., LEWIS W. G., CRITTENDEN L. B., KUNG H. J., Activation of the cellular oncogene c-erbB by LTR insertion: molecular basis for induction of erythroblastosis by avian leukosis virus, *Cell*, **33**: 357-368, 1983.
- [65] FRYKBERG L., PALMIERI S., BEUG H., GRAF T., HAYMAN M. J., VENNSTROM B., Transforming capacities of avian erythroblastosis virus mutants deleted in the erbA or erbB oncogenes, *Cell*, **32**: 227-238, 1983.
- [66] GAY N. J., WALKER J. E., Homology between human bladder carcinoma oncogene product and mitochondrial ATPase, *Nature*, **301**: 262-264, 1983.
- [67] GIBBS J., ELLIS R. W., SCOLNICK E. M., Autophosphorylation of v-Ha-ras p21 is modulated by amino acid residue 12, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **81**: 2674-2678, 1984.
- [68] GILMAN A. G., G proteins and dual control of adenylate cyclase, *Cell*, **36**: 577-579, 1984.
- [69] GOFF S. P., BALTIMORE D., [w] *Advances in viral oncology*, Vol. 1, red. G. Klein, Raven, New York, 127-139, 1982.
- [70] GONDA T. J., METCALF D., Expression of myb, myc fos proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukaemia, *Nature*, **310**: 249-251, 1984.
- [71] GORDON J., LEVY S., MELAMED M. D., ENGLISH L. S., HUGHES-JONES N. C., Immortalized B lymphocytes produce B-cell growth factor, *Nature*, **310**: 145-147, 1984.
- [72] GOUBIN G., GOLDMAN D., NICE J., NEUMAN P. E., COOPER G. M., Molecular cloning and nucleotide sequence of a transforming gene detected by transfection of chicken B-cell lymphoma DNA, *Nature*, **302**: 314-319, 1983.
- [73] GOYETTE M., PETROPOULOS C. J., SHANK P. R., FAUSTO N., Expression of a cellular oncogene during liver regeneration, *Science*, **219**: 510-512, 1983.
- [74] GRAVES D. T., OWEN A. J., BARTH R. K., TEMPST P., WINOTO A., FOTS L., HOOD L. E., Detection of c-sis transcripts and synthesis of PDGF-like proteins by human osteosarcoma cells, *Science*, **226**: 972-974, 1984.
- [75] GREENBERG M., E., ZIFF E. B., Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene, *Nature*, **311**: 433-438, 1984.
- [76] GROFFEN J., HEISTERKAMP N., BLENERHASSETT G., STEPHENSON J. R., Regulation of viral and cellular oncogene expression by cytosine methylation, *Virology*, **126**: 213-227, 1983.
- [77] GROFFEN J., HEISTERKAMP N., GROSVELD F., VAN DE VEN W., STE-

- PHENSON J. R., Isolation of human oncogene sequences (v-fes homolog) from a cosmid library, *Science*, **216**: 1136–1138, 1982.
- [78] GUERRERO I., CALZADA P., MAYER A., PELLICER A., A molecular approach to leukemogenesis: Mouse lymphomas contain an activated c-ras oncogene, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **81**: 202–205, 1984.
- [79] GUERRERO I., VILLASANTE A., CORCES V., PELLICER A., Activation of a c-K-ras oncogene by somatic mutation in mouse lymphomas induced by gamma radiation, *Science*, **225**: 1159–1162, 1984.
- [80] HALL A., MARSHALL C., SPURR N., WEISS R. A., Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1, *Nature*, **303**: 396–400, 1983.
- [81] HANAFUSA H., HALPERN C. C., BUCHNAGEN D. C., KAWAI S., Recovery of avian sarcoma virus from tumors induced by transformation-defective mutants, *J. Exp. Med.*, **146**: 1735–1747, 1977.
- [82] HANN S. R., ABRAMS H. D., ROHRSCHEIDER L. R., EISENMAN R. N., Proteins encoded by v-myc and c-myc oncogenes: Identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell lines, *Cell*, **34**: 789–798, 1983.
- [83] HARDY W. D., A new package for an old oncogene, *Nature*, **308**: 775, 1984.
- [84] HARFORD J., An artefact explains the apparent association of the transferrin receptor with a ras gene product, *Nature*, **311**: 673–675, 1984.
- [85] HAYWARD W. S., NEEL B. G., ASTRIN S. M., Activation of a cellular oncogene by promoter insertion in ALV induced lymphoid leukosis, *Nature*, **290**: 475–480, 1981.
- [86] HEHLMAN R., SCHETTERS H., KREEB G., ERFLE V., SCHMIDT J., LUZ A., RNA-tumorviruses, oncogenes, and their possible role in human carcinogenesis, *Klin. Wochenschr.*, **61**: 1217–1231, 1983.
- [87] HELDIN C. H., WESTERMARK B., Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes, *Cell*, **37**: 9–20, 1984.
- [88] HOFFMAN-FALK H., EINAT P., SHILO B. Z., HOFFMANN F. M., *Drosophila melanogaster* DNA clones homologous to vertebrate oncogenes: evidence for a common ancestor to the src and abl genes, *Cell*, **32**: 589–598, 1983.
- [89] HUNTER T., Oncogenes and proto-oncogenes: how do they differ? *J. Natl. Cancer Inst.*, **73**: 773–786, 1984.
- [90] HUNTER T., SEFTON B. M., Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **77**: 1311–1315, 1980.
- [91] JAENISCH R., Endogenous retroviruses, *Cell*, **32**: 5–6, 1983.
- [92] JAKOBOVITS E. B., MAJORS J. E., VARMUS H. E., Hormonal regulation of the Rous sarcoma virus src gene via a heterologous promoter defines a threshold dose for cellular transformation, *Cell*, **38**: 757–765, 1984.
- [93] KAN N. C., FLORDELLIS C. S., MARK G. E., DUESBERG P. H., PAPAS T. S., A common oncogene sequence transduced by avian carcinoma virus MH2 and by murine sarcoma virus 3611, *Science*, **223**: 813–816, 1984.
- [94] KELLY K., COCHRAN B. H., STILES C. D., LEDER P., Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocytic mitogens and platelet-derived growth factor, *Cell*, **35**: 603–610, 1983.
- [95] KLEIN G., The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis, *Nature*, **294**: 313–318, 1981.
- [96] KLEIN G., Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men, *Cell*, **32**: 311–315, 1983.

- [97] KLEIN G., *Opinia cytowana w: Robertson M., Nature, 306, 733, 1983.*
- [98] KLEIN G., KLEIN E., *Oncogene activation and tumor progression, Carcinogenesis, 5: 429-435, 1984.*
- [99] KLEIN G., LINDAHL T., JONDAL M., LEIBOLD W., MENEZES J., NILSSON K., SUNGSTRÖM C., *Continuous lymphoid cell lines with B-cell characteristics that lack the Epstein-Barr virus genome, derived from three human lymphomas, Proc. Natl. Acad. Sci. US. 71: 3283-3286, 1974.*
- [100] KLEMPANAUER K. H., GONDA T. J., BISHOP J. M., *Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene, Cell, 31: 453-463, 1982.*
- [101] KLEMPANAUER K. H., SYMONDS G., EVAN G. I., BISHOP J. M., *Subcellular localization of proteins encoded by oncogenes of avian myeloblastosis virus and avian leukemia virus E26 and by the chicken c-myb gene, Cell, 37: 537-547, 1984.*
- [102] KRONTIRIS T. G., *The emerging genetics of human cancer, N. Engl. J. Med., 309: 404-409, 1983.*
- [103] LAND H., PARADA L. F., WEINBERG R. A., *Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes, Nature, 304: 596-602, 1983.*
- [104] LANE M. A., SAINTEN A., COOPER G. M., *Stage-specific transforming genes of human and mouse B- and T-lymphocyte neoplasms, Cell, 28: 873-880, 1982.*
- [105] LEE W. H., MURPHREE A. L., BENEDICT W. F., *Expression and amplification of N-myc gene in primary retinoblastoma, Nature, 309: 458-460, 1984.*
- [106] LENOIR G. M., PREUD'HOMME J. L. BERNHAIM A., BERGER A., *Correlation between immunoglobulin light chain expression and variant translocation in Burkitt's lymphoma, Nature,, 298: 474-476, 1982.*
- [107] MACARIA I. G., MARINETTI G. N., BALDUZZI P. C., *Transforming proteins of avian sarcoma virus UR2 is associated with phosphatidylinositol kinase activity: Possible role in tumorigenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 81: 2728-2732, 1984.*
- [108] MAKINO R., HAYASHI K., SUGIMURA T., *C-myc transcript is induced in rat liver at a very early stage of regeneration or by cycloheximide treatment, Nature, 310: 697-698, 1984.*
- [109] MARCU K. B., HARRIS L. J., STANTON L. W., ERIKSON J., WATT R., CROCE C. M., *Transcriptionally active c-myc oncogene is contained within NIARD, a DNA sequence associated with chromosome translocations in B-cell neoplasia, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 80: 519-523, 1983.*
- [110] MARSHALL C. J., VOUSDEN K. H., *Activation of c-Ha-ras-1 proto-oncogene by in vitro modification with a chemical carcinogen benzo(a)pyrene diol-epoxide, Nature 310: 586-589, 1984.*
- [111] MARTIN G. S., *Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state, Nature, 227: 1021-1023, 1970.*
- [112] MARX J. L., *Immunoglobulin genes have enhancers, Science, 221: 735-737, 1983.*
- [113] — *New oncogene targets?, Science, 224: 272, 1984.*
- [114] — *A new view of receptor action, Science, 224: 271-274, 1984.*
- [115] — *The N-myc oncogene in neural tumors, Science, 224: 1088, 1984.*
- [116] MCCOY M., TOOLE J. T., CUNNIGHAM J. M., CHANG E. H., LOWY D. R.,

- WEINBERG R. A., Characterization of a human colon/lung carcinoma oncogene, *Nature*, **302**: 79-81, 1983.
- [117] MCGRATH J. P., CAPON D. J., GOEDEL D. V., LEVINSON A. D., Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein, *Nature*, **310**: 644-649, 1984.
- [118] MCGRATH J. P., CAPON D. J., SMITH D., CHEN E. Y., SEEBURG P. H., GOEDEL D. V., LEVINSON A. D., Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene, *Nature*, **304**: 501-506, 1983.
- [119] MERCOLA M., WANG X. F., OLSEN J., CALAME K., Transcriptional enhancer elements in the mouse immunoglobulin heavy chain locus, *Science*, **221**: 663-665, 1983.
- [120] MEYER G., NICOLI J., Cancers, oncogénèse and oncogènes, *Bull. Cancer*, **70**: 151-159, 1983.
- [121] MITELMAN F., Cytogenetics of experimental neoplasms and non-random chromosome correlations in man, *Clin. Hematol.*, **9**: 195, 1980.
- [122] MOELLING K., HEIMANN B., BEIMLING P., RAPP V. R., SANDER T., Serine- and treonine-specific protein kinase activities of purified gag-mil and gag-raf proteins. *Nature*, **312**: 558-561, 1984.
- [123] MÖLLIG K., DONNER P., BUNTE T., GREISER-WILKE I., Molecular mechanisms of malignant transformation by oncornaviruses, *Contr. Oncol.*, **19**: 35-43, 1984.
- [124] MURPHREE A. L., BENEDICT W. F., Retinoblastoma: clues to human oncogenesis, *Science*, **223**: 1028-1033, 1984.
- [125] MURRAY M. J., CUNNINGHAM J. M., PARADA L. F., DAUTRY F., LEBOWITZ P., WEINBERG R. F., The HL-60 transforming sequence: a ras oncogene coexisting with altered myc genes in hematopoietic tumors, *Cell*, **33**: 749-757, 1983.
- [126] MÜLLER R., Differential expression of cellular oncogenes during murine development and in teratocarcinoma cell lines, *Cold Spring Harbor conf. cell proliferation*, vol. 10 (w druku).
- [127] MÜLLER R., VERMA I. M., ADAMSON E. D., Expression of c-onc genes: c-fos transcripts accumulate to high levels during development of mouse placenta, yolk sac, and amnion, *EMBO Journal*, **5**: 679-684, 1983.
- [128] MÜLLER R., WAGNER E. F., Differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells after transfer of c-fos proto-oncogenes, *Nature*, **311**: 438-442 1984.
- [129] NEUBERGER M. S., CALABI F., Reciprocal chromosome translocation between c-myc and immunoglobulin y2b genes, *Nature*, **305**: 240-243, 1983.
- [130] NEWBOLD R. F., Mutant ras proteins and cell transformation, *Nature*, **310**: 628-629, 1984.
- [131] NEWBOLD R. F., OVERELL R. W., Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene, *Nature*, **304**: 648-651, 1983.
- [132] NISHIKURA K., AR-RUSHIDI A., ERIKSON J., WATT R., ROVERA G., CROCE C. M., Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogenes in B-cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **80**: 4822-4826, 1983.
- [133] NISHIZUKA Y., The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion, *Nature*, **308**: 693-698, 1984.
- [134] NORTH G., Gene regulation, *Nature*, **308**: 688, 1984.
- [135] NOWELL P., FINAN J., ERIKSON J., CROCE C., Chromosome translocata-

- tions, oncogene activation, and B-cell lymphomas, [w] Normal and Neoplastic Hematopoiesis, UCLA symposia on molecular and cellular biology — New series, Vol. 9, red. D. W. Golde, P. A. Marks, Alan R. Liss, Inc., New York, 31–55, 1983.
- [136] OHNO S., YAZAKI A., Simple construction of human c-myc gene implicated in B-cell neoplasmas and its relationship with avian v-myc and human lymphokines, *Scand. J. Immunol.*, **18**: 373–388, 1983.
- [137] ONIONS D. E., LESS G., JARRETT O., Transduction and rearrangement of the myc gene by feline leukaemia virus in naturally occurring T-cell leukaemias, *Nature*, **308**: 814–820, 1984.
- [138] OWEN A. J., PANTAZIS P., ANTONIADES H. N., Simian sarcoma virus-transformed cells secrete a mitogen identical to platelet-derived growth factor, *Science*, **225**: 54–56, 1984.
- [139] PAPKOFF J., NIGG E. A., HUNTER T., The transforming protein of Moloney murine leukemia virus is a soluble cytoplasmic protein, *Cell*, **33**: 161–172, 1983.
- [140] PAYNE G. S., BISHOP J. M., VARMUS H. E., Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas, *Nature*, **295**: 209–214, 1982.
- [141] PELICCI P. G., LANFRANCONE L., BRATHWAITE M. D., WOLMAN S. R., DALLA-FAVERA R., Amplification of the c-myc oncogene in a case of human acute myelogenous leukemia, *Science*, **224**: 1117–1121, 1984.
- [142] PERRY R. P., Consequences of myc invasion of immunoglobulin loci: facts and speculation, *Cell*, **33**: 647–649, 1983.
- [143] PERSSON H., HENNINGHAUSEN L., TAUB R., DEGRADO W., LEDER P., Antibodies to human c-myc oncogene product: evidence of an evolutionarily conserved protein induced during cell proliferation, *Science*, **225**: 687–693, 1984.
- [144] PFEIFER-OHLSSON S., GOUSTIN A. S., RYDNERT J., WAHLSTRÖM T., BJERSING L., STEHELIN D., OHLSSON R., Spatial and temporal pattern of cellular myc oncogene expression in developing human placenta: implications for embryonic cell proliferation, *Cell*, **38**: 585–596, 1984.
- [145] PRIVALSKY M. L., SEALY L., BISHOP J. M., MCGRATH J. P., LEVINSON A. D., The product of the avian erythroblastosis virus erbB locus is a glycoprotein, *Cell*, **32**: 1257–1267, 1983.
- [146] RABBITTS T. H., FORSTER A., BEAR R., HAMLIN R. H., Transcription enhancer identified near the human C γ immunoglobulin heavy chain gene is unavailable to the translocated c-myc gene in a Burkitt lymphoma, *Nature*, **306**: 806–809, 1983.
- [147] RABBITTS T. H., FORSTER A., HAMLIN P., BAER R., Effect of somatic mutation within translocated c-myc genes in Burkitt's lymphoma, *Nature*, **309**: 592–597, 1984.
- [148] RALSTON R., BISHOP J. M., The protein products of the myc and myb oncogenes and adenovirus Ela are structurally related, *Nature*, **306**: 803–806, 1983.
- [149] RECHAVI G., GIVOL D., CANAANI E., Activation of a cellular oncogene by DNA rearrangement: possible involvement of an IS-like element, *Nature*, **300**: 607–611, 1982.
- [150] REDDY E. P., Nucleotide sequence analysis of the T24 human bladder carcinoma oncogene, *Science*, **220**: 1061–1063, 1983.
- [151] REDDY E. P., REYNOLD R. K., SANTOS E., BARBACID M., A point mu-

- tation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene, *Nature*, **300**: 149-152, 1982.
- [152] RIGGS A. D., JONES P. A., 5-methylcytosine, gene regulation and cancer, *Adv. Cancer Res.*, **40**: 1-30, 1983.
- [153] ROBERTSON M., Progress in malignancy, *Nature*, **309**: 512-513, 1984.
- [154] ROHRSCHEIDER L. R., Adhesion plaques of Rous sarcoma virus-transformed cells contain the src gene product, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **77**: 3514-3518, 1980.
- [155] ROSENTHAL N., KREN M., GRUSS P., KHOURY G., BK viral enhancer element and a human cellular homolog, *Science*, **222**: 749-755, 1983.
- [156] ROWLEY J. D., Human oncogene locations and chromosomal aberrations, *Nature*, **301**: 290-291, 1983.
- [157] RULEY E. H., Adenovirus early region IA enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture, *Nature*, **304**: 602-606, 1983.
- [158] SANTOS E., REDDY E. P., PULCIANI S., FELDMANN R., BARBACID M., Spontaneous activation of a human proto-oncogene, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **80**: 4679-4683, 1983.
- [159] SCHECHTER A. L., STERN D. F., VAIDYANATHAN L., DECKER S. J., DREBIN J. A., GREENE M. I., WEINBERG R. A., The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen, *Nature*, **312**: 513-516, 1984.
- [160] SCHIMKE R. T., KAUFMAN R. J., ALT F. W., KELLEMS R. F., Gene amplification and drug resistance in cultured murine cells, *Science*, **202**: 1051-1055, 1978.
- [161] SCHWAB M., ALITALO K., VARMUS H. E., BISHOP J. M., GEORGE D., A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed and located within karyotype abnormalities in mouse adenocortical tumor cells, *Nature*, **303**: 497-501, 1983.
- [162] SCHWAB M., ELLISON J., BUSCH M., ROSENAU W., VARMUS H. E., BISHOP J. M., Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **81**: 4940-4944, 1984.
- [163] SCHWAB M., VARMUS H. E., BISHOP J. M., GRZESCHLIK K. H., NAYLOR S. L., SAKAGUCHI A. Y., BRODECUR G., TRENT J., Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc, *Nature*, **308**: 288-291, 1984.
- [164] SCHWARTZ D. E., TIZARD R., GILBERT W., Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus, *Cell*, **32**: 853-869, 1983.
- [165] SEEBURG P. H., COLBY W. W., CAPON D. J., GOEDDEL D. V., Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12, *Nature*, **312**: 71-75, 1984.
- [166] SEFTON B. M., HUNTER T., BALL E. H., SINGER S. J., Vinculin: A cytoskeletal target of the transforming protein of Rous sarcoma virus, *Cell*, **24**: 165-174, 1981.
- [167] SEIKI M., HATTORI S., HIRAYAMA Y., YOSHIDA M., Human adult T-cell leukemia virus complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemic cell DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **80**: 3618-3622, 1983.
- [168] SHEN-ONG G. L., KEATH E. J., PICCOLI S. P., COLE M. D., Novel myc

- oncogene RNA from abortive immunoglobulin gene recombination in mouse plasmacytomas, *Cell*, **31**: 443-452, 1982.
- [169] SHIH T. Y., PAPAGEORGE A. G., STOKES P. E., WEEKS M. O., SCOLNICK E. M., Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21 src of Harvey murine sarcoma virus, *Nature*, **287**: 686-691, 1980.
- [170] SHILO B. Z., WEINBERG R. A., DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **78**: 6798-6792, 1981.
- [171] SHIMIZU K., BIRNBAUM D., RULEY M. A., FASANO O. SUARD Y., EDLUND L., TAPAROWSKY E., GOLDFARB M., WIGLER M., Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1, *Nature*, **304**: 497-500, 1983.
- [172] SHIMIZU K., GOLDFARB M., PERUCHO M., WIGLER M., Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **80**: 383-387, 1983.
- [173] SIMON M. C., SMITH R. E., HAYWARD W. S., Mechanisms of oncogenesis by subgroup F avian leukosis viruses, *J. Virol.*, **52**: 1-8, 1984.
- [174] SLAMON D. J., DE KERION J. B., VERMA I. M., CLINE M. J., Expression of cellular oncogenes in human malignancies, *Science*, **224**: 256-262, 1984.
- [175] SMART J. E., OPPERMAN H., CZERNILOFSKY A. P., PURCHIO A. F., ERIKSON R. R., BISHOP J. M., Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60^{v-src}) and its normal cellular homologue (pp60^{c-src}), *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **78**: 6013-6017, 1981.
- [176] SODROSKI J. G., ROSEN C. A., HASELTINE W. A., Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeats of human T lymphotropic virus in infected cells, *Science*, **225**: 381-385, 1984.
- [177] SORGE L. K., LEVY B. T., MANESS P. F., pp60^{c-src} is developmentally regulated in the neural retina, *Cell*, **36**: 249-257, 1984.
- [178] SPANDIDOS D. A., WILKIE N. M., Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene, *Nature*, **310**, 469-475, 1984.
- [179] SPECTOR D. H., VARMUS H. E., BISHOP J. M., Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **75**: 4102-4106, 1978.
- [180] STACEY D. W., KUNG H. F., Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein, *Nature*, **310**: 508-511, 1984.
- [181] STANTON L. W., WATT R., MARCU K. B., Translocation breakage and truncated transcripts of c-myc oncogene in murine plasmacytomas, *Nature*, **303**: 401-406, 1983.
- [182] STANTON L. W., YANG J. Q., ECKHARDT L. A., HARRIS L. J., BIRSHTEIN B. K., MARCU K. B., Products of a reciprocal chromosome translocation involving the c-myc in a murine plasmacytoma, *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, **81**: 829-833, 1984.
- [183] STEHELIN D., VARMUS H. E., BISHOP J. M., VOGT P. K., DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA, *Nature*, **260**: 170-173, 1976.
- [184] STEWART T. A., BELLVÉ A. R., LEDER P., Transcription and promoter

- usage of the myc gene in normal somatic and spermatogenic cells, *Science*, **226**: 707-710, 1984.
- [185] STEWART T. A., PATTENGALE P. K., LEDER P., Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes, *Cell*, **38**: 627-637, 1984.
- [186] STILES C. D., The molecular biology of platelet-derived growth factor, *Cell*, **33**: 653-655, 1983.
- [187] SUGIMOTO Y., WHITMAN M., CANTLEY L. C., ERIKSON R. L., Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **81**: 2117-2121, 1984.
- [188] SUKUMAR S., NOTARIO V., MARTIN-ZANCA D., BARBACID M., Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations, *Nature*, **306**: 658-661, 1983.
- [189] SUKUMAR S., PULCIANI S., DONIGER J., DIPAOLO J. A., EVANS C. H., ZBAR B., BARBACID M., A transforming ras gene in tumorigenic guinea pig cell lines initiated by diverse chemical carcinogens, *Science*, **223**: 1197-1199, 1984.
- [190] SWEET R. W., YOKOYAMA S., KAMATA T., FERAMISCO J. M., ROSENBERG M., GROSS M., The product of ras is a GTPase and the T24 oncogene mutant is deficient in this activity, *Nature*, **311**: 273-275, 1984.
- [191] TABIN C. J., BRADLEY S. M., BARGMANN C. I., WEINBERG R. A., PAPA-GEORE A. G., SCOLNICK A. M., Mechanism of activation of a human oncogene, *Nature*, **300**: 143-149, 1982.
- [192] TAKEYA T., HANAFUSA H., Structure and sequence of the cellular gene homologous to the RSV src gene and the mechanism for generating the transforming virus, *Cell*, **32**: 881-890, 1983.
- [193] TAPAROWSKY E., SHIMIZU K., GOLDFARB M., WIGLER M., Structure and activation of the human N-ras gene, *Cell*, **34**: 581-586, 1983.
- [194] TAPAROWSKY E., SUARD Y., FASANO O., SHIMIZU K., GOLDFARB M., WIGLER M., Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change, *Nature*, **300**: 762-765, 1982.
- [195] TAUB R., KIRSCH I., MORTON C., LENOIR G., SWAN D., TRONICK S., AARONSON S., LEDER P., Translocation of the c-myc gene into immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **79**: 7837-7841, 1982.
- [196] TODARO G. J., MARQUARDT H., TWARDZIK D. R., REYNOLDS F. H., STEPHENSON J. R., Transforming growth factors produced by viral-transformed and human tumor cells, [w:] *Biological responses in cancer*, vol. 2, red. E. Mihich, Plenum Publishing Corporation, 1-18, 1984.
- [197] TWARDZIK D. R., TODARO G. J., MARQUARDT H., REYNOLDS F. H., STEPHENSON J. R., Transformation induced by Abelson murine leukemia virus involves production of a polypeptide growth factor, *Science*, **216**: 894-897, 1982.
- [198] VARMUS H. E., Form and function of retroviral proviruses, *Science*, **216**: 812-820, 1982.
- [199] VENNSTROM B., BISHOP J. M., Isolation and characterization of chicken DNA homologous to the two putative oncogenes of avian erythroblastosis virus, *Cell*, **28**: 135-143, 1982.

- [200] VERMA I. M., From c-fos to v-fos, *Nature*, **308**: 317, 1984.
- [201] WANG J. Y. J., From c-abl to v-abl, *Nature*, **304**: 400, 1983.
- [202] WANG J. Y. J., LEDLEY F., GOFF S., LEE R., GRONER Y., BALTIMORE D., The molecular c-abl locus: molecular cloning and characterization, *Cell*, **36**: 349-356, 1984.
- [203] WATERFIELD M. D., SCRACE G. T., WHITTLE N., STROOBANT P., JOHNSON A., WASTESON A., WESTERMARK B., HELDIN C. H., HUANG J. S., DENEL T. F., Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28^{sis} of simian sarcoma virus, *Nature*, **304**: 35-39, 1983.
- [204] WATSON R., OSKARSSON M., VANDE WOUDE G. F., Human DNA sequence homologous to the transforming gene (mos) of Moloney murine sarcoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **79**: 4078-4082, 1982.
- [205] WATT R., STANTON L. W., MARCU K. B., GALLO R. C., CROCE C. M., ROVERA G., Nucleotide sequence of cloned cDNA of human c-myc oncogene, *Nature*, **303**: 725-728, 1983.
- [206] WESTAWAY D., PAYNE G., VARMUS H. E., Proviral deletions and oncogene base substitutions in insertionally mutagenised c-myc alleles may contribute to the progression of avian bursal tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **81**: 843-847, 1984.
- [207] WIERENGA R. K., HOL W. G. J., Predicted nucleotide-binding properties of p21 protein and its cancer-associated variant, *Nature*, **302**: 842-844, 1983.
- [208] WILLECKE K., SCHÄFER R., Human oncogenes, *Hum. Genet.*, **66**: 132-142, 1984.
- [209] WILSON V. L., JONES P. A., Inhibition of DNA methylation by chemical carcinogens in vitro, *Cell*, **32**: 239-246, 1983.
- [210] WYKE J., From c-src to v-src, *Nature*, **304**: 491-492, 1983.
- [211] YUASA Y., SRIVASTAVA S. K., DUNN C. Y., RHIM J. S., REDDY E., AARONSON S.A., Acquisition of transforming properties by alternative point mutations within c-bas/has human proto-oncogene, *Nature*, **303**: 775-779, 1983.
- [212] YUNIS J. J., The chromosomal basis of human neoplasia, *Science*, **221**: 227-236, 1983.
- [213] YUNIS J. J., OKEN M. M., KAPLAN M. E., ENSURD K. M., HOWE R. H., THEOLOGIDES A., Distinctive chromosome abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma, *N. Engl. J. Med.*, **307**: 1231-1236, 1982.

Otrzymano: 18.02.1985.

Przyjęto: 20.06.1985.

Adres: Zakład Transplantologii I.B., ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa.

ICLA

BULLETIN

Issued every March and September

by the

International Committee

on

Laboratory Animals

NO. 42 MARCH 1978

Didriksens Papirindustri A/S

<http://rcin.org.pl>

ICLA RECOMMENDATIONS FOR THE SPECIFICATION OF THE ANIMALS, THE HUSBANDRY, AND THE TECHNIQUES USED IN ANIMAL EXPERIMENTATION

The ICLA Governing Board has approved the following recommendations prepared by a working party consisting of:

Professor Dr. Dr. A. Spiegel,	chairman, F.R.G.
Dr. S. Erichsen,	ICLA Secretary, Norway
Dr. H. Heinecke,	G. D. R.
Dr. R. Loosli,	Switzerland

The Board urges that the Recommendations be brought to the notice of animal users, as well as authors and editors of scientific papers, journals and publications of any type. The assistance of all ICLA Members in achieving this goal would be appreciated.

Recent studies (Davis 1973, Lang and Vessel 1976) have shown that too many scientific papers do not give adequate information on the animals that were used, and on husbandry and experimental techniques. Yet such information is considered indispensable for correct and optimal interpretation of the experimental results, and a prerequisite for repetition of the experiments by other investigators.

ICLA therefore recommends that editors of scientific journals request authors of papers concerning animal tests to provide particulars on the following items as far as applicable:

I. *Animals*

1. Identification and genetics

Origin or supplier

Species; breed or race, strain (inbred), stock (outbred) or hybrid, mutations or hereditary conditions.

2. Physiological state

Age, sex, weight

3. Hygienic state

Control measures: handling routines, filter cage tops, ventilated cage racks, barrier system, isolator type, specification of pathogens proved absent, gnotobiotic status.

II. *Housing and care*

building: room size, conventional or barrier, isolator type.

Physical conditions:

temperature °C ±, humidity % ±

air changes per hour

light: artificial or natural, controlled cycles or natural

cages: model, or dimension and material

bedding: type, changing schedule, sterilization

III. *Diet and feeding*

diet: commercial source, composition, sterilization procedure

feeding schedule: ad libitum, quantity/animal (or kg body weight)/day

water: chemical or physical sterilization
watering regime: automatic, bottles, with changing schedule

IV. *Experimental set up*

transportation, adaptation time

method of grouping: chance, random procedure, selection, number of animals per cage, sex distribution.

pretreatment or/and prophylactic/therapeutic treatment during the experiment:

conditioning, vaccination, premedication, surgical preparation

experimental treatment: dose rate, route and place of administration, size of transplant, number of cells,

treatment time, schedule of repetitions, handling time, circadian rhythm, cleaning schedule, season, sound level, source of sounds

controls: regular: administration of solvent or vehicle; operation

negative: untreated, or treated with known non-agent

positive: treatment with standard agent recording schedule

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie 400 zł, półrocznie 200 zł

Prenumeratę na kraj przyjmuje się:

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

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

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

Prenumeratę 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

K. E. PIROG, Komórkowe mechanizmy patogenezy miażdżycy	163
T. SKÓRSKI, Rola makrofażów, monocytów i granulocy- tów w zwalczaniu nowotworów	185
A. WOŻNY, Struktura i subultrastruktura chloroplas- tów granowych	205
J. STRZEŻEK, J. TORSKA, Akrosyna plemników i jej inhibitory — właściwości biochemiczne oraz funkcja w procesach rozrodu zwierząt	263
M. JAKÓBISIAK, Onkogeny	289