

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

TOM 14-NR 2

1987 (49-130)

Postępy Biologii Komórki

PWN WARSZAWA-WROCŁAW

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

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

Rada Redakcyjna

Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA,
Leszek KUŹNICKI, Zofia OSUCHOWSKA — przewodnicząca,
Aleksandra PRZEŁĘCKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

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

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział Wrocławski

Nakład 560 + 90 egz. Ark. wyd. 6,25. Ark. druk. 5 $\frac{1}{8}$. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100 cm.
Oddano do składania 28 I 1987 r. Podpisano do druku w czerwcu 1987 r. Druk ukończono
w lipcu 1987. Zam. 78/87. Cena 140 zł.

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

25 LAT POLSKIEGO TOWARZYSTWA HISTOCHEMIKÓW I CYTOCHEMIKÓW *

THE 25TH ANNIVERSARY
OF THE POLISH HISTOCHEMICAL AND CYTOCHEMICAL SOCIETY

Józef NIWELIŃSKI

Streszczenie. Dokonując historycznego przeglądu rozwoju histochemii w Polsce w 25 rocznicę powstania Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, wypada stwierdzić, że szedł on w parze z ogólnoeuropejskim rozwojem nauk przyrodniczych. Poczynając od XIII w., znajdujemy dane o produkcji barwników w Polsce, a w XVIII w. — dane o analizie chemicznej tkanek roślin i zwierząt. Na szczególną uwagę zasługuje aktywność histochemików polskich w latach 1918 - 1939. Przypomnieć tu należy nazwiska Mieczysława i Bronisławy Konopackich (cytochemia jaj i zarodków płazów), Stanisława Hillera, Stefana Bagińskiego i Jana Kruszyńskiego (histochemia regeneracji u płazów, spodografia), Tadeusza Kurkiewicza (histochemia rdzenia nadnercza i wykrywania adrenaliny), Zygmunta Szantracha (histochemia zarodków ssaków), Stanisława Skowrona (luminescencja zwierząt morskich), Jadwigi Ackermann (metabolizm lecytyny), Zygmunta Grodzińskiego (cytochemia żółtka jaj ptaków) i wielu innych.

Odrodzenie histochemii po II wojnie było rezultatem niestrudzonej działalności prof. Henryka Godlewskiego, który utworzył najpierw Sekcję Histochemiczną Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, ta zaś w 1961 r. została przekształcona w samodzielne Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików dysponujące własnym organem „Folia Histochemica et Cytochemica”. Towarzystwo to rozwija żywą aktywność naukową i utrzymuje łączność z zagranicą. Jego fundamentem jest pogląd, że histochemia jako narzędzie poznania wiecznie zmiennej i ewoluującej materii żywej nigdy nie utraci swego znaczenia.

Summary. On the occasion of the 25th Anniversary of the creation of the Polish Histochemical and Cytochemical Society a short historical survey of the development of Polish histochemistry is given. Starting from the XIIIth century data of dye production in Poland and in the XVIIIth century those of chemical analyses of plant and animal tissues are found. A noteworthy activity was developed in

* Przemówienie wygłoszone 20 IX 1986 w Sali Nowodworskiej Akademii Medycznej im. M. Kopernika w Krakowie na sesji poświęconej jubileuszowi 25-lecia Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików.

pre-war Poland by numerous Polish histochemists: Bronisława and Mieczysław Konopacki (cytochemistry of anuran eggs and embryos), Stanisław Hiller with Stefan Bagiński and Jan Kruszyński (histochemistry of regeneration in *Anura*, spodography), Tadeusz Kurkiewicz (histochemistry of adrenal medulla, detection of adrenaline), Zygmunt Szantroch (histochemistry of mammalian embryos), Stanisław Skowron (luminescence in marine animals), Jadwiga Ackermann (lecithin metabolism in mammalian tissues), Zygmunt Grodziński (studies on avian yolk) and many others.

The post-war revival of Polish histochemistry was brought about by indefatigable efforts of Professor Henryk Godlewski who at first created the Histochemical Section of the Polish Anatomical Society. This in 1961 became the independent Polish Histochemical and Cytochemical Society with "Folia Histochemica et Cytochemica" as its organ. The Society develops a vivid activity and sustains contacts with foreign histochemical centres. Its fundamental creed says that, owing to the ever-changing character and evolution of living matter, histochemistry will never lose its importance.

Histochemia polska, której jubileusz święci dzisiaj Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików, stanowi rozdział, i to poważny, dziejów kultury i nauki światowej, a jej początki tym samym kryją się przed naszymi oczyma w dalekiej przeszłości. John Locke, angielski filozof-empiryk z XVII w., w swych rozważaniach dotyczących genezy wiedzy ludzkiej pisał: „Jakież cuda odkryłby ten, kto mógłby dostosować swe oczy do wszelkiego rodzaju przedmiotów, aby widzieć, gdyby zechciał, postać i ruch nikłych cząsteczek w krwi i innych sokach zwierząt równie dokładnie, jak w innych wypadkach widzi postać i ruch samych zwierząt”. Ta wypracowana wyobraźnia, wybiegająca w przyszłość myśl filozofa zawiera ideę przewodnią histo- i cytochemii, gałęzi nauk biologicznych zespalającej naukę o tkankach i komórkach z chemią, w szczególności biochemią, a więc jak tego pragnął Locke, łączącej postać z ruchem, strukturę z jej funkcją.

Idea histochemii, jak widzimy, nie jest nowa, a jej źródła są tożsame ze źródłami nauk przyrodniczych, które uprawiały i rozwijały już starożytne cywilizacje. Istotny dla powstania histochemii był z jednej strony wynalazek mikroskopu, który umożliwiał identyfikację komórek i tkanek, z drugiej zaś postęp nauk chemicznych na przestrzeni wieków, z wolna się wyłaniających z alchemii. Anglosasi, których ojczyzna od przeszło 900 lat nie zaznała najazdu militarnego, a przeto dysponują doskonałą ciągłością dokumentacji historii rozwoju nauki własnej, podają (opieram się na dziele G. Clarka i F. Kastena „History of Staining”, 1983), iż pierwszy syntetyczny barwnik został sporządzony w XIII w. Za pierwsze barwienie o charakterze histologiczno-histochemicznym zostało uznane opisane przez Roberta Hooke’a w jego „Mikrografii” z dawien dawna stosowane farbowanie wełny.

Nasz kraj, pustoszony od zarania dziejów najazdami z wszystkich możliwych stron świata, tak dobrej dokumentacji mieć nie może, niemniej wypada tu wspomnieć o również z XIII w. pochodzącym, najdawniejszym znanym polskim alchemiku Mikołaju z Polski (Nicolaus de Polonia), zaprzyjaźnionym z Albertem Wielkim dominikaninem, lekarzu nadwornym Leszka Czarnego i autorze dzieła pt. „Experimenta”, gdzie wśród opisów i recept tajemnych mieszanin i tinktur, jak chce historyk chemii polskiej prof. W. Hubicki, były metody wytwarzania barwników, będących obok metali szlachetnych jednym z celów działań alchemicznych. Należy pamiętać, że dominikanie właśnie najintensywniej zajmowali się alchemią i utrzymywali żywą łączność z kulturą arabską. O żywych tradycjach alchemiczno-chemicznych w Polsce świadczy utrwalenie się u nas w XV - XVI w. zawodu alchimisty, producenta różnych użytecznych substancji chemicznych, także właśnie barwników. W r. 1597 dwaj szlachcice polscy Cikowski i Niegoszewski uzyskali królewski patent chemiczny na produkcję czerwonego barwnika z czerwca.

W czasach Komisji Edukacji Narodowej, by już tylko najważniejsze indywidualności i fakty polskiej chemii wymienić, działał w Polsce Jan Jaśkiewicz, dr medycyny, przyrodnik, członek Królewskiej Akademii Nauk w Paryżu, kierownik Katedry Historii Naturalnej, Chemii i Botaniki w Szkole Głównej Koronnej, dzisiejszym Uniwersytecie Jagiellońskim. Niestety, nie dochowały się do naszych czasów dzieła i prace naukowe Jaśkiewicza i jego współpracowników, istnieją dowody, że spłonęły one w czasie Powstania Warszawskiego. Niemniej z zachowanego programu jego wykładów wynika, że (cytuję dosłownie) „części zwierząt przez rozkład chemiczny doświadczane będą... Nakoniec w lekcjach botaniki nastąpi tłumaczenie wydziału roślin... przyłączając rozkład chemiczny tych ciał”. Trudno zaprzeczyć, że wysoko przez Jędrzeja Śniadeckiego oceniony Jaśkiewicz był polskim prekursorem zarówno biochemii, jak i histochemii.

Epoka Jaśkiewicza i Śniadeckiego, jak wiemy, to już początki współczesnego nam rozwoju i rozkwitu nauk przyrodniczych, to czasy Lavoisiera, Priestleya i Scheelego, w naukach biologicznych Spallanzanego, Buffona, Lamarcka, K. F. Wolffa i wielu innych badaczy. Na gruncie przygotowanym przez postępy chemii rozwijały się myśli badawcze biologów-morfologów i w tym współdziałaniu obu dyscyplin należy upatrywać narodzin histochemii. Pierwotnie działała ona w ramach biochemii i ten jej kierunek, jak podaje Pearse, utrwalił się na czas długi. Ostatecznie jednak Franciszek Wincenty Raspail, z wykształcenia farmaceuta o szerokich zamiłowaniach biologiczno-medycznych, po raz pierwszy w historii zrealizował we Francji badanie chemiczne nie zniszczonej, nie zdeformowanej tkanki. Dzieło Raspaila zaliczano pierwotnie do mikro-

chemii. Monografia jego „Essai de Chimie Microscopique Appliquée à la Physiologie” ukazała się w 1830 r., a więc w dobie w Polsce dla spraw nauki bardzo niekorzystnej. Nie łudźmy się jednak i nie smućmy, że w tym czasie na polu histochemii nie działali Polacy. Za mało o tym wiemy. Sądzę, że w tym zakresie mamy niejedno do odkrycia i do przypomnienia. Uzasadniając to, pozwolę sobie przypomnieć, że współczesne nam niemal odkrycie charłactwa przysadkowego (cachexia hypophysaria) przez Konrada Glińskiego w r. 1913 zupełnie uszło uwagi Polaków, aż dzieło Glińskiego w r. 1951 przypomniał nam brytyjski autor Douglas Robertson. Jednakże w międzyczasie w r. 1923 charłactwo to opisał hamburski lekarz Simmonds i pod jego to nazwiskiem choroba ta znana jest światu. Histochemia polska czeka więc na swych historyków.

W w. XIX, w prądzie wielkich wydarzeń nauk biologicznych i medycznych, niektóre osiągnięcia biochemii są właściwie osiągnięciami histochemii, jak choćby słynne odkrycie kwasów nukleinowych w leukocytach przez Mieschera, badania Sachsa i Emila Godlewskiego sen. nad chemią chloroplastów w ramach studiów nad fotosyntezą, badania Willstättera nad karotenoidami chloroplastów. Ducha tej epoki oddał Claude Bernard pisząc: „Gdyby mi wypadło zrobić porównanie obrazujące mój stosunek wewnętrzny do nauki o życiu, to powiedziałbym, że jest ona wytworną, z blasków tęczywych utkaną komnatą, do której prowadzi długa i okropna kuchnia”. Sam Claude Bernard dokonał histochemicznej lokalizacji komórek gruczołowych żołądka za pomocą reakcji błękitu berlińskiego. Na fali tych wielkich XIX-wiecznych biochemiczno-histochemicznych osiągnięć, obok nazwiska przyjaznego nauce polskiej R. Virchowa z jego studiami nad produktami rozpadu hemoglobiny w tkankach i P. Ehrlicha, autora metody histochemicznej demonstracji oksydazy cytochromowej, tzw. wówczas „Nadi oksydazy”, znajdujemy nazwisko Bronisława Radziszewskiego, badacza chemiluminescencji w tkankach roślin i zwierząt, Leona Marchlewskiego, jakże znanego ze studiów nad chlorofilem roślin wyższych i — wraz z Marcelim Nenckim — nad jego pokrewieństwem z hemoglobina, nadto nad melaninami komórek nowotworowych, znajdujemy też nazwisko Stanisława Kostaneckiego, profesora w Bernie szwajcarskim, słynnego twórcy berneńskiej szkoły barwników komórek roślinnych. Tu właśnie należy przypomnieć i podkreślić walor docenianych przez patrona histochemików polskich prof. A. G. E. Pearse’a badań Henryka Hoyer sen., profesora Uniwersytetu Warszawskiego, który w 1890 r. odkrył metachromazję komórek gruczołów ślinowych identyfikując ich mucyny barwnikami tiazynowymi. W ten sposób Henryk Hoyer sen. stworzył nowy rozdział histochemii o trwałej wartości.

W asocjacji z Hoyerem należy wymienić dokonane przez Emila Godlewskiego jun. w latach I wojny światowej odkrycie DNA w cytoplazmie

jaj płazów. Spostrzeżenie to, dzięki prof. J. Brachet, stało się istotnym wkładem w postępowanie współczesnej cytochemii i cytologii, a także cytogenetyki.

Z nazwiskiem Henryka Hoyera sen. wchodzimy w obręb publikacji objętych „Polską Bibliografią Histochemiczną za lata 1890 - 1957” przygotowaną przez prof. Henryka Godlewskiego i wydaną jego osobistym trudem. Dzieło to daje doskonały wgląd w całokształt badań z zakresu histo- i cytochemii wykonanych przez polskich badaczy w rzeczonym okresie. Jest ono również pomnikowym rejestrem wiodących nazwisk naszych uczonych działających aktywnie w tych dziedzinach po odzyskaniu niepodległości.

W okresie międzywojennym najaktywniejszymi ośrodkami badań histochemiczno-cytochemicznych były uniwersytety warszawski, lwowski i wileński, następnie krakowski. W Warszawie już w r. 1923 prof. Mieczysław Konopacki, a w r. 1924 małżonka jego, prof. Bronisława Konopacka, ogłosili wyniki pierwszych swych, kontynuowanych następnie aż do II wojny badań dotyczących biologii rozrodu. Wykonywali je na materiale jaj i zarodków płazów głównie za pomocą testów na lipidy, DNA i glikogen, pragnąc na tej drodze poznać przemianę materii, tzw. przez Konopackich „mikrometabolizm” badanych komórek. Zatrudniony w ich pracowni Henryk Godlewski w r. 1937 opublikował swe pierwsze prace dotyczące mikrospopielania, czyli spodografii. Bardzo aktywni na polu histochemii zoologicznej w Warszawie byli już w latach dwudziestych P. Słonimski sen. i J. Zweibaum.

We Lwowie w r. 1924 ukazały się pierwsze prace J. Hirschlera na temat lipidów plazmy pierwotniaków. Bardzo aktywna była wileńska szkoła histochemii, gdzie pod kierunkiem prof. Stanisława Hillera pracowali Stefan Bagiński i Jan Kruszyński. W 1933 r. wszyscy ci trzej badacze opublikowali w Pamiętnikach XIV Zjazdu Przyrodników i Lekarzy wyniki swych badań histochemicznych nad regeneracją u aksolotla. Następnie Jan Kruszyński ogłosił drukiem szereg cenionych do dziś prac na temat cytochemii spoielonych neuronów, histochemii chrząstki i oka mątwy (*Sepia*), a w 1939 r. na temat lokalizacji wapnia i żelaza w spoielonym pantofelku (*Paramecium caudatum*). W r. 1939 Bagiński zbadał spodogram jajnika.

W Poznaniu w 1935 r. T. Kurkiewicz opracował metodę wykrywania adrenaliny w rdzeniu nadnercza, znaną w piśmiennictwie jako metoda Henle-Kurkiewicza. W tymże roku K. Miętkiewski zbadał histochemicznie najądrze świnki morskiej. W 1929 r. J. Słotwiński ogłosił wyniki badań nad układem siateczkowo-śródbłonkowym u psa, a w r. 1935 T. Pawlikowski opublikował swe badania nad reakcjami barwnymi krwinek.

W Krakowie swoje pierwsze prace cytochemiczne dotyczące lumine-

scencji zwierząt morskich opublikował w 1928 r. Stanisław Skowron, a wyniki badań nad lipidami zarodków ssaków ogłosił Zygmunt Szantrach w 1932 r. W 1936 r. Jadwiga Ackermann w Biuletynie Polskiej Akademii Umiejętności (PAU) w Krakowie opublikowała swe studia nad metabolizmem lecytyny w tkankach zwierzęcych, a w r. 1938 w tymże Biuletynie PAU Zygmunt Grodziński ogłosił dane o żółtku jaj ptasich. Wszyscy ci wymienieni, a także nie wymienieni tu badacze działali do wybuchu II wojny światowej.

Jak widzimy, dorobek nasz na polu histo- i cytochemii do r. 1939 nie był skromny. Credo ludzi, którzy ten dorobek tworzyli, wyrażają jasno słowa nie przemijającej wartości, które znajdujemy w jednej z publikacji E. Godlewskiego jun.: „Praca naukowa twórcza może być źródłem prawdziwego szczęścia, wielu radości i chwil pięknych i jasnych, ale związek z tą towarzyszką życia musi być oparty na uczuciu miłości i wierności. Nie można i nie trzeba liczyć, żeby poświęcając się nauce, zdobyć można było równocześnie zamożność, jakieś szczególnie dobre warunki życia lub stanowisko dające duże wpływy w kraju. Wszystkie te rzeczy musi zastąpić poczucie zadowolenia i szczęścia z uzyskanych wyników prac naukowych. Czar takich przeżyć... może być wprost olbrzymi i wynagrodzić nie tylko trud pracy, ale i wiele braków, niedostatków, a nawet niejedną niedolę życia. Zwłaszcza, kiedy człowiek w takiej dobrej chwili uświadomi sobie, że się przyczynił wysiłkiem duchowym Polaka do posunięcia naprzód wiedzy, do zwiększenia dorobku myśli ludzkiej”. Tyle prof. Emil Godlewski jun.

Powaga jubileuszu naszego Towarzystwa wymaga, byśmy z wdzięcznością i uznaniem pomyśleli o tych pionierach polskiej histo- i cytochemii i ich współpracownikach. Wysiłek ich i stworzony przez nich dorobek naukowy dały realne podstawy utworzenia po II wojnie światowej stowarzyszenia polskich histochemików. Wstępny, ułatwiający akceptację w Polsce takiego nowego stowarzyszenia naukowego aktem był artykuł prof. Henryka Godlewskiego pt. „O postęp i rozwój wiedzy histochemicznej”, zamieszczony w r. 1954 w „Postęпах Wiedzy Medycznej”, w którym autor postulował zakładanie pracowni biochemiczno-histochemicznych przy istniejących zakładach morfologicznych. Ostatecznie stowarzyszenie to rozpoczęło swój byt — dzięki inicjatywie prof. H. Godlewskiego — jako sekcja histochemiczna Polskiego Towarzystwa Anatomicznego w 1957 r. Sekcja ta pod przewodnictwem prof. H. Godlewskiego zapisała się w Polsce żywą działalnością organizacyjną i naukową, dzięki często, łącznie 5-krotnie urządzanym krajowym sympozjom histochemicznym.

Pierwsze historyczne sympozjum sekcji dotyczyło histochemii fosfatów. Odbyło się ono 14 lutego 1958 r. w Warszawie pod przewodnictwem

prof. H. Godlewskiego. Uczestniczyli w nim prof. B. Konopacka, dr Zofia Lasota, dr A. Vorbrodt, dr dr Helena i Stanisław Zawistowscy. Materiały tego sympozjum opublikowano w „Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej” (1959). Następne sympozja dotyczyły różnych fizycznych metod w histochemii, przy udziale prof. N. M. Hancoxa (Liverpool) i R. Wegmanna (Paryż), oraz histochemii wielocukrów. Szczególnie bogaty program miało sympozjum nt. enzymów wewnątrzkomórkowych w Krakowie w r. 1960, w którym po raz pierwszy w naszym kraju wzięli udział prof. A. G. E. Pearse (Londyn), A. Novikoff (Nowy Jork), V. Dubovitz (Londyn), Z. Lojda (Praga) i T. H. Schiebler (Würzburg). Autorzy ci wygłosili prelekcje, a materiały tego sympozjum dzięki życzliwości prof. S. Hillera opublikowały „Folia Morphologica”. Co więcej, członkowie sekcji wzięli udział w pierwszym Międzynarodowym Kongresie Histochemików i Cytochemików w Paryżu w 1960 r. oraz w sesji konstytuującej Międzynarodową Federację Towarzystw Histochemii i Cytochemii, działającą przy UNESCO.

Dalsze nieustanne wysiłki prof. H. Godlewskiego doprowadziły do zwołania w maju 1960 r. w Warszawie posiedzenia konstytucyjnego 17 członków założycieli Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików (PTHC), które dzięki poparciu VI Wydziału Polskiej Akademii Nauk i Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej rozpoczęło swą egzystencję w lipcu 1961 r. Jednocześnie został powołany Komitet Redakcyjny kwartalnika „Folia Histochemica et Cytochemica”, organu PTHC, a redakcja czasopisma została powierzona J. Niwelińskiemu. W bieżącym roku ukazuje się 24 tom tego notowanego regularnie od 1973 r. w „Current Contents” kwartalnika pod redakcją prof. J. Kałuży. Tytuł tego czasopisma, stosownie z duchem czasu i wymogami postępu wynikającymi z samych założeń histo- i cytochemii, został w 1983 r. zmieniony na „Folia Histochemica et Cytobiologica”.

W ten sposób kraj nasz zdobył nowe towarzystwo naukowe, prawem państwowym zabezpieczoną instytucję opiekującą się badaniami histochemicznymi i cytochemicznymi, ułatwiającą łączność pomiędzy poszczególnymi ośrodkami tych badań i reprezentującą ten dział nauki w Polsce i za granicą. Nowo powstałe PTHC, którego pierwszym prezesem był prof. Henryk Godlewski, już na progu swej działalności przystąpiło do wzmocnienia potencjału wiedzy histochemicznej w Polsce, organizując jesienią 1962 r. w Warszawie kurs histochemii teoretycznej i praktycznej. W kursie tym wzięło udział ok. 50 uczestników — pracowników wyższych uczelni i Polskiej Akademii Nauk z całego kraju. Wkrótce potem pod red. A. Krygier-Stojałowskiej i H. Godlewskiego ukazał się w dwóch wydaniach 2-tomowy „Skrypt Metod Histochemicznych”, historycznie pierwszy polski podręcznik histochemiczny. Następnie w r. 1963 PTHC

dało się poznać światu nauki jako organizator I Międzynarodowego Sympozjum Histochemii w Warszawie. Temat sympozjum brzmiał „Histochemia wzrostu i różnicowania”. Sympozjum to było pamiętnym wydarzeniem histochemii i cytologii polskiej i światowej i obok czołowych histochemików polskich bardzo licznie zgromadziło wiodące w owym czasie zagraniczne osobistości z tych dziedzin, że wymienię tylko nazwiska A. Ambrose z Londynu, J. Brachet z Brukseli, E. Benditta w Waszyngtonu, I. Diculescu z Bukaresztu, Z. Lojdy z Pragi, H. Luppy z Lipska, H. Mayersbacha z Nijmegen, G. Gerzeli z Pawii, M. Niemi z Helsinek, Kazuo Ogawa z Kioto, J. M. Olenowa z Leningradu, A. G. E. Pearse'a z Londynu, W. Portugałow z Moskwy, Z. Pósalaky i Gy. Rappay z Węgier, P. Rumiancewa z Leningradu, W. Sandrittera z Giessen, J. Verne'a i R. Wegmanna z Paryża. Łączność z tymi ludźmi i reprezentowanymi przez nich kierunkami wiedzy histochemicznej i cytobiologicznej w połączeniu z własnym zapałem do pracy badawczej umożliwiało histo- i cytochemikom polskim dotrzymanie kroku ogólnowiświatowemu rozwojowi histochemii wiązanej coraz mocniej z cytobiologią, a nawet wyprzedzenie tego rozwoju na pewnych odcinkach.

Dokumentacją tego stanu rzeczy są publikacje autorów polskich w czasopismach krajowych i zagranicznych oraz ich wystąpienia na kolejnych międzynarodowych kongresach histo- i cytochemii, regularnie w odstępach czteroletnich organizowanych przez Międzynarodową Federację Towarzystw Histo- i Cytochemicznych, której członkiem jest PTHC. Przegląd tych publikacji wskazuje wyraźnie na rosnącą z biegiem lat tendencję interpretacji wyników prowadzonych w Polsce badań histo- i cytochemicznych w kategoriach biologii molekularnej.

Poszerzony i pogłębiony, atrakcyjny program pracy światowej histo- i cytochemii spowodował wzrost, a tym samym pociągnął za sobą zmiany organizacyjne PTHC, które w chwili obecnej działa w 10 oddziałach czynnych w środowiskach uniwersyteckich, a mianowicie w Warszawie, Krakowie, Łodzi, Poznaniu, Gdańsku, Szczecinie, Lublinie, Wrocławiu, Białymstoku i Bydgoszczy. Ponadto przy Zarządzie Głównym PTHC czynnych jest pięć sekcji specjalistycznych: Sekcja Biologii Komórki, Sekcja Tkanki Łącznej, Sekcja Metodyczna, Sekcja Hodowli Komórek i Tkanek i Sekcja Matematyki w Biologii Komórki. Zakres tematyczny prac podejmowanych przez histo- i cytochemików polskich jest ogromny. Nie będzie żadnej przesady w stwierdzeniu, że nie ma takiej dziedziny nauk biologicznych łącznie z medycznymi i rolniczymi, w której badacze ci nie byłiby czynni. Skąpe rozmiary czasowe, jakimi dysponuję, nie pozwalają mi, wbrew pierwotnym zamierzeniom, poświęcić szczególnej uwagi wynikom bardzo różnorodnych badań prowadzonych przez naszych

histochemików w poszczególnych oddziałach Towarzystwa, które tak uprzejmie nadesłały mi swe sprawozdania.

Bardzo różnymi tematami zajmuje się Oddział PTHC w Warszawie, którego przodująca rola w życiu naszego Towarzystwa jest dobrze znana. Działają tu obok siebie liczne podległe różnym resortom zakłady naukowe, uczelniane i Polskiej Akademii Nauk, które pracują wielokierunkowo nad zagadnieniami akademickiej i stosowanej histo- i cytochemii w odniesieniu do tematów związanych z fizjologią i patologią rozwoju organizmów niższych i wyższych, łącznie z człowiekiem. Wiele z nich pracuje w zakresie biologii molekularnej. Z tymi aspektami aktywności naukowej Oddziału w Warszawie łączy się jego ważna ogólnopolska działalność dydaktyczna polegająca na wydawaniu periodycznym podręcznika „Cytofizjologia” redagowanego przez J. Kawiaka i K. Ostrowskiego oraz „Podstawy Cytofizjologii” J. Kawiaka, J. Mireckiej, M. Olszewskiej i J. Warchoła. Bardzo aktywnie działa w Warszawie Sekcja Tkanki Łącznej pod przewodnictwem E. Małdyka. W Warszawie zespół K. Ostrowskiego opracował oryginalną metodę lokalizowania esteraz, opartą na zasadzie wiązania ich inhibitorów z enzymem, zespół Sierakowskiej metodę wykrywania rybonukleazy II, a zespół Szemplińskiej metody wykrywania amylaz i hialuronidazy.

Analogicznie jak w stolicy kształtuje się sytuacja organizacyjna i tematyczna oddziału w Krakowie, gdzie w szeregu zakładów naukowych prowadzone są liczne prace immunohistochemiczne, prace nad ultrastrukturą komórek układu dokrewnego, komórek krwi i neurocytów w ich różnych stanach czynnościowych, a także skomplikowane metodycznie prace na tematy biologii molekularnej. Zwrócić uwagę trzeba na zaawansowane badania paleohistochemiczne szczątków dinozaurów. W Krakowie również, drugim obok Górnego Śląska najbardziej zagrożonym ekologicznie rejonie Polski, histochemia intensywnie wspierana przez władze Krakowskiej Akademii Medycznej pozostaje w służbie ochrony naturalnego środowiska człowieka. Bardzo jest czynna w Krakowie Sekcja Hodowli Komórek i Tkanek pod przewodnictwem S. Stokłosowej.

Oddział Łódzki jako pierwszy w Polsce wprowadził i zaadaptował metody cytochemiczne, zwłaszcza autoradiograficzne, do botanicznych studiów cytogenetycznych w zakresie biologii molekularnej. Bardzo intensywnie prowadzone są tu badania nad ultrastrukturą gruczołów dokrewnych, tu również M. Olszewska, M. Wroński i W. Fortak opracowali nową histochemiczną metodę wykrywania mostków dwusiarczkowych S-S w tkankach, metodę, która weszła do literatury światowej. W Łodzi także Bolesław Broda wydał monografię pt. „Histochemia roślinna”. Przypomnieć trzeba, że jedyny polski delegat na III Międzynarodowy

Kongres Histochemii i Cytochemii w 1968 r. w Nowym Jorku prof. M. Olszewska była honorowym wiceprezesem tego Kongresu. A zaszczyt wyświadczony prof. Olszewskiej jest zaszczytem dla PTHC.

Niezwykle intensywnie pracuje Oddział PTHC w Poznaniu, który program swój wywodzi głównie z założeń szeregu zakładów Akademii Medycznej. W dotychczasowej pracy Oddział koncentrował się przede wszystkim na opracowaniach związanych z cytofizjologią komórek dokrewnych. Opracowane tu metody badań ilościowych oparto na technice laserowej. Wiele uwagi poświęca się wyświetlaniu mechanizmów reakcji histochemicznych. Osobny obszerny rozdział stanowią prace poświęcone problematyce neuropatologicznej, w tym również schorzeniom neuronalnym indukowanym wpływami chemicznymi środowiska. W Oddziale Poznańskim czynna jest związana z Zarządem Głównym PTHC Sekcja „Morfometria i matematyka w biologii komórki” kierowana przez L. Malendowicza oraz Sekcja Biologii Komórki z przewodniczącym J. Warchołem.

Oddział w Gdańsku, kontynuując tradycje swego mistrza prof. S. Hillera, prowadził badania histochemiczne z zakresu organogenezy, a następnie badania histoenzymatyczne narządów mięszzowych w szeregu stanów czynnościowych. Obecnie członkowie Oddziału opracowują tematy cytobiologiczno-cytofizyczne. Wiele energii poświęca Oddział Gdański propagowaniu metod histochemicznych, także drogą współpracy z Polskim Towarzystwem Anatomicznym, Polskim Towarzystwem Biochemicznym, Polskim Towarzystwem Fizjologów i Polskim Towarzystwem Immunologicznym. Przy Oddziale czynna jest Sekcja Metodyczna PTHC, która w br. zorganizowała konferencję szkoleniową nt. immunocytochemii i hybridocytochemii z udziałem prelegentów zagranicznych: M. van der Ploega (Leyden) oraz Susan van Noorden i J. Varndella (Londyn). Kierownikiem Sekcji Metodycznej jest A. Myśliwski.

Oddział we Wrocławiu ma bogaty i godny uwagi program pracy. Wy różniają się w nim priorytetowe w Polsce i świecie długofalowe badania histochemiczno-autoradiograficzne nad przebiegiem fazy mięśniowej włósnicy. Nadto kontynuowane są pracochłonne badania nad cytochemią rozwoju i regresji laktacji. Uznanie musi budzić w dziedzinie embriogenezy odkrycie nowego typu miogenezy i jej dowiedzionego, niezależnego od somitogenezy przebiegu u *Anura*, i wreszcie odkrycie nie znanego dotąd cytologom upostaciowanego składnika jądra komórkowego. Inne rozdziały prac kolegów wrocławskich to cytochemia pęcherzyków jajnikowych i zmian narządowych towarzyszących białaczce. Z układem białokrwinkowym-limfatycznym wiążą się liczne prace cytoenzymatyczne zdające się otwierać nowe horyzonty interpretacji funkcji tego układu i sterowania nim. Wypada zaznaczyć, że zrzeszeni w Oddziale Wrocławskim

pracownicy Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach prowadzą badania histochemiczno-ekologiczne.

Oddział w Szczecinie powołany przed dwoma laty prowadzi różnokierunkowe prace histochemiczno-cytobiologiczne dotyczące problematyki fizjologicznej i patologicznej. Są to badania cytochemiczne układu rozrodczego, badania ilościowe kwasów nukleinowych w tkankach, wreszcie bezprecedensowe pod wieloma względami badania cyto- i histochemiczne pasożytów człowieka, połączone z wnioskami dotyczącymi ich przynależności taksonomicznej. Wiele uwagi poświęca Oddział Szczeciński działalności odczytowej wśród szczecińskich pracowników nauki, także z udziałem prelegentów zagranicznych; działalność ta upowszechnia wartości reprezentowane przez histo- i cytochemię.

Oddział PTHC w Białymstoku ożywiony pamięcią działalności doc. H. Lewińskiej i prof. L. Komczyńskiego może się chlubić szerokim rozpowszechnieniem metod histochemicznych i cytochemicznych w wielu zakładach i klinikach tamtejszej Akademii Medycznej. Większość wykonanych tam badań histochemicznych wiąże się z fizjologią i patologią układu rodneggo żeńskiego, rozdziałem medycyny tak istotnym dla zdrowotności naszego społeczeństwa. Wspomnieć należy o prowadzonych w tej dziedzinie badaniach tkanki łącznej i nukleoproteidów w stanach przednowotworowych i nowotworowych, w różnych stanach patologii ciąży i porodu, o doświadczalnych studiach nad lekami przeciwnowotworowymi, o badaniach nad neurosekrecją u zwierząt doświadczalnych i jej przebiegiem pod wpływem czynników farmakologicznych. Dużo miejsca w programie badań Oddziału zajmują prace o charakterze ekologicznym.

Oddział w Lublinie kierowany przez wiele lat przez niezapomnianego prof. M. Wawrzyniaka zasłynął jego i jego współpracowników pionierskimi pracami z dziedziny histoenzymatyki centralnego systemu nerwowego. Innym interesującym działem tamtejszych badań są studia histochemiczne nad narządem wzroku. Bardzo aktywnie prowadzi Oddział Lubelski działalność odczytową i referatową przy współudziale innych towarzystw naukowych. Uczestniczą w niej prelegenci krajowi i zagraniczni.

Najmłodszy z naszych oddziałów to Oddział w Bygoszcy, który stawia pierwsze, lecz zdecydowane kroki na polu organizacyjnym i naukowym.

Reasumując należy stwierdzić, że wszystkie oddziały naszego Towarzystwa pracują intensywnie, niektóre wręcz z rozmachem, a wypracowane przez siebie wyniki niezwłocznie przekazują światu nauki dzięki sprawności naszego kwartalnika „Folia Histochemica et Cytobiologica” oraz działającego od 1974 r. czasopisma „Postępy Biologii Komórki” wydawanego przez bliskie nam Polskie Towarzystwo Anatomiczne pod red. J. Ka-

wiaka, W. Kilarskiego, M. Olszewskiej i J. Michejdy. Wszystkim Oddziałom należy życzyć uwieńczenia ich badań najpomyślniejszymi wynikami.

Na przestrzeni swych 25 lat istnienia PTHC 9-krotnie zmieniło swój zarząd. Przez trzy pierwsze kadencje prezesem Towarzystwa był prof. H. Godlewski, następnie godność tę przez dwie kadencje sprawowali prof. J. Kawiak i prof. A. Krygier-Stojałowska. Obecny prezesem jest doc. dr A. Łukaszyk, kierownik Zakładu Histologii Akademii Medycznej w Poznaniu. Jak już wspomniano, do programu naszego Towarzystwa należy systematyczne coroczne organizowanie sympozjów naukowych (łącznie 22), z których pierwsze odbyło się w r. 1962 w Białymstoku. Sympozja te, każdorazowo omawiające inny temat, z reguły goszczą naukowców zagranicznych i są okazją do wymiany myśli i zacieśnienia współpracy w Towarzystwie. Odbyte ostatnio sympozja w r. 1983 w Poznaniu, w r. 1985 w Gdańsku i w r. 1986 w Rytrze miały charakter międzynarodowy. Wzięli w nich udział przedstawiciele szeregu krajów europejskich i pozaeuropejskich, a językiem obrad był angielski.

Równoległe od r. 1971 odbywają się corocznie konferencje biologii komórki w Warszawie organizowane na aktualne tematy cytologiczne wspólnie przez zarządy PTHC, PTA i redakcję „Postępów Biologii Komórki”, natomiast wydawnictwem książkowym o trwałej wartości jest dzieło opublikowane w dwu kolejnych wydaniach w latach 1975 - 1981 pt. „Topochemiczne metody badań komórek i tkanek”, a więc pierwsza poważna monografia histochemiczna w języku polskim. Ponadto pod red. M. Wawrzyniaka z inicjatywy PTHC opublikowano w PZWL dzieła „Mianownictwo histologiczne” i „Mianownictwo embriologiczne” w latach 1979 i 1983. Monografią cytologiczną jest dzieło zbiorowe „Ultrastruktura i funkcja komórki”, którego I tom ukazał się w PWN w r. 1973, a tom II w r. 1982.

Za wyróżniające się opublikowane prace badawcze PTHC przyznaje nagrody pieniężne z funduszków własnych oraz z funduszu im. prof. K. Miętkiewskiego, te ostatnie za prace histochemiczne w dziedzinie endokrynologii. Ogółem dotychczas Towarzystwo nasze przyznało 71 nagród.

Ożywiona działalność badawcza naszego Towarzystwa łączyła się często z działalnością ośrodków zagranicznych. W latach 1965 - 1975 odbyły się sympozja onkologiczne polsko-radzieckie dzięki współpracy polskiego Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej oraz Akademii Nauk Medycznych ZSRR. Sympozja te organizowano pod hasłem „Metody histochemiczne w onkologii klinicznej i doświadczalnej”, a miejscem obrad były kolejno: Moskwa w 1965 r., Warszawa w 1969 r., Tbilisi w 1972 r. i Gdańsk w 1975 r. Zasłużonymi dla organizacji tych sympozjów ze strony radzieckiej byli zawsze prof. N. A. Krajewski i N. T. Rajchlin.

PTHC utrzymuje kontakty z Sekcją Histochemiczną Towarzystwa Anatomów, Histologów i Embriologów w ZSRR. Współpraca z Niemieckim Towarzystwem Topochemii i Mikroskopii Elektronowej nawiązana w r. 1973 przy wydatnej inicjatywie prof. Güntera Geyera zaowocowała wspólnie zorganizowanymi sympozjami w Gdańsku w r. 1975 i w Lipsku w r. 1979. Członkami honorowymi Niemieckiego Towarzystwa Topochemii i Mikroskopii Elektronowej zostali prof. J. Kawiak i K. Ostrowski. Prof. H. Godlewski natomiast uzyskał honorowe członkostwo Niemieckiej Akademii Przyrodników „Leopoldina” obok honorowego członkostwa Węgierskiego Towarzystwa Anatomów, Histologów i Embriologów.

Jako członek Międzynarodowej Federacji Towarzystw Histochemii i Cytochemii PTHC brało przez swych delegatów czynny udział w odbywających się co cztery lata od 1960 r. kongresach międzynarodowych histochemii i cytochemii w różnych punktach kuli ziemskiej, a więc w Paryżu, Frankfurtie n/Menem, Nowym Jorku, Bukareszcie, Brighton i Helsinkach. Nie uczestniczyliśmy w Kongresie IV w Kioto.

Zasługi członków PTHC oraz osób spoza tego Towarzystwa szczególnie dla PTHC znaczące, oddane Towarzystwu w toku jego 25-letniej działalności, a także nawiązane w kontaktach międzynarodowych stosunki przyjaznej współpracy, znalazły wyraz w godnościach nadanych przez PTHC następującym osobom w kraju i za granicą: w Polsce w kolejności nadań członkami honorowymi zostali profesorowie: Bronisława Konopacka (Warszawa), Jadwiga Ackerman (Kraków), Kazimierz Stojałowski (Szczecin), Jan Słotwiński (Szczecin), Zygmunt Albert (Wrocław), Henryk Godlewski (Kraków), Marek Wawrzyniak (Lublin), Kazimierz Jabłoński (Wrocław). Członkowie honorowi z zagranicy to profesorowie: Jean Verne (Paryż), Imre Törö (Budapeszt), Heinz von Mayersbach (Nijmegen), Günther Geyer (Jena), Anthony G. Everson Pearse (Londyn) i Peter van Duijn (Leyden). Godność i tytuł „Bene Meritus” nadano profesorom: Stanisławowi Hillerowi (Gdańsk), Ludwikowi Paszkiewiczowi (Warszawa) i Witoldowi Zawadowskiemu (Warszawa).

Życzliwa pomoc i współpraca tych przeznacznych ludzi ułatwiły Polskiemu Towarzystwu Histochemików i Cytochemików rozwój i rozkwit. Dziękuję Im za to!

Wśród wielu krytycznych poglądów wypowiedzianych dziś pod adresem nauki spotkałem również zdanie, że histochemia się już skończyła, wyczerpuje już swoje możliwości badawcze wobec postępu nowoczesnych technik w naukach biologicznych. Tezę taką trzeba nazwać grubą pomysłką. Po pierwsze histochemia to nie tylko zbiór metod klasycznych z pogranicza histologii i biochemii, a nawet nie tylko zupełnie nowe, wciąż opracowywane metody wykrywania w tkankach i komórkach ich składników, np. enzymów. Histo- i cytochemia, cytobiologia to całość badań podstawowych wiodących do poznania związków struktury

i funkcji, a oba te komponenty przecież dzięki właściwemu żywej materii zjawisku mutacji ustawicznie się zmieniają. Histo- i cytochemia, a z nimi cytobiologia, rozwijać się więc będą zawsze, równolegle z postępującym ustawicznie rozwojem żywej materii. Prof. Kornel Gibiński w swym referacie na III Kongresie Nauki Polskiej powiedział: „Do zadań długoterminowych należą badania podstawowe... W istocie liczba pytań wymagających odpowiedzi w wyniku badań stale jeszcze przewyższa liczbę dotychczas uzyskanych przez naukę rozwiązań i odpowiedzi. Badania te muszą być kontynuowane. Nikt nie może postawić tamy docieklivosti ludzkiego umysłu. Do najbardziej podstawowych należeć będzie nadal biologia komórki, przekazywanie życia, regulacja procesów życiowych na poziomie komórki, tkanki, narządów i układów w zakresie samozachowania i adaptacji do zmiennych warunków, aż po psychosomatykę. Nie wiadomo, czy uda się dociec istoty życia przed samozniszczeniem świata. Nie ma jednak innej drogi przed ludzkim umysłem. Wśród najdociekliwszych w odkrywaniu prawd podstawowych nie brakło polskich umysłów. Są one też między nami. Aby te najlepsze mogły zabłysnąć, muszą działać licznie i przekazywać naukę z pokolenia na pokolenie. Pozamerytoryczne ograniczenie nauk podstawowych, a więc nie wynikłe z troski o ich najwyższy poziom oznacza, być może, uzależnienie gorsze niż militarne, polityczne, techniczne czy ekonomiczne; oznacza wyrzeczenie się prawa do tworzenia postępu na świecie”. Nie trzeba się więc bać o przyszłość histochemii.

Powyższy rzut oka na działalność Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików oraz jego oddziałów jest siłą rzeczy pogładowy, możemy jednak na jego podstawie — parafrazując wojskowe powiedzenie — stwierdzić, że także w nauce nie jesteśmy żołnierzami z papieru. Mamy prawo orzec, że na przestrzeni swego 25-lecia istnienia PTHC dobrze się zapisało w historii polskiej kultury i nauki. Jeśli tak było, to złożyło się na to wiele czynników: epoka i nasze związki z jej prądami, zamiłowania i gorliwość badawcza polskich ludzi nauki, i ostatnie, nie najmniejsze — obecność wśród nas prof. Henryka Godlewskiego z jego inicjatywą, horyzontem naukowym, bezprzykładną pracowitością i poświęceniem patriotycznym dziełu, które zbudował, a którego rocznica zgromadziła nas tutaj. Za tę pracę, za to dzieło najserdeczniej dziękujemy Ci, Panie Profesorze Godlewski, w imieniu własnym i w imieniu tych, co po nas przyjdą!

Otrzymano: 11 listopada 1986.

Przyjęto: 10 grudnia 1986.

Adres Autora: Floriańska 8/2, 31-021 Kraków

THE HIERARCHICAL ORGANIZATION OF PLANTS AND THE TRANSFER OF INFORMATION DURING THEIR DEVELOPMENT

HIERARCHIA ORGANIZACJI ROŚLIN ORAZ PRZEKAZ INFORMACJI PODCZAS ROZWOJU

Peter W. BARLOW

Long Ashton Research Station, University of Bristol

Summary. Consideration is given to how the levels in a biological hierarchy can be defined and related to real entities. Plants life is constituted of five hierarchically organized systems, or levels, which correspond to cells, organs, organisms, groups, and the community. J. G. Miller, in his book "Living Systems", proposed that an important property of each level in a biological hierarchy is that it is sustained by a common set of subsystems, all of which are necessary for life. These subsystems are concerned with reproduction, processing matter-energy, and processing information. Some aspects of the latter group of subsystems are discussed, particularly as they relate to the informational rôle of hormones in plant development.

Streszczenie. Przedstawiono tu rozważania na temat sposobu zdefiniowania poszczególnych poziomów w hierarchii biologicznej oraz ich odniesienia do układów rzeczywistych. Życie roślin składa się z pięciu, pozostających w hierarchicznej zależności systemów lub poziomów odpowiadających komórkom, narządom, organizmom, grupom i populacji. J. G. Miller, w swojej książce „Living Systems”, przedstawił pogląd, w myśl którego istotną właściwością każdego z poziomów w hierarchii biologicznej jest to, że jego istnienie jest uzależnione od wspólnego zespołu podsystemów, spośród których każdy jest niezbędny dla życia. Podzespoły te są odpowiedzialne za reprodukcję, przemianę materia-energia, oraz przetwarzanie informacji. Omówiono tu także pewne aspekty grupy podsystemów, która wymieniona została jako ostatnia, a w szczególności związku tychże podsystemów z informacyjną rolą hormonów w rozwoju roślin.

1. INTRODUCTION

Growth and development are processes fundamental to living systems and apply not only to cells within tissues but also to higher groupings such as populations within ecosystems. One of the aims of both plant

and animal biologists is to try and understand these processes in all types of biological organizations, whatever their degree of complexity.

During the course of such an ambitious undertaking it is necessary first to gather and organise the relevant information and then to formulate clear concepts regarding the structure and function of the living systems from which this information has been extracted. To illustrate the difficulty of this task we can take as an example the process of leaf initiation in plants. Despite more than 150 years of analytical and experimental research, no satisfactory theory accounting for the pattern of leaf initiation (phyllotaxis) has yet emerged. This is partly because the authors of the many theories that abound at present have not assimilated, or perhaps had access to, all the data that exist; thus, no single theory accounts for all the known phyllotactic patterns, and certainly none can embrace the odd case where pattern is absent (e.g. *Acacia conferta*) [40a]. However, it should not be necessary to examine every extant species to arrive at a satisfactory hypothesis for phyllotaxis, or any other developmental problem, if the initial premises are correct. When a "critical mass" of information is reached it should be possible to formulate some of general rules by which living systems are governed and to perceive the goals to which their various processes are directed. The hope that this critical mass is close to being attained in the field of plant development encourages the presentation of the ideas in this article.

An active area of research in the plant sciences considers the rôle of hormones in growth and development. However, there are remarkably few examples where the details of hormone action are sufficiently well known to formulate adequate explanations for their effects on developmental processes. Moreover, exactly how we view their rôles in plant development might depend on what we mean by "development", and perhaps even on what we mean by "plant". The concept of development poses few problems: operationally it is the change in form brought about by the transcription and translation of the genome, these processes in turn being influenced by the external environment. But the second question, "what is meant by plant?", may seem quite perverse if it were not for the fact that up to the present day uncertainty surrounds the origin of plant structures and the way in which they should be categorised [15, 28, 40, 44, 45]. Even the techniques of molecular biology, a discipline considered by many to be a touchstone for enlightenment, have so far failed to resolve a controversy begun 120 years ago concerning the status of the rhizophore of *Selaginella* [22, 32].

I believe that it is profitable to discuss plant growth and development, and the rôle of hormones in these two processes, in terms of a hierarchical conception of plant structure [3]. By so doing, the way is opened

for the application of systems theory to try and unravel some of the attendant complexities. However, it is first necessary to propose some definitions and to clarify some of the concepts that inevitably enter into such a discussion. A few examples will then be presented to illustrate the application of these concepts.

2. HIERARCHICAL ORGANIZATIONS

A hierarchical system consists of a set of interrelated levels, each composed of a particular patterned assemblage of units. It is generally accepted that the hierarchy of living systems, including plants, consists of four structural levels — cell, tissue, organ, and organism*. However, the levels of this “living” hierarchy (as we may call it) extend beyond these categories, for all cells are constructed of molecules, and organisms are the units that construct populations. In fact, these two additional levels (the molecular and the population) not only define the boundaries of the living hierarchy but also help to define what is meant by a “level”: a property of this type of hierarchy is that each level provides the materials from which the next higher level is constructed. This, in turn, gives an indication of a second property of a hierarchy — its asymmetry. One speaks of lower and higher levels within a hierarchy to mean that the levels are ordered in a sequence of increasing complexity, where the complexity of a level is defined by a minimum algorithm necessary for its unambiguous specification in terms of either its structure or its processes (this definition is derived from its usage in a mathematical context [6]). One way of determining the order of levels is through their interdependence: a higher level depends upon a lower for its existence, but not vice versa. The various notions of levels employed in science and ontology have been enumerated by Bunge [4]; the category of hierarchical levels often employed in biology is what this author calls “emergent whole” — a term appropriately conveying the idea of structural interdependence.

The antithesis of levels would be a continuum in which complex processes and the structures which support them exist, but without there being any indication that they have graded levels of organization. However, Simon [49] has argued that it is highly improbable that living

* A hierarchy based on the taxonomy of organisms is a further type of structural classification and has been dealt with by Gregg [14]; but it is based on phylogeny rather than on ontology.

organisms could have evolved in the absence of hierarchical structures *. It is, therefore, of as much interest to discover what separates one level of a hierarchy from another as it is to know the contents of each level.

The boundaries between the different levels reflect many things. They represent the historical evolutionary as well as the contemporary ontogenetic steps by which organisms arose (molecules aggregate to give cells, clusters of cells give tissues, etc.); they also represent sharp transitions in size, life-span, or the amounts of energy needed to maintain each successive level. The exact quantities of energy involved are hard to define in a biological hierarchy, but to take an example from a physical hierarchy the energy interaction of pions is 140 MeV, while that of molecules and large macromolecules is 5 and 0.5eV, respectively [50]. Then, at the highest levels of a physical hierarchy there are planetary systems and galaxies which exhibit the weakest known energy interactions in the universe. Thus, the energy association between entities of a given level appears to decrease the higher that level is in the hierarchy and is probably a measure of their structural interdependence. Another aspect of the boundary between levels is a transition in the amount or type of intercommunication. For example, the number of communication networks within a cell is much greater than within a tissue, just as the degree of communication within a country that is part of the European Economic Community is greater than that between its member countries. This last example purposely uses the analogy of countries within a community defined by economic, rather than geographic, links (a continent would be an alternative hierarchical grouping of countries, but not necessarily of their societies) to illustrate another aspect of a living hierarchy — the purposive activity of its component levels.

The more definite and coincident the various boundary criteria, the greater the probability that the levels (and hence what constitutes each level) have been correctly identified. Also, the probability is greater that both the hierarchy and the levels that constitute it have an objective reality rather than being a subjective artifact. Clear definition of levels also makes substantive the heuristic criteria adopted by J. G. Miller [30, p. 25] in his study of living systems when he states that levels "are

* Organized structures that are nonhierarchical have been described by O'Neil [35] for management systems. It is possible that some of the configurations of structure which he presents may find an application in biology and also have a counterpart in the topology of the organism [39]. In a biological context, however, topological organization seems best suited to describe functional interrelations within levels (cells, organs, etc.). That is, the topological relations of cellular organelles reflect the functional organization of the cell, while those of organs reflect the organization of the organism.

derived from a long scientific tradition of empirical observation of the entire gamut of living systems. This extensive experience of the community of scientific observers has led to a consensus that there are certain fundamental forms of organization of living matter-energy."

The foregoing should give confidence to the notion that the levels of biological organization mentioned earlier — cells, tissues, organs and organisms — are valid categories. It is perhaps significant that all four categories combine both structural and functional features. This is probably more than simply a result of a predominantly visual perception of the outside world but denotes an intuition of the interconnectedness of these levels. However, if some other type of perception predominated, or some feature other than cells or groups of cells caught the eye, other categories might be possible. Indeed, Korn [23] has described the schizogenous aerenchyma found in the stems of water plants in terms of a hierarchy of cell wall types, but this seems to be a hierarchy based solely on structure and to have little direct relevance to the biological activities enclosed within the walls. Nevertheless, it might be possible to extend this analysis based on the geometry of cells, and the sequence of formation of their walls, to higher organizational levels and at the same time subordinate it to the function of the whole of which the walls are but a part. Another possibility would be to categorise living systems into a hierarchy of processes or functions (which, like structures, can also be related to energy levels). However, ordering them on the basis of function alone without the support of some other descriptor could lead to ambiguities. For example, one crucial function of biological systems is to reproduce. But reproduction is a process shared by organisms, their component cells and organelles, and by certain of their macromolecules — DNA being the most famous example. Moreover, terms that might be used to denote functional categories, such as "gametophyte" and "gamodeme", are less rich in information than the terms "organism" and "group" that are associated with their respective structural analogues.

That it is possible to merge explicitly functional relationships with structure in a hierarchical organization was shown by Lindenmayer [25] in his description of life cycles, and by Korn [23] in his analysis of cellular transformations in a growing fern gametophyte. But, because of the criteria used by these authors, this merger is relevant only to the aspects of a living system concerned with cell reproduction and the fate of the resultant clones of cells. A solution to giving the structural elements of a hierarchy a functional component was developed by J. G. Miller in a number of research papers from 1965 onwards, culminating in his book "Living Systems" published in 1978 [30]. In Miller's analysis of

living systems each hierarchical level is sustained by three major classes of subsystems concerned with reproduction, processing matter-energy, and processing information. Miller recognizes seven hierarchical levels and a total of nineteen subsystems, all of which, he asserts, must be associated with each level to sustain its existence. The subsystems help to define the levels, give them interconnections, and confer on them qualities that we associate with life. Miller explicitly includes plants in his analysis, but does not give much detail of the structures or processes associated with each of their subsystems. Indeed, it is important to know whether plants and animals, with their somewhat different internal structures, share the same subsystems. Items listed in Table 1 suggest that correspondence between structures and subsystems can be found.

The seven levels adopted by Miller [30] are cell, organ, organism, group, organization, society, and supranational system. Tissues are not considered to constitute a level because not all the subsystem processes apply to them. These seven levels were proposed in order to encompass the gamut of human activities which, within the biological world, are the most highly organized both in terms of physiological and psychological processes, as well as in the scope of their social interactions. The two last-mentioned levels (society and supranational system) probably cannot be applied to plants of a single species, but might have a counterpart within the larger context of the plant kingdom either in its phylogenetic interrelations or in its interaction with other living organisms. Interestingly, the level of "organism" seems to be an interface with other hierarchical systems both organic (i.e. other life forms) and inorganic (i.e. the physical world in which organisms live). "Group" and "organization", as applied to a particular species, may be equivalent to "gamodeme" and "hologamodeme", respectively [17], although, as mentioned earlier, these latter terms give emphasis to functional (i.e. reproductive) properties. Nor do all the subsystems apply within the plant kingdom. For example, some of the information-processing subsystems concerned with memory and learning are lacking, particularly at the higher levels, since plants do not possess these faculties. At the higher levels the subsystems which process matter-energy become intermingled with the environment; and those which process information are absent above the organism level (Table 1) having been internalized at lower levels by means of mutation and selection.

Hormones, hormone-producing cells, and hormone-producing organs all play essential rôles in the information-processing subsystems of cell, organ, and organism, respectively (Table 1); likewise their binding sites and receptor cells. (Note that here there are hierarchical relationships between each of these rôle-playing groups). Hormones are also involved

as transducers of information received from the environment surrounding an organ or organism. One class of hormone, the gas ethylene, which is released from the organism, could in theory impart information to another receptive individual and thus serve an information-processing subsystem at the level of the group.

Some examples of plant hormones and their role in information processing for development will now be discussed in the context of some of the subsystems proposed by Miller [30].

3. PLANT HORMONES AND INFORMATION PROCESSING

The word hormone derives from the Greek ὄρμων (uring on) and is defined as a substance which is made in one group of cells and transported to another where it excites some vital process. The property of transportability is central to the rôle of hormones in information transfer in both plants and animals.

The group of chemicals collectively known as auxins, cytokinins and gibberellins, none of which are unique substances but are variant forms of particular molecules, are held to be plant hormones. They can excite two basic, vital processes — cell expansion and cell division, and they are also highly mobile within the plant. Abscisic acid (ABA) is another major hormone, though some compounds which are structurally related to it share similar biological activities. In lower plants (e.g. liverworts) the rôle of ABA seems to be taken by lunularic acid [29]. The fifth class of hormone consists of a single molecular species, ethylene, a gas. Brassinosteroids (e.g. brassinolide) constitute a relatively newly discovered sixth class of hormone. They are steroids and found in large amounts on pollen and in immature seeds [1, 55]. Sometimes many of these classes of hormones when supplied to plants have similar effects. For example, all of the classes except for ABA can, under certain circumstances, stimulate cell enlargement [7]. On the other hand, certain hormones have effects that are not shared by the others. Abscisic acid, for example, causes the rapid closure of the stomata of leaves by affecting the water relations of the surrounding guard cells. Guard cells, but not the neighbouring mesophyll cells, have a high-affinity binding-site for ABA [20] which could account for the specific action of ABA in these cells.

In an earlier article [3] I proposed that plant hormones could be viewed in two ways: either as regulators of development or as enablers of function. Both categories bring about an increase in the structural complexity of a plant either by causing the addition of new levels of complexity (e.g. the emergence of new or modified tissues or organs) or by

permitting processes within one level of organization which can then impinge upon another level. The categories are not mutually exclusive, but rather refer to the level of organization within which the results of hormone action are expressed: enablers are links within the molecular and cellular levels, while regulators achieve their effects in the domain of tissues and organs. Since the processes initiated by hormones must occur first at the molecular level, the difference between regulators and enablers follows from the number of levels through which the ensuing reactions ultimately ascend. Also commented [3] was the subtle interrelation between structure and function with regard to plant organization. Although one respected author [26] has recently averred that "structure is function" (that author's italics), this view is a misapprehension. Structure is the arrangement of matter in space; function involves the transformation of matter by utilizing energy in association with a structure. Structure is the outcome of processes operating at a lower level of organization. Thus, the function of one level is to build the structure of the next; and so it follows that structure is the residue of a past function. Miller [30, p. 1026 - 7] also warns of the danger of confusing structure and function since to do so blurs the boundaries between levels, subsystems and their components; a proper appreciation of the processes that occur at each level then becomes impossible.

All biological organisms transform matter and energy. It is the goal of each level in the hierarchy. In order for the transformations to be correctly accomplished a source of information is needed that assists the development of the hierarchically organised plant and provides the necessary communication between its levels. Hormones can provide this information. There are two subsystems that are specifically involved with processing the information provided by hormones; these are the "encoder" and the "decider" subsystems (Table 1).

4. EXAMPLES OF INFORMATION-PROCESSING SUBSYSTEMS THAT INVOLVE HORMONES

4.1. ENCODERS

Hormones are informational molecules that move into and out of cells. It is their outward flow that will be discussed here. The subsystem termed "encoder" (see Table 1) is involved in this outflow of information. According to Miller [30], an "encoder" is a subsystem that alters the information received from other information-processing subsystems from a "private" code used internally by a cell or organ into a "public" code which can be interpreted by other cells or organs to which it has access.

TABLE 1

Five hierarchical levels of plant life with the nineteen subsystems described by Miller [30] as being essential for their support

Subsystems	Hierarchical level					
	Cell	Organ	Organism	Group	Organization	
1. PROCESS MATTER—ENERGY AND INFORMATION						
Reproducer	Chromosome	Meristem	Stamen Pistil Seeds fruits	One Plant if ♀ Two Plants if ♂	Interbreeding group	
2. PROCESS MATTER ENERGY						
		Organ boundary				
Boundary	Wall	Hypodermis Endodermis	Epidermis & Cuticle	←	←	
Ingestor	Membrane	Root hairs Stomata	Leaves Roots		←	
Distributor	Vesicles ER	Apoplast Symplast	Vascular system	} Mycorrhizae	←	
Converter	Enzyme	→	Leaf parenchyma		—	—
Producer	Nucleus Mitochondrion	←	←	} Decaying individual	←	
Matter-Energy Store	Vacuole Plastid Lipid	←	Tubers Bulbs Seeds Grains		←	
Extruder	Dictyosome	Root cap Bark	Stomata Lenticels			←
Motor	Cytoplasm Actin	Phloem strands	Motor cells Cells with differential growth		—	—
Supporter	Cytoskeleton	Cell walls Xylem reaction wood	← Heart wood	(Soil)	←	
3. PROCESS INFORMATION						
Input Transducer	Nuclear and cell membranes Phytochrome	Sensitive cells (e.g. Statenchyme)	←	—	—	
Internal Transducer	Enzymes	Receptor cells	←	—	—	
Channel & Net	ER Membranes	Symplast	Vascular system Symplast	—	—	
Decoder	Binding sites	Target or receptor cells	—	—	—	

Associater	—	—	—	—	—
Memory	Biochemical oscillators	Time keeping cells	←	—	—
Decoder	Regulator genes	→	Hormone pro- ducing tissues	—	—
Encoder	Components producing hormones	Hormone-pro- ducing cells	Coloured or odorous glands	—	—
Output Transducer	Membrane	as Encoder	Secretory tissue Ethylene releaser	—	—

An arrow indicates that a subsystem exists but is dispersed either to the next lower level (←) or to the next higher level (→).

— indicates absence or non-discovery.

In information theory there are three types of code, alpha, beta and gamma, each of increasing complexity. All may have relevance for plant material. An alpha code depends on the different spatial patterns of molecular species, such as a messenger molecule that fits into a receptor molecule. A beta code depends on variation in an informational process such as, for example, a different temporal pattern, or a different intensity of a signal [30]. Plant hormones may act as both alpha and beta encoding molecules for they respectively bind to receptors [53] and exert effects through changes in amount [52] and sometimes show oscillations of behaviour [16, 56]. A gamma encoder depends on the conversion of one type of message into another (e.g. nerve impulses converted to speech). Plants may convert the coding potential of a hormone into a secondarily encoded form such as an ionic signal (e.g. calcium and calcium-protein complexes).

(a) *Encoders at the cellular level.* An example of an encoder acting at the cellular levels is found in the slime-mould, *Dictyostelium discoideum*. When food is scarce some of the starving amoebae respond to this environmental cue with pulsed emissions of the nucleotide cyclic-adenosine monophosphate (c-AMP). These cause the amoebae to aggregate and form a multicellular pseudoplasmodium (or slug) whose subsequent development culminates in the formation of a fruiting body and the production of spores [34]. The c-AMP can be identified as a component of the cellular encoder system. It is also used for processes other than cell-cell signalling in both the free-living amoeba and in the slug, but it is only in response to the stress of starvation that its rôle as a "private" code in these processes changes to one that is "public", eliciting the aggregative behaviour in neighbouring cells. Encoding is carried out by whatever part of the cell produces the c-AMP. The c-AMP acts as an alpha code (by its binding to receptors), but its pulsatile emission may also have another, beta code, property.

In cells of higher plants the auxin indoleacetic acid (IAA) may play a similar rôle in an encoder system. The rôle (i.e. the "private" code) of IAA in differentiated parenchyma cells has not been closely defined, but it probably helps maintain some property such as cellular polarity or the import of sucrose. Wounding the vascular cylinder, and in particular severing the xylem, appears to transform the "private" auxin code for cell-maintenance into a more "public" code that actively encourages the differentiation of new xylem vessels from parenchyma cells [42]. The encoder in this circumstance is the part of the cell that produces the auxin for transmission to surrounding cells where its messenger properties can be decoded and responded to as a signal for differentiation. The course of differentiation is such that the new vessels link end to end eventually forming channels that functionally compensate for the damaged tissue. The pattern of these channels looks as though it traces the flow of the auxin signal for differentiation through the parenchyma [43]. There is good evidence that the auxin not only induces differentiation but also facilitates its own transport [41]. First, all cells near the wound are exposed to the auxin which accumulates in its vicinity. Later, a more limited number of cells show an enhanced capacity for transport which favours the canalization of their further development in both functional (as enhanced auxin transporters) and structural (as xylem) terms. The process becomes autocatalytic: the commencement of cell differentiation is the result of homeogenetic induction by already differentiating cells. Once differentiation is complete the former status of the remaining parenchyma cells is restored. The differentiating and differentiated vascular systems themselves serve as an informational subsystem — the channel and net — at the level of the organism (Table 1).

Xylem cells are dead, their contents having autolysing as part of the differentiation programme. This in itself might constitute an encoding system since there is some evidence that dying cells synthesise and release auxin [48] which may in turn affect the development of cells elsewhere. Likewise, ethylene, which normally regulates the rate of root extension, [31] can, in the presence of certain environmental conditions (e.g. poor aeration), also trigger the autolysis of cortical cells to form an aerenchyma [10]. These two examples, as well as the example in the preceding paragraph, may be the result of concentration effects; thus the hormones auxin and ethylene would be acting as beta codes.

In these examples the information output is mediated by the cell membrane where there is also evidence for a receptor molecule that can export auxin from the cell [21]. This represents an output transducer subsystem (Table 1).

(b) *Encoders at the organ level.* The root cap is an organ surmounting the tip of a root and is composed of three histologically distinct groups of cells [2]. One of the cap's functions is to convey information to the root concerning its orientation with respect to the gravity vector and to regulate the rate of extension of the root. Events in these two processes have not been thoroughly clarified, but the hormones IAA and ABA, both of which have been found in the cap, may be involved. It has been suggested that IAA in the cap helps to maintain protein synthesis which could in turn lead to ABA synthesis [11]. The ABA may be a regulator of cap cell growth and dictyosome activity. Upon reorienting a root within a gravity field, ABA from the cap becomes available to cells within the root proper where it regulates cell extension [37] in such a way that root growth returns to its original orientation. The result is the well known gravitropic response.

This interpretation is somewhat controversial since it gives to both IAA ABA the rôle of a "private" code used for cap development. In response to a disturbance (reorientation) ABA, at least, becomes a "public" code to which cells in another organ (the root) respond by adjusting their elongation rate. If this interpretation is correct, ABA would be acting as an alpha code. However, if ABA is normally transported to the root from the cap, but the quantity transported is changed upon reorientation, it would be acting as a beta code. The cells (possibly those in the centre of the cap) that synthesise these two classes of hormones are encoders at the level of the organ.

Other important subsystems in the graviresponse are the transducers of information. The input transducer (Table 1) corresponds with cells sensitive to gravity. In the root these are cells in the centre of the cap which contain sedimentable starch grains enclosed within plastids. The output transducer (Table 1) is those cells which secrete the gravitropic hormone. Whether the output and the input transducers are the same is not known.

Another, more complex, example of hormonal involvement in an organ encoder subsystem (though one that could possibly also be interpreted in terms of the decider subsystem (see section 4.2.) is one where leaf form alters in response to the age of the plant or to its environment. Shoots of the water plant, *Callitriche heterophylla*, produce linear leaves when the apex is submerged, but broader leaves when the apex emerges above water level [9]. There is some evidence to suggest that gibberellic acid (GA) and ABA play rôles in determining leaf form: linear, water-form leaves are induced on emerged apices by treating them with GA and, conversely, broad, land-form leaves are induced on submerged plants by application of ABA [8]. While details of the sites of synthesis

(which would correspond to the encoder) and the nature of the processes affected by these two hormones in the shoot are unknown, the change from one environment to the other suggests that the former is in the apex and that here concomitant changes occur in the informational properties of the hormones. According to environmental circumstances, the hormones cause the cells of the developing primordia to execute one of two morphogenetic programmes. The programmes take some time to be fully expressed: about 5 - 6 plastochrons in the case of the water-to-air transfer, and 4 - 5 plastochrons when the change is from air to water [8]. The primordia are thus sites where a decision relating to morphogenesis is taken.

In other species factors that regulate leaf form are known to be transported to the shoot apex (where the leaves are initiated) from more remote regions of the plant. Thus, while successive leaves of *Passiflora caerulea* normally change their form as the plant ages, grafting old shoots onto a young root stock induces young-type leaves to be formed once again at the apex [24]. Similarly, the removal or absence of roots from shoots of *Hedera helix* (English ivy) prevents the apex from making the transition from juvenile to adult phase — an event again characterised by a change of leaf form [13]. In both *Passiflora* [5] and *Hedera* [13], GA made in one encoding organ or group of cells, and usually associated with a certain type of activity (e.g. internode elongation), can influence another type of activity (leaf form) in response to some in the information status of the plant (e.g. its age).

(c) *Encoders at the organism level.* Encoders perhaps do not exist at the level of the organism — at least in the sphere of plant-to-plant communication (unless the interaction of gametophyte and sporophyte generation is included as an example of communication at the organism level). Encoders that permit plant-animal interactions do exist, however. Examples are the glands that secrete substances which repel predators, and odours or coloured pigments of organs that attract pollinators (Table 1). At this level of organization plant hormones have no rôle in the encoder subsystem, but do have a rôle in the decider subsystem. This is dealt with in the next section.

4.2. DECIDERS

Plants have the means of assessing their total internal state by interpreting the information that flows into and between all their organs. Thus plants can assess not only their relation to the seasons but also their age and hence their developmental status. The totality of information perceived concerning a season-linked environmental change, or a cur-

rently held developmental stage, may then cause further a developmental step. Moreover, as already mentioned, plants such as *Callitriche heterophylla* can sense the position of its shoot within the environment and modify the form of its apex accordingly. The subsystem which receives information from all other subsystems and transmits information that controls the further activity of the whole organism is termed the "decider" [30] (Table 1). In the organism as a whole this subsystem is dispersed within tissues throughout the plant body, but at the level of the cell the decider may reside within the genetic material.

TABLE 2

Principle stages in plant development and their association with hormone action

	IAA	K	GA	ABA	C ₂ H ₄	Brassinolide
<i>Sporophyte</i>						
Seed Growth	+	+	+			
Dormancy		.		++		
Germination	+	+	++		(+)	
Juvenile Growth	++	+	++			
Adult Growth	++	+	+			
Abscission	+			+	++	
Flowering	(+)	(+)	(+)		(+)	
Sexuality	+(♀)		++		+	
<i>Gametophyte</i>						
Pollen Growth						++

+ Positive association.

(+) Positive association that depends on the species.

++ A particularly characteristic association.

Where no + is indicated either the response to the hormone is inhibitory, or not enough is known about the relation of the hormone to the growth process to make a generalization.

Data from [19] and [27].

It is possible that hormones, perhaps by virtue of their mobility, form an integral part of the decider subsystem. Moreover, it seems that there may be particular stages in plant development that are directed by a particular hormone [27] (Table 2). This relationship may, perhaps, reflect the impact that the evolution of the hormone complement has had on plant development. For example, gibberellins are associated with sexual development in higher plants and it may be no coincidence that they are structurally similar to antheridiogen, an antheridium-inducing hormone in ferns [33]. Sexuality and gibberellins may have had a long and interconnected history. Then, at some later stage in phylogeny gibberellins may have additionally become connected with the regulation of the juvenile stage of development (for a similar view of the rôles of

antheridiogen in sexuality and spore germination in ferns see [47]). Gibberellins are abundant and active in the embryonic stage of the sporophyte generation, in seed germination, and in early seedling growth. One way in which gibberellins may act is by constituting the "decider" subsystem. At the cellular level they may influence the course of development through interaction with DNA [46]: thus, gibberellins may set the genetic material to juvenile mode so that genes concerned with early development are rendered available for activation.

Abscissic acid (ABA) usually has retarding functions, thus acting as a developmental brake. It can retard germination, prevent vivipary, and induce the activity of the genes that code for seed storage protein [38]; it can also retard root and shoot growth and bring about periodic (i.e. seasonal) dormancy in their apices [36, 54]. In the latter example, the decider subsystem controls meristematic activity as well as other physiological attributes of dormancy expressed elsewhere in the plant. Furthermore, ABA can act as a factor for organ senescence, and maybe for senescence of the whole plant.

Ethylene is a hormone that can reduce the structural complexity of the organism by its promotion of leaf and fruit abscission, for example. And by its induction of aerenchyma in stems and roots of poorly aerated plants it is able to reduce complexity at the organ level. The decider may reside in the group of cells that maintain or monitor the ethylene status of these two organs, while the cortex, which is where the histolytic changes involved in aerenchyma formation occur, may serve as encoders and output transducers (Table 1).

The other classes of hormones, auxins and cytokinins (abbreviated IAA and K in Table 2), seem to be all-pervasive in plant development, possibly because of their participation in vital processes such as polar transport, maintenance of cell growth and division, and protein synthesis. Moreover, auxin appears to have some fundamental rôle in shoot determination, while cytokinin is a determinant of roots [51]: they both act in "deciding" whether uncommitted cells should be shoots or roots.

Most of hormone research is concerned with the responses of the sporophyte generation, but it is valid to ask whether the gametophyte generation has the same complement of hormones as the sporophyte, or whether it has its own specific complement. Brassinolide, a steroid, found on the surface of pollen grains, stimulates the growth of pollen tubes at a concentration an order of magnitude lower than that of any other hormone [18]. Thus, it might be a gametophyte-linked hormone participating in the decider or encoder subsystems of this phase of the plant's life cycle.

5. CONCLUDING REMARKS

The ubiquity and multiple activities of auxins and cytokinins as well as the effects that the three other classes have in common with them, can understandably give rise to the feeling that their rôles in development will continue to be elusive. However, a multiplicity of hormone-mediated effects is probably an indication of a highly integrated communication system operating in plant development. Redundancy of information is one way of ensuring that a message is received and correctly interpreted above a prevailing background noise. Besides, it might be useful to examine in more detail the ways in which information is communicated between the parts of plants: "private" and "public" codes, as well as alpha and beta codes have been mentioned earlier. When viewed from the perspective of information transfer, discussions about hormone action that pivot around opinions of an "either/or" type seem futile (see, for example, the title of the discussion article by Trewavas and Cleland [52]), particularly when the underlying concepts are poorly defined and the appropriate experiments have not been performed [12]. The part that "either/or" thinking, which implies that only one view can be right and alternative views must be wrong, has played in confusing the study of morphology has been discussed by Rutishauser and Sattler [40].

New means and approaches of analysing plant growth and development might be helpful [3], particularly if the rôle of hormones in these processes is to be properly understood. The concepts that prevail in any epoch determine the type of research and the sort of discoveries that can be made. Hormones themselves were discovered in plants as a result of the study of development, not *vice versa*. Since development is concerned with the emergence of hierarchical levels and their interconnections, investigations and analyses which take this into account seem likely to contribute most to our understanding of plant life in its widest sense. The systems-analytical approach adopted by J. G. Miller [30], which introduced the concept of common subsystems operating at each level of the hierarchy, may help to focus attention more clearly on the integration of processes occurring in development. Further research is clearly necessary to clarify not only the information-processing pathways in which hormones and other signals are involved but also the nature of the subsystems operating in plant growth and development.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am grateful to Prof. Z. Hejnowicz for his helpful discussion of the topics in this paper. I also thank Prof. M. J. Olszewska and The British Council for enabling me to visit Poland, an occasion which gave the stimulus to write this article.

LITERATURE

- [1] ADAM, G., MARQUARDT, V., Brassinosteroids, *Phytochemistry*, **25**: 1787 - 1799, 1986.
- [2] BARLOW, P. W., The root cap, In: *The Development and Function of Roots*, eds. J. G. Torrey and D. T. Clarkson, Academic Press, London, 1975, 21 - 54.
- [3] BARLOW, P. W., Requirements for hormone involvement in development at different levels of organization, In: *Hormone Action in Plant Development — A Critical Appraisal*, eds. G. V. Hoar, M. B. Jackson and J. R. Lenton, Butterworths, London [in press].
- [4] BUNGE, M., Levels: a semantical preliminary, *Rev. Metaphysics*, **13**: 396 - 406, 1960.
- [5] CASO, O. H., MONTALDI, E. R., LEWIN, I. J., Efecto del acido giberelico sobre el crecimiento y la morfologia foliar de *Passiflora caerulea* L., *Rev. Investig. Agropec., INTA, Buenos Aires, Ser. 2, Biol. Produc. Veg.*, **3**: 1 - 15, 1966.
- [6] CHITIN, G. J., Randomness and mathematical proof, *Sci. Amer.*, **232**, No. 5: 47 - 54, 1975.
- [7] CLELAND, R. E., The rôle of hormones in wall loosening and plant growth, *Austral. J. Plant Physiol.*, **13**: 93 - 103, 1986.
- [8] DESCAMP, P. A., COOKE, T. J., Causal mechanisms of leaf dimorphism in the aquatic angiosperm *Callitriche heterophylla*, *Amer. J. Bot.*, **71**: 319 - 329, 1984.
- [9] DESCAMP, P. A., COOKE, T. J., Leaf dimorphism in the aquatic angiosperm *Callitriche heterophylla*, *Amer. J. Bot.*, **72**: 1377 - 1387, 1985.
- [10] DREW, M. C., JACKSON, M. B., GIFFARD, S. C., Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may adaptive responses to flooding in *Zea mays* L., *Planta*, **147**: 83 - 88, 1979.
- [11] FELDMAN, L. J., Root cap inhibitor in isolated root caps of *Zea mays*, *J. Exp. Bot.*, **32**: 779 - 788, 1981.
- [12] FIRN, R. D., Growth substance sensitivity: the need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments, *Physiol. Plant.*, **67**: 267 - 272, 1986.
- [13] FRYDMAN, V. M., WAREING, P. F., Phase change in *Hedera helix* L. II. The possible rôle of roots as a source of shoot gibberellin-like substances, *J. Exp. Bot.*, **24**: 1139 - 1148, 1973.
- [14] GREGG, J. R., *The Language of Taxonomy. An Application of Symbolic Logic to the Study of Classificatory Systems*, Columbia University Press, New York 1954.
- [15] GUÉDÈS, M., *Morphology of Seed Plants*, Cramer, Vaduz, 1979.
- [16] HEJNOWICZ, Z., A model for morphogenetic map and clock, *J. Theoret. Biol.*, **54**: 345 - 362, 1975.
- [17] HESLOP-HARRISON, J., *New Concepts in Flowering Plant Taxonomy*, Heinemann, London, 1953.
- [18] HEWITT, F. R., HOUGH, T., O'NEIL, P., SASSE, J. M., WILLIAMS, E. G., ROWAN, K. S., Effect of brassinolide and other growth regulators on the germination and growth of pollen tubes of *Prunus avium* using a multiple-hanging-drop assay, *Austral. J. Plant Physiol.*, **12**: 201 - 211, 1985.
- [19] HILL, T. A., *Endogenous Plant Growth Substances*, 2nd ed., Arnold, London, 1980.
- [20] HORNBERG, C., WEILER, E., High-affinity binding sites for abscisic acid

- on the plasmalemma of *Vicia faba* guard cells, *Nature (Lond.)*, **310**: 321 - 324, 1984.
- [21] JACOBS, M., GILBERT, S. F., Basal localization of the presumptive auxin transport carrier in pea stem cells, *Science*, **220**: 1297 - 1300, 1983.
- [22] JERNSTEDT, J. A., MANSFIELD, M. A., Two-dimensional gel electrophoresis of polypeptides from stems, roots, leaves and rhizophores of *Selaginella kraussiana*, *Bot. Gaz.*, **146**: 460 - 465, 1985.
- [23] KORN, R. W., Hierarchical aspects of plant development, In: *The Book of L*, eds. G. Rozenberg and A. Salomaa, Springer, Berlin, 1986, 207 - 216.
- [24] LEWIN, I. J., MONTALDI, E. R., CASO, O. H., Reversibilidad de la forma adulta de la hoja en plantas viejas de *Passiflora caerulea* L., *Rev. Investig. Agricol.*, Buenos Aires, **17**: 407 - 411, 1963.
- [25] LINDENMAYER, A., Life cycles as hierarchical relations, In: *Form and Strategy in Science*, eds. J. R. Gregg and F. T. C. Harris, Reidel, Dordrecht, 1964, 416 - 469.
- [26] LLOYD, C. W., Cytoplasmic structure de-mystified (review of the book *The Cytoskeleton: an Introductory Survey*, by M. Schliwa), *Trends Biochem. Sci.*, **11**: 346, 1986.
- [27] MATTHYSE, A. G., SCOTT, T. K. Functions of hormones at the whole plant level of organization, *Encyc. Plant Physiol. (New Series)*, **10**: 219 - 243, 1984.
- [28] MEEUSE, A. D. J., *The Anatomy of Morphology*, Brill, Leiden, 1986.
- [29] MILBORROW, B. V., Inhibitors, In: *Advanced Plant Physiology*, ed. M. B. Wilkins, Pitman, London, 1984, 76 - 110.
- [30] MILLER, J. G., *Living Systems*, McGraw-Hill, New York, 1978.
- [31] MULKEY, T. J., KUZMANOFF, K. M., EVANS, M. L., Promotion of growth and shift in the auxin dose/response relationship in maize roots treated with the ethylene biosynthesis inhibitors aminoethoxyvinylglycine and cobalt, *Plant Sci. Letts.*, **25**: 43 - 48, 1981.
- [32] NÄGELI, C., LEITGEB, H., Entstehung und Wachstum der Wurzeln, *Beitr. Wiss. Bot.*, **4**: 124 - 158, 1868.
- [33] NAKANISHI, K., ENDO, M., NAF, U., JOHNSON, L. F., Structure of the antheridium-inducing factor of the fern *Anemia phyllitidis*, *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**: 5579 - 5581, 1971.
- [34] NEWELL, P., Cellular communication during aggregation of *Dictyostelium*, *J. Gen. Microbiol.*, **104**: 1 - 13, 1978.
- [35] O'NEILL, B., Structures for nonhierarchical organizations, *Behav. Sci.*, **29**: 61 - 77, 1984.
- [36] PHILIPSON, J. J., COUTTS, M. P., The induction of root dormancy in *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. by abscisic acid, *J. Exp. Bot.*, **30**: 371 - 380, 1979.
- [37] PILET, P.-E., Abscisic acid as a root growth inhibitor: physiological analyses, *Planta*, **122**: 299 - 302, 1975.
- [38] RAGHAVAN, V., *Embryogenesis in Angiosperms*, Cambridge University Press, Cambridge, 1985.
- [39] RASHEVESKY, N., Topology and life: in search of general mathematical principles in biology and sociology, *Bull. Math. Biophys.*, **16**: 317 - 348, 1954.
- [40] RUTISHAUSER, R., SATTLER, R., Complementary and heuristic value of contrasting models in structural botany I. General considerations, *Bot. Jahrb. Syst.*, **107**: 415 - 455, 1985.
- [40a] RUTISHAUSER, R., Phyllotactic patterns in phyllodinous Acacias (*Accacia* subg. *Heterophyllum*) — promising aspects for systematics, *Bull. Internat. Group for the Study of Mimosoideae*, **14**: (in press).

- [41] SACHS, T., Patterned differentiation in plants, *Differentiation*, **11**: 65 - 73, 1978.
- [42] SACHS, T., The control of the patterned differentiation of vascular tissues, *Adv. Bot. Res.*, **9**: 151 - 262, 1981.
- [43] SACHS, T., COHEN, D., Circular vessels and the control of vascular differentiation in plants, *Differentiation* **21**: 22 - 26, 1982.
- [44] SATTLER, R., A new conception of the shoot of higher plants, *J. Theoret. Biol.*, **47**: 367 - 382, 1974.
- [45] SATTLER, R., On "understanding" organic form, *Sophia Perennis*, **3**: 29 - 50, 1977.
- [46] SCHAFER, A., NEUMANN, K.-H., The influence of gibberellic acid on reassociation kinetics of DNA in *Daucus carota* L., *Planta*, **143**: 1 - 4, 1978.
- [47] SCHRAUDOLF, H., Phytohormones and *Filicinae*: chemical signals triggering morphogenesis in *Schizaeaceae*. In: *Plant Growth Substances 1985*, ed. M. Bopp, Springer, Heidelberg, 1986, 270 - 274.
- [48] SHELDRAKE, A. R., NORTHCOTE, D. H., The production of auxin by autolyzing tissue, *Planta*, **80**: 227 - 236, 1968.
- [49] SIMON, H. A., The architecture of complexity, *Proc. Amer. Philos. Soc.*, **100**: 467 - 482, 1962.
- [50] SIMON, H. A., The organization of complex systems, In: *Hierarchy Theory. The Challenge of Complex Systems*, ed. H. Pattee, Braziller, New York, 1973, 3 - 27.
- [51] SKOOG, F., MILLER, C. O., Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **11**: 118 - 131, 1957.
- [52] TREWAVAS, A. J., CLELAND, R. E., Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances? *Trends Biochem. Sci.*, **7**: 354 - 357, 1983.
- [53] VENIS, M., *Hormone Binding Sites in Plants*, Longman, New York 1985.
- [54] WAREING, P. F., PHILIPS, I. D. J., Abscisic acid in bud dormancy and apical dominance, In: *Abscisic Acid*, ed. F. T. Addicott, Praeger, New York, 1983, 301 - 329.
- [55] YOKATA, T., TAKAHASHI, N., Chemistry, physiology and agricultural application of brassinolide and related sterols, In: *Plant Growth Substances 1985*, ed. M. Bopp, Springer, Heidelberg, 1986, 129 - 138.
- [56] ZAJĄCZKOWSKI, S., WODZICKI, T. J., Auxin and plant morphogenesis — a model of regulation, *Acta Soc. Bot. Polon.*, **47**: 233 - 243, 1978.

Received October 26, 1986.

Accepted November 6, 1986.

Author's Address: Long Ashton Research Station,
University of Bristol,
Long Ashton,
Bristol, BS18 9AF,
England.

CHARAKTERYSTYKA ROŚLINNEGO
SYSTEMU CHOLINERGICZNEGO.
CHOLINOESTERAZY ROŚLINNE

CHARACTERIZATION OF PLANT CHOLINERGIC SYSTEM
PLANT CHOLINESTERASES

Andrzej TRETYN i Katarzyna KWIATKOWSKA *

Uniwersytet M. Kopernika, Instytut Biologii, Zakład Cytologii
Roślin i Genetyki
Instytut Biologii Doświadczalnej im. H. Nenckiego PAN, Zakład
Biologii Komórki *

Streszczenie. Aktywność cholinoesterazową, przypisywaną dotąd wyłącznie komórkom zwierzęcym, odkryto również u przedstawicieli kilkudziesięciu gatunków roślin niższych i wyższych. Ponadto u większości badanych roślin stwierdzono występowanie naturalnego substratu dla tego enzymu — acetylocholiny. Wykazano również, że większość właściwości molekularnych i biochemicznych cholinoesteraz roślinnych jest zbliżona do właściwości acetylocholinoesteraz zwierzęcych. Podobieństwa te oraz ekstraplazmalemmowa lokalizacja cholinoesteraz roślinnych pozwalają przypuszczać, że funkcjonowanie roślinnego systemu cholinergicznego, analogicznie do sytuacji w świecie zwierząt, sprowadzić można do reakcji pierwotnych zachodzących na poziomie błon.

Summary. Cholinesterasis activity, hitherto associated solely with animal cells, was discovered in representatives of several tens of lower and higher plant species. Moreover, the enzymes' natural substrate — acetylcholine was discovered in most of the examined plants. It was also found that most molecular and biochemical properties of plant cholinesterases are similar to those of animal acetylcholinesterases. This similarity as well as extraplasmalemmal localization of plant cholinesterases give reason to believe that functioning of plant cholinergic system, similarly as in the animal world, can be referred to primary reactions on membrane level.

WSTĘP

System cholinergiczny to układ enzymów i receptorów związanych z funkcjonowaniem acetylocholiny. W organizmach zwierzęcych występuje on przede wszystkim na styku komórek nerwowych i nerwowomię-

śniowych, gdzie acetylocholina pełni rolę mediatora synaptycznego. Omawiany system współuczestniczy w procesie szybkiego przewodzenia informacji odbieranej przez wyspecjalizowane w toku ewolucji receptory (narządy zmysłu) i przekazywania jej wzdłuż neuronu w postaci kodu impulsów elektrycznych. Odpowiada on za wierne przekazywanie tej informacji między dwiema błonami — pre- i postsynaptyczną.

System cholinergiczny składa się z:

- acetylocholinotransferazy (E.C. 2.3.1.6.) — enzymu katalizującego syntezę acetylocholinoz z acetylo-CoA i choliny,
- acetylocholinoz (ACh) — estru kwasu octowego i choliny uwalnianego z błony presynaptycznej w momencie jej depolaryzacji,
- receptorów acetylocholinoz (RACH) — zlokalizowanych w błonie postsynaptycznej,
- acetylocholinoesterazy (AChE, E.C. 3.1.1.7.) — enzymu występującego w błonie pre- i postsynaptycznej, odpowiedzialnego za hydrolizę ACh do choliny i reszty kwasu octowego.

System cholinergiczny występuje także poza tkankę nerwową, np. w erytrocytach, plemnikach i w komórkach łożyska [27].

Trzy z czterech elementów systemu cholinergicznego (z wyjątkiem RACH) zostały zidentyfikowane również w tkankach roślin wyższych. Acetylocholinotransferazę wykryto w suchych nasionach rodzaju *Allium* i *Pisum* [9]. Obecność acetylocholinoz stwierdzono w tkankach kilkudziesięciu gatunków roślin niższych i wyższych [11, 12, 13, 17, 21], co sugeruje jej powszechne występowanie w królestwie roślin. Substancję tę wykryto we wszystkich badanych tkankach i organach (liście, łodygi, korzenie) i stadiach rozwojowych (siewki, dojrzałe rośliny, nasiona).

W komórkach zwierzęcych acetylocholina może być hydrolizowana przez cholinoesterazy zarówno specyficzne, jak i niespecyficzne. W komórkach roślinnych obecność tego typu enzymów stwierdzono początkowo jedynie u przedstawicieli trzech rodzin: *Leguminosae*, *Cruciferae* i *Solanaceae* [6]. W 1982 r. Miura i wsp. [20] ze zbadanych 70 gatunków roślin należących do 50 rodzin roślin wyższych i 3 rodzin paproci tylko u 6 gatunków nie wykryli aktywności cholinoesterazowej. W klasie jednoliściennych wspomnianą aktywność stwierdzono w etiolowanych siewkach kukurydzy i owsa [6, 29] oraz w suchych nasionach 22 gatunków *Allium* [9, 10] i pszenicy [28]. Ponadto aktywność cholinoesterazową wykryto w komórkach glonu *Nitella* [2, 6].

Wyniki przedstawionych powyżej badań świadczą o powszechnym występowaniu cholinoesteraz w królestwie roślin. W ciągu kilkunastu lat badań wiele uwagi poświęcono lokalizacji i właściwościom biochemicznym cholinoesteraz roślinnych. Niektóre z nich wykazywały duże podobieństwa do cholinoesteraz zwierzęcych.

1. WŁAŚCIWOŚCI BIOCHEMICZNE CHOLINOESTERAZ ROŚLINNYCH

Uzyskane dotąd dane o właściwościach biochemicznych ChE roślin oparte są w przeważającej mierze na badaniach roślin dwuliściennych. Prowadzono je na korzeniach *Phaseolus aureus* [25, 26], korzeniach i hypokotylach *Phaseolus vulgaris* [4, 18] oraz korzeniach *Pisum sativum* [16], *Cicer arietinum* [8] i *Solanum melongena* [7]. Natomiast w klasie jednoliściennych scharakteryzowano dotąd jedynie cholinoesterazę z etiolowanych siewek kukurydzy [7] i suchych nasion rodzaju *Allium* [10].

1.1. METODY OCZYSZCZANIA CHOLINOESTERAZ ROŚLINNYCH

Standardową metodę ekstrakcji i oczyszczania ChE z materiału roślinnego opracowali Riov i Jaffe [26] dla korzeni fasoli (*Phaseolus aureus*). Metoda ta z pewnymi modyfikacjami uwzględniającymi rozwój technik biochemicznych, stosowana jest do chwili obecnej. Polega ona na ekstrakcji enzymu z tkanek przez wysokie stężenie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ w temp. 4°C i oczyszczeniu go przez wytrącenie tą solą i sączenie na kolumnie z Sefadexsem.

Pierwszy etap ekstrakcji i oczyszczania ChE roślinnych [26] stanowiła homogenizacja materiału w buforze o niskiej sile jonowej (10 mM bufor K-fosforanowy, pH 7,0). Homogenat filtrowano przez siatkę nylonową. Następnie enzym ekstrahowano z materiału pozostającego na filtrze 4% roztworem siarczanu amonu w stosowanym buforze. Po kolejnej filtracji przesącz odwirowywano przy przyspieszeniu 20 000 g. W następnym etapie procedury ChE wytrącano z supernatantu przez dodanie siarczanu amonu do 80% nasycenia. Po kolejnym wirowaniu (20 000 g) uzyskany osad rozpuszczano w buforze i dializowano lub odśalano na Sefadeksie G-25. Zagęszczony preparat enzymu sączono ponownie na kolumnie z Sefadexsem G-200. Zastosowanie takiej procedury ekstrakcji i oczyszczania enzymu dawało 36 - 40-krotny wzrost jego aktywności właściwej.

Postęp w oczyszczaniu omawianego enzymu przyniosło zastosowanie chromatografii powinowactwa [18] wprowadzonej uprzednio do oczyszczania acetylocholinoesterazy zwierzęcej. Najskuteczniejszymi ligandami okazały się pochodne akrydyny, a związkami wymywającym 1M NaCl w buforze K-fosforanowym pH 7,0. Stosując tę metodę osiągnięto 78-krotny wzrost aktywności właściwej enzymu [18]. Wydaje się, że dalszy postęp w dziedzinie oczyszczania ChE roślinnych będzie możliwy po zastosowaniu technik immunochemicznych. Mintz i Brimijoin [19] opracowali metodę oczyszczania AChE z mózgu królika pozwalającą na 53 000-krotne oczyszczenie enzymu. Dokonali tego, sącząc ekstrakt enzymu przez kolumnę zawierającą przeciwciała przeciw AChE, a następnie stosując chromatografię powinowactwa.

1.2. METODY OZNACZANIA AKTYWNOŚCI CHOLINOESTERAZ ROŚLINNYCH

Najczęściej używaną metodą oznaczania aktywności ChE jest metoda opracowana przez Ellmana i wsp. [3] zaadaptowana przez Riov i Jaffe [26] dla cholinoesteraz roślinnych. Jej istota polega na zastosowaniu estrów tiocholinowych. Produkt reakcji enzymatycznej — tiocholina — łączy się z dodanym do środowiska inkubacyjnego kwasem 5,5' dwa-bis-(2-nitrobenzoesowym) — DTNB — dając w rezultacie żółty jon 2-nitro-tiobenzoesowy. Aktywność enzymu oznacza się spektrofotometrycznie przez pomiar ekstynkcji roztworu (A_{412}). Nie jest to jednak metoda zbyt dokładna, ponieważ roztwór może być odbarwiany przez niezidentyfikowane związki obecne w ekstrakcie lub dodatkowo barwiony przez inne niż acetylotiocholina związki sulfhydrylowe.

Metodą znacznie czulszą i wolną od tego typu błędów jest metoda radioizotopowa opracowana przez Reeda [24], w której substratem jest acetylo-1- ^{14}C cholina. Stosowanie tej metody pozwoliło Miurze i wsp. [20] na oznaczanie aktywności ChE w skrawkach liści z pominięciem długotrwałej procedury oczyszczania enzymu.

1.3. CIĘŻAR CZĄSTECZKOWY

Wstępny wniosek dotyczący ciężaru cząsteczkowego ChE roślinnych wynikał z procedury oczyszczania. Enzym otrzymywany z homogenatu po uprzednim wypłukaniu go 10 mM buforem K-fosforanowym jest eluowany w objętości zerowej (V_0) na Sefadeksie G-200, co wg niektórych autorów [16, 18, 26] dowodzi, że jego ciężar cząsteczkowy jest większy niż 200 000 daltonów. Jednakże wg obowiązujących norm biochemicznych w objętości zerowej Sefadeksu G-200 eluowane są białka o ciężarze cząsteczkowym przekraczającym 800 000 daltonów.

Z drugiej strony wiele danych wskazuje na obecność aktywnych form ChE o znacznie mniejszym ciężarze cząsteczkowym. Enzym z *Phaseolus aureus* ekstrahowany z homogenatu nie przepłukiwanego 10 mM buforem K-fosforanowym obok „form większych” wykazuje obecność „form drobniejszych” o ciężarze cząsteczkowym wynoszącym 80 000 daltonów [26]. Ernst i Hartmann [4] w badaniach nad enzymem izolowanym z hypokotyli *Phaseolus vulgaris* wykryli tylko 1 formę molekularną enzymu, którego ciężar cząsteczkowy oznaczyli na 65 000 daltonów. Podobne wyniki uzyskali Mansfield i wsp. [18] w przypadku ChE uzyskanej z korzeni tej fasoli. Ciężar cząsteczkowy tej ChE oznaczony metodą graficzną Bonela z zastosowaniem współczynnika sedymentacji, wyznaczonego metodą ultrawirowania w gradiencie sacharozy, oraz obliczonego wcześniej jego promienia Stokesa, jak również ustalony metodą elektroforezy w żelu z SDS, wynosi 73 000 daltonów. Ernst i Hartmann

[4] wnioskowali, że trzymana przez nich forma jest najmniejszą formą aktywną enzymu występującego w postaci monomeru.

Otwarte pozostaje pytanie, która forma enzymu — o dużym ciężarze cząsteczkowym (ok. 200 000 lub 800 000 daltonów) czy też o małym ciężarze (ok. 80 000 daltonów) jest formą rodzimą cholinoesteraz roślinnych? Czy formy większe powstają w wyniku agregacji form drobniejszych [4], czy też, jak wnioskuje Riov i Jaffe [26], formy mniejsze powstają na skutek rozbicia form większych (np. drogą proteolizy)? Należy nadmienić, że również acetylocholinoesterazy zwierzęce charakteryzują się zróżnicowaną strukturą molekularną [23]. AChE rodzima występuje w postaci monomerów (różne tkanki), dimerów (błony erytrocytów ludzkich i bydłych) o ciężarze od 118 000 do 160 000 daltonów oraz tetramerów (mózg bydła, szczurów i człowieka) o ciężarze cząsteczkowym od 294 000 do 460 000 daltonów. Formy dimeryczne można rozszczepiać na aktywne protomery poprzez zastosowanie czynników redukujących, które niszczą wiązania dwusiarczkowe spajające protomery. Aktywne protomeryczne podjednostki polimerów enzymatycznych wykazują niewielkie różnice w ciężarze cząsteczkowym wahającym się od 66 000 do 80 000 daltonów [23].

Wydaje się, że analogicznie w przypadku roślin występują różne formy rodzimych cholinoesteraz od monomerów do polimerów, a te ostatnie mogą ulegać rozbiciu na podjednostki w czasie ekstrakcji i oczyszczania enzymu. Nie jest także wykluczone, że cząsteczki o masie 200 000 lub 800 000 daltonów są agregatami powstającymi w trakcie izolacji i oczyszczania enzymu. Niezależnie od zagadnienia ciężaru cząsteczkowego form rodzimych warto zwrócić uwagę na fakt, że zarówno AChE zwierzęce, jak i enzymy roślinne wykazują *in vitro* tendencję do agregacji, tworząc zespoły o ciężarze cząsteczkowym przekraczającym milion daltonów [4, 23].

1.4. SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA

Cholinoesterazy roślinne mogą hydrolizować różne estry cholinowe, przy czym szybkość hydrolizy spada wraz ze wzrostem długości łańcucha kwasowego. Model zróżnicowania szybkości tych reakcji przedstawia się następująco:

$A > P > B$ [26] lub $A > P \geq B$ [4, 8], u *Pisum sativum* $B = 0$ [16] gdzie A to cholinowy ester kwasu octowego, P — propionylowego, B — butyrylowego.

ChE izolowane z roślin mają też zdolność rozkładania estrów niecholinowych, hydrolizując stosunkowo aktywnie octan indofenolu [16, 26] i słabiej octan α -naftyłu [16].

1.5. CZYNNIKI OKREŚLAJĄCE POZIOM AKTYWNOŚCI CHOLINOESTERAZ

1.5.1. Optimum pH i temperatury

Optimum pH dla ChE roślinnych waha się między 8,0 i 9,0 w zależności od źródła enzymu [4, 7, 16]. Różnice w oznaczaniu optimum pH mogą wynikać z dość dużej autokatalizowanej hydrolizy estrów cholinowych powyżej pH 8,0, która zachodzi w czasie oznaczania aktywności enzymu.

Optimum temperatury dla ChE roślinnych wynosi 30 - 36°C [4, 16].

1.5.2. Wpływ jonów

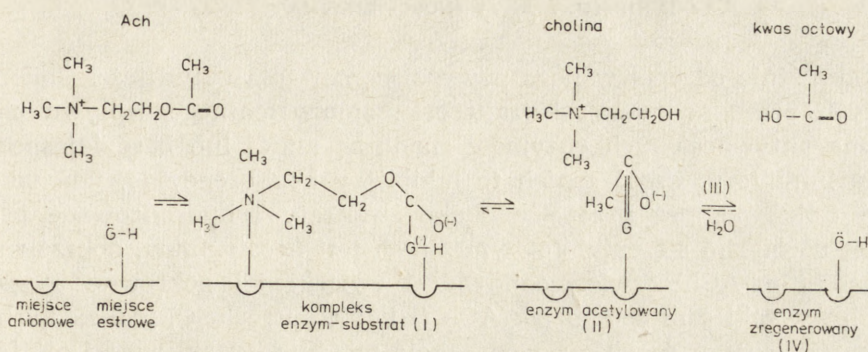
Obserwacje nad wpływem jonów na aktywność ChE roślinnej prowadzili jedynie Ernst i Hartmann [4]. Badacze ci stwierdzili, że Mg^{2+} w stężeniu 1 - 10 mM nie powodował istotnych zmian aktywności enzymu, natomiast Mn^{2+} i Ca^{2+} silnie ją hamowały.

1.5.3. Wpływ stężenia substratu

Powinowactwo enzymu do substratu określa współczynnik K_m (stężenie substratu, przy którym reakcja enzymatyczna zachodzi z połową szybkości maksymalnej). K_m cholinesteraz roślinnych wyznaczone metodą graficzną Lineweavera-Burka wynosiło od $5,6 \cdot 10^{-5}M$ (korzenie *Phaseolus vulgaris* — [18]), do $4,6 \cdot 10^{-4}M$ (hypokotyle *Phaseolus vulgaris* — [4]). Dla enzymu z *Phaseolus aureus* K_m wynosiło 7,2 - $8,4 \cdot 10^{-5}M$ [26], z *Cicer arietinum* $1,5 \cdot 10^{-4}M$ [8], a z *Pisum sativum* $2,0 \cdot 10^{-4}M$ [16]. Jak widać, optymalne stężenie substratu nie przekraczało nigdy 1 mM. W przypadku większego stężenia substratu enzymy zachowywały się dwojako: cholinesterazy z hypokotyli *Phaseolus vulgaris*, korzeni *Cicer arietinum* i etiolowanych siewek *Zea mays* nie wykazywały inhibicji substratowej [4, 7, 8], natomiast pozostałe były hamowane [7, 16, 18, 26]. Typowa krzywa przedstawiająca wpływ stężenia substratu na aktywność tych enzymów ma kształt dzwonu [7].

Mechanizm enzymatycznej hydrolizy ACh w komórkach roślinnych wydaje się podobny do mechanizmu występującego w komórkach zwierzęcych. Riov i Jaffe [26] sugerują, że centrum aktywne ChE z korzeni *Phaseolus aureus* jest podobne do centrum AChE zwierzęcej i w związku z tym jego funkcjonowanie ilustrować może ogólnie przyjęty model opracowany dla tejże AChE (ryc. 1).

W centrum aktywnym są dwa miejsca — anionowe, które przyciąga dodatkowo naładowany atom azotu ACh, i estrowe, przy którym następuje hydroliza substratu. ACh łączy się z centrum aktywnym, tworząc kompleks I na zasadzie przyciągania elektrostatycznego między czwartorzę-



Ryc. 1. Rozkład acetylocholino przez cholinoesterazy roślinne

dowym azotem i centrum anionowym oraz między elektrofilowym węglem z grupy karboksylowej i grupą kwasową ($-\text{G}-\text{H}$) miejsca estrowego. Następuje przebudowa cząsteczki ACh, odłączenie choliny, a pozostający acylowany enzym (II) reaguje szybko z wodą (III) dając kwas octowy i zregenerowany enzym (IV).

Jedno z możliwych objaśnień inhibicji ChE przez nadmiar ACh zakłada, że miejsca estrowe i anionowe przyciągają po jednej cząsteczce substratu. W tej sytuacji żadna z nich nie może przyjąć optymalnej pozycji przestrzennej, która jest potrzebna do hydrolizy wiązania estrowego, co daje w rezultacie spadek aktywności enzymatycznej [7].

1.5.4. Wpływ choliny

Cholina jest inhibitorem konkurencyjnym AChE zwierzęcej, posiadając bowiem dodatnio naładowany atom azotu oddziałuje z jej centrum aktywnym, blokując aktywność enzymu [23]. Taki sam wpływ ma cholina na aktywność ChE izolowanej z korzeni *Solanum melangena* i *Zea mays* [7] oraz hypokotyli *Phaseolus vulgaris* [4], lecz jedynie w stężeniach niższych niż 1 mM. W stężeniach wyższych cholina stymuluje aktywność tych enzymów. Stymulację obserwowano również w przypadku ChE izolowanej z *Phaseolus aureus* [26], gdy stężenie choliny było wyższe niż 0,1 mM.

To odmienne działanie choliny na aktywność ChE tłumaczą obserwacje Clarka i wsp. [1] nad wpływem tego związku na możliwość hydrolizy fosforylowanej niespecyficycznej ChE. Można więc przypuszczać, że cholina, oprócz tego że jest inhibitorem konkurencyjnym ChE, może stymulować aktywność tego enzymu przez wzmaganie deacylacji enzymu i to zjawisko maskuje inhibicyjny efekt choliny [26].

1.6. INHIBITORY AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

Niezależnie od opisywanego powyżej hamowania aktywności ChE roślinnych przez nadmiar substratu oraz ambiwalentnego wpływu cholinyliny na aktywność tych enzymów znane są mniej lub bardziej specyficzne inhibitory. Część z nich to inhibitory konkurencyjne, tzn. takie, które traktowane są przez ChE jako substraty i hydrolizowane przy względnie niskim stężeniu. Jednym z nich jest neostygmina, dobrze znany inhibitor AChE zwierzęcej. Ona i związki jej pokrewne reagują z AChE w taki sam sposób jak ACh (I i II etap reakcji), jednak karboksylowany enzym reaguje z wodą około milion razy aktywniej niż forma acetylowana enzymu. Połowę maksymalnej inhibicji cholinesteraz roślinnych przez ten związek (I_{50}) uzyskiwano przy jego stężeniu równym $0,6 \cdot 10^{-6}M$, co jest porównywalne z hamowaniem AChE zwierzęcej [16, 26].

Innym klasycznym inhibitorem ChE zwierzęcych jest eseryna. Stężenie $10^{-5}M$ pozwalające uzyskać całkowitą inhibicję (I_{100}) tych enzymów zawodzi w odniesieniu do ChE roślinnych i hamuje ich aktywność za ledwie w kilku procentach [26]. Połowa maksymalnej inhibicji I_{50} przez eserynę następuje dopiero przy jej stężeniu od 10^{-4} do $6 \cdot 10^{-3}M$ [4, 8]. Wielkości te odnoszą się do ChE wyekstrahowanych z tkanek roślinnych, natomiast *in vivo* nawet niskie stężenia eseryny skutecznie hamują aktywność omawianych enzymów. Sugeruje to możliwość wewnątrzkomórkowej jonizacji eseryny, która zwiększałaby jej powinowactwo do ChE [26].

Riov i Jaffe [26] badali wpływ innych inhibitorów na aktywność ChE izolowanej z korzeni *Phaseolus aureus*. Ambenonium i BW 284 C 51, specyficzne inhibitory AChE oraz chlorowoderek etopropazyny, inhibitor niespecyficznych ChE, hamowały aktywność enzymu roślinnego tylko przy dużych stężeniach (10^{-2} - $10^{-3}M$). Natomiast retardanty wzrostu Q 80 i AMO 1618 w tych samych stężeniach były znacznie skuteczniejsze i dawały 80% inhibicji.

W odniesieniu do cholinesteraz roślinnych testowano również inhibitory fosforoorganiczne, które są podstawą licznych pestycydów. Ich działanie polega na trwałym fosforylowaniu enzymu w miejscu estrowym centrum aktywnego. Podobnie jak w przypadku cholinesteraz zwierzęcych związki te okazały się bardzo silnymi inhibitorami. Tak np. Paraoxan daje I_{50} przy stężeniu $10^{-5}M$, a Fensulfonian $10^{-4}M$ [16]. Bardzo skutecznym w hamowaniu aktywności roślinnej ChE okazał się dwuizopropylofluorofosforan (Dip-F), który w stężeniu $10^{-4}M$ całkowicie hamuje aktywność ChE roślinnej [18].

1.7. LOKALIZACJA CHOLINOESTERAZ W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

Cholinoesterazy ekstrahuje się z tkanek roślinnych jedynie roztworami o dużej sile jonowej (4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lub $6 \cdot 10^{-1}\text{M}$ KCl — [26]). Pozwala to wnioskować, że enzymy te związane są z błonami. Identyczne właściwości wykazuje grupa AChE zwierzęcych, tzw. hydrofobowych [23]. Jednakże roztwór siarczanu amonu wypłukuje tylko część aktywnego enzymu. Enzymy z *Solanum melongena* i *Zea mays* mogą być ekstrahowane z materiału buforem o małej sile jonowej — bez siarczanu amonu [7]. Świadczyć to może o innych właściwościach strukturalnych tych enzymów bądź też o innej — nie tylko błonowej — ich lokalizacji.

Fluck i Jaffe [5] stosując metodę Karnowsky-Rootsa [15] badali subkomórkową lokalizację ChE w komórkach 12-dniowych korzeni *Phaseolus aureus*. Jedynymi miejscami, w których obserwowali oni tworzenie się produktu reakcji enzymatycznej, były ściany komórkowe między preepidermalnymi i epidermalnymi komórkami kory pierwotnej oraz przestrzenie między ścianą komórkową a plazmolemmą. Tretyn i wsp. [28] wykazali, że w komórkach warstwy aleuronowej ziarniaków pszenicy produkt ten istotnie powstaje na powierzchni plazmolemmy, co potwierdzono przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego [30]. Jednakże w etiolowanych koleoptylach owsa produkt reakcji enzymatycznej, podobnie jak w korzeniach fasoli [5], zlokalizowano zarówno na powierzchni plazmolemmy, jak i w ścianach komórkowych [29, 30]. Taka lokalizacja ChE roślinnych jest prawdopodobnie wynikiem dyfuzji produktu reakcji enzymatycznej z powierzchni plazmolemmy do wnętrza ścian komórkowych, co ułatwiałaby jej luźna struktura przestrzenna [30].

2. ZESTAWIENIE WŁAŚCIWOŚCI CHOLINOESTERAZ ROŚLINNYCH I ZWIERZĘCYCH. KLASYFIKACJA CHOLINOESTERAZ ROŚLINNYCH

Należy nadmienić, że zwierzęce enzymy hydrolizujące estry cholinowe zalicza się do dwu klas: niespecyficzna cholinoesteraza (E.C. 3.1.1.8.) i acetylocholinoesteraza (E.C. 3.1.1.7.). W tabeli 1 zestawione zostały omówione powyżej właściwości ChE roślinnych. Dla porównania obok zamieszczono charakterystykę AChE zwierzęcej.

Z tabeli 1 wynika, że ChE roślinne nie są identyczne z AChE zwierzęcymi, wykazują jednak wiele podobieństw do nich. Szczególnie interesująca jest występująca w obu przypadkach błonowa lokalizacja tych enzymów. Sugeruje ona bowiem, że funkcjonowanie roślinnego układu

cholinergicznego, analogicznie do sytuacji w świecie zwierzęcym, sprawdzić można, przynajmniej częściowo, do reakcji pierwotnych zachodzących na poziomie błon [13].

Na podobieństwo ChE roślinnych do AChE zwierzęcych wskazuje także szereg właściwości molekularnych i biochemicznych. Ciężar cząsteczkowy ChE roślinnych przekracza 200 000 lub 800 000 daltonów, bądź jest mniejszy niż 80 000. Są to wielkości analogiczne do ciężaru cząsteczkowego polimerów i protomerów AChE zwierzęcych. W przypadku

TABELA 1

Porównanie cholinoesteraz roślin i AChE zwierząt IE.C. 3.1.1.7.1
(Na podstawie [13], zmodyfikowane i uzupełnione wg [5, 6, 10, 14, 15, 16, 17])

Właściwość	ChE roślin	AChE zwierząt
Lokalizacja	Związana z błonami	Związana z błonami
Ciężar cząsteczkowy w daltonach	Większy niż 200 000 lub 800 000 lub mniejszy niż 80 000	Monomery — ? Dimery 118 000—160 000 Tetramery 290 000—460 000 Protomery 66 000—80 000
Tendencja do agregacji	+	+
Hydroliza estrów cholinowych	A > P > B	A > P > B
Hydroliza acetylo-β-metylooctanu	+	+
Hydroliza estrów niecholinowych	+	+
K _m dla ACh	5,6·10 ⁻⁵ M — 4, 6·10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M — 3,0·10 ⁻⁴ M
Optimum pH	8 — 9	8,0 — 8,3
Wpływ jonów	Inhibicja przez Mn ²⁺ , Ca ²⁺ brak wpływu Mg ²⁺	Stymulacja Ca ²⁺ > Mg ²⁺ > Mn ²⁺
Wpływ stężenia substratu	Inhibicja przez nadmiar substratu lub jej brak	Inhibicja przez nadmiar substratu
Wpływ choliny	Inhibicja lub stymulacja	Inhibicja
Inhibitory: neostygmina	+++	+++
eseryna	+	+++
Ambenonium	+++	+++
BW 284 C 51	+	+++
fosforoorganiczne	+++	+++

enzymów zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych, nie ma korelacji między ciężarem cząsteczkowym enzymu a właściwościami centrum aktywnego. Wspólna tym enzymom jest także tendencja do agregacji in vitro.

Na uwagę zasługuje również duże powinowactwo ChE roślinnych do acetylocholinyl i preferowanie jej hydrolizy przed innymi estrami cholinowymi. Właściwość ta w zestawieniu z wynikami badań Miury i Shiha [21] dotyczącymi powszechnego występowania ACh sugeruje, że analogicznie do AChE zwierzęcej również acetylocholina jest pierwot-

nym substratem enzymów roślinnych. Podobnie jak AChE zwierzęce, cholinoesterazy roślinne mogą brać udział w rozkładaniu innych estrów cholinowych np. propionylocholinę, której występowanie w tkankach roślinnych zostało stwierdzone przez wyżej wymienionych autorów [22].

Wpływ inhibitorów na aktywność ChE roślin i AChE jest również zbliżony. Enzymy te są silnie hamowane przez neostygminę i związki fosforoorganiczne, a ChE roślinne *in vivo* przez eserynę. ChE roślin i AChE mają podobne wymagania odnośnie do warunków fizycznych dla swojej aktywności, tj. pH i temperatury środowiska.

Zasadniczą różnicą między AChE zwierząt a ChE roślinnymi jest większa niejednorodność tych ostatnich. Objawia się ona, w zależności od materiału, z którego ekstrahowano enzymy, odmienną wrażliwością ChE roślinnych na stężenie substratu oraz odmiennym wpływem cholin i jonów na ich aktywność. Na tej podstawie można wyróżnić dwie grupy ChE roślinnych.

Godny uwagi jest fakt, że właśnie cholinoesterazy niespecyficzne (E.C. 3.1.1.8), np. pseudochoolinoesteraza surowicy krwi, nie wykazują inhibicji substratowej, a cholina w pH kwasowym stymuluje ich aktywność [26]. Poza tą właściwością ChE roślinne zasadniczo różnią się od ChE niespecyficznych zwierząt. Niespecyficzne esterazy zwierzęce hydrolizują estry cholinowe wg wzoru $B > P > A$, nie rozkładają acetylo- β -metylooctanu, nie podlegają kinetyce Michaelis-Menten i mają inny model wiązania substratu [8, 20, 26]. Ponadto Ambenonium i BW 284 C 51 nie hamują ich aktywności [26].

Ze względu na omówione powyżej różnice we właściwościach ChE roślinnych zaszeregowanie ich do jednej z dwu wymienionych klas jest utrudnione. W celu rozwiązania tej kwestii Fluck i Jaffe [5] oraz Ernst i Hartmann [4] proponują trzy warunki, które pozwolić mogą na uznanie ChE roślinnej za specyficzną AChE (E.C. 3.1.1.7.):

1. maksymalna aktywność względem octanowych estrów cholinę,
2. duże powinowactwo enzymu do acetylocholinę,
3. hamowanie aktywności enzymu niskimi stężeniami neostygminy.

Warunki te spełniają wszystkie poznane dotąd enzymy roślinne. Błonna lokalizacja ChE roślinnych oraz ich właściwości molekularne i biochemiczne pozwalają wnioskować, że enzymy te są acetylocholinoesterazami.

3. PODSUMOWANIE

Acetylocholinoesterazy roślinne wykazują wiele podobieństw do acetylocholinoesteraz zwierzęcych, co może świadczyć, że enzymy te pełnią podobną funkcję w regulacji poziomu acetylocholinę w królestwie za-

równow zwierząt, jak i roślin. Natomiast występowanie różnic między tymi enzymami tłumaczyć można ich zmiennością ewolucyjną. Na jej istnienie wskazuje fakt odnalezienia u organizmów bezkręgowych enzymów o właściwościach pośrednich między cholinoesterazami zwierzęcymi a roślinnymi. Taka ewolucja biochemiczna przebiegałaby prawdopodobnie inaczej w pniu auto- i heterotroficznym. Różnokierunkowość poddyktowana byłaby faktem, że mechanizm funkcjonowania całego systemu cholinergicznego znalazł odmienne rozwiązanie w królestwie roślin i zwierząt. W organizmach roślinnych ewolucja tego systemu wydaje się dążyć w kierunku wiązania go z układem fitochromowym [13].

Autorzy serdecznie dziękują doc. dr hab. Alicji Górskiej-Brylass i prof. dr. hab. Janowi Kopcewiczowi za pomoc w przygotowaniu artykułu. Praca ta powstała w trakcie badań prowadzonych w ramach problemów CPBP 05.02.4.07. i RP.II.12.

LITERATURA

- [1] CLARK, S. W., CLAUBIGER, C. A., LADU, B. N., Properties of plasma cholinesterase variants, *Ann N.Y. Acad. Sci.*, **151**: 710 - 722, 1968.
- [2] DETTBARN, W. D., Acetylcholinesterase activity in *Nitella*, *Nature*, **194**: 1175 - 1176, 1962.
- [3] ELMANN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, **7**: 88 - 95, 1961.
- [4] ERNST, M., HARTMANN, E., Biochemical characterization of an acetylcholine-hydrolyzing enzyme from bean seedlings, *Plant Physiol.*, **65**: 447 - 450, 1980.
- [5] FLUCK, R. A., JAFFE, M. J., Cholinesterase from plant tissues. III. Distribution and subcellular localization in *Phaseolus aureus* Roxb., *Plant Physiol.*, **53**: 752 - 758, 1974.
- [6] FLUCK, R. A., JAFFE, M. J., The distribution of cholinesterase in plant species, *Phytochemistry*, **13**: 2475 - 2480, 1974.
- [7] FLUCK, R. A., JAFFE, M. J., Cholinesterase from plant tissues. VI. Preliminary characterization of enzymes from *Solanum melongena* L. and *Zea mays* L., *Biochim. Biophys. Acta*, **410**: 130 - 134, 1975.
- [8] GUPTA, R., MAHESHWARI, S. C., Preliminary characterization of cholinesterase from roots of Bengal gram — *Cicer arietinum* L. *Plant, Cell Physiol.*, **21**: 1675 - 1679, 1980.
- [9] HADACOVA, V., HOFMAN, J., MALINI DE ALMEIDA, R., VACKOVA, K., KUTACEK, M., KLOZOVA, E., Choline esterases and choline acetyltransferase in seed of *Allium altaicum* (Pall.) Reyse, *Biologia Plantarum*, **23**: 220 - 227, 1981.
- [10] HADACOVA, V., VACKOVA, K., KLOZOVA, E., KUTACEK, M., PITTERO-

- VA K., Cholinesterase activity in some species of the *Allium* genus, *Biologia Plantarum*, **25**: 209 - 215, 1983.
- [11] HARTMANN, E., KILBINGER, K., Gas-liquid-chromatographic determination of light-dependent acetylcholine concentration in moss callus, *Biochem. J.*, **137**: 249 - 252, 1974.
- [12] HARTMANN, E., KILBINGER, K., Occurrence of light-dependent acetylcholine concentrations in higher plants, *Experientia*, **30**: 1387 - 1388, 1974.
- [13] JAFFE, M. J., Evidence for the regulation of phytochrome-mediated process in bean roots by the neurohormon, acetylcholine, *Plant Physiol.*, **46**: 768 - 777, 1970.
- [14] JAFFE, M. J., FLUCK, R., The mediation of bean root acetylcholinesterase activity by phytochrome and other photochromic pigments, *Plant Physiol.*, **49**: 53 (suplement), 1972.
- [15] KARNOVSKY, M. J., ROOTS, L., A "direct-coloring" tiocholine method for cholinesterases, *J. Histochem. Cytochem.*, **12**: 219 - 221, 1964.
- [16] KASTURI, R., VASENTHARAJAN, V. N., Properties of acetylcholinesterase from *Pisum sativum*, *Phytochemistry*, **15**: 1345 - 1347, 1976.
- [17] KOPCEWICZ, J., CYMERSKI, M., PORAZIŃSKI, Z., Influence of red and far-red irradiation on the acetylcholine and gibberellin content in scots pine seedlings, *Bull. Acad. Polon. Sci.*, **25**: 111 - 117, 1977.
- [18] MANSFIELD, D. H., WEBB, G., CLARK, D. G., TAYLOR, I. P., Partial purification and some properties of a cholinesterase from bush bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots, *Biochem. J.*, **175**: 769 - 777, 1978.
- [19] MINTZ, K. P., BRIMIJOIN, S., Two-step immunoaffinity purification of acetylcholinesterase from rabbit brain, *J. Neurochem.*, **22**, 1985.
- [20] MIURA, G. A., BROOMFIELD, C. A., LAWSON, M. A., WORTHLEY, E. G., Widespread occurrence of cholinesterase activity in plant leaves, *Physiol. Pland.*, **56**: 28 - 32, 1982.
- [21] MIURA, G. A., SHIH, T.-M., Cholinergic constituents in plants: characterization and distribution of acetylcholine and choline, *Physiol. Plant.*, **61**: 417 - 421, 1984.
- [22] MIURA, G. A., SHIH, T.-M., Identification of propionylcholine in higher plants, *Physiol. Plant.*, **62**: 341 - 345, 1984.
- [23] OTT, P., Membrane acetylcholinesterase: purification, molecular properties and interaction with amphiphilic environments, *Biochim. Biophys. Acta*, **822**: 375 - 398, 1985.
- [24] REED, D. J., GATTO, K., WANG, G. H., A direct radioisotopic assay for acetylcholinesterase, *Anal. Biochem.*, **16**: 59 - 64, 1966.
- [25] RIOV, J., JAFFE, M. J., A cholinesterase from bean roots and its inhibition by plant growth retardants, *Experientia*, **29**: 264 - 265, 1972.
- [26] RIOV, J., JAFFE, M. J., Cholinesterase from plant tissues. I. Purification and characterization of a cholinesterase from mung bean roots, *Plant Physiol.*, **51**: 520 - 528, 1973.
- [27] SASTRY, B. V. R., SADAVONGVIVAD, C., Cholinergic system in nonnervous tissues, *Pharmacol. Rev.*, **30**: 65 - 132, 1979.
- [28] TRETYN, A., SLESÁK, E., ANDERSZ, A., Interaction of light and the cholinergic system in the process of seed germination, Light and hormone interactions in plants, Humboldt Univ. Press, Berlin, 93 - 94, 1985.
- [29] TRETYN, A., KWIATKOWSKA, K., Influence of red and far-red irradiation

on the ultrastructural localization of acetylcholinesterase in the cells of oat coleoptile, *Acta Biol. Hungarica*, **37**: 62 (suplement), 1986.

- [30] TRETYN, A., ŚLESIAK, E., KWIATKOWSKA, K., Cytochemical localization of AChE in plant cells in LM/TEM/SEM, *Folia Histochem. Cytobiologica*, **24**: 328 - 329, 1986.

Otrzymano: 24 października 1986.

Przyjęto: 6 listopada 1986.

Adres autora: Gagarina 9, 07-100 Toruń

PŁYTKOWO-POCHODNY CZYNNIK WZROSTU

PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR

Zofia Monika RUPNIEWSKA, Anna DMOSZYŃSKA-GIANNOPOULOU

Klinika Hematologii, Instytut Chorób Wewnętrznych AM, Lublin

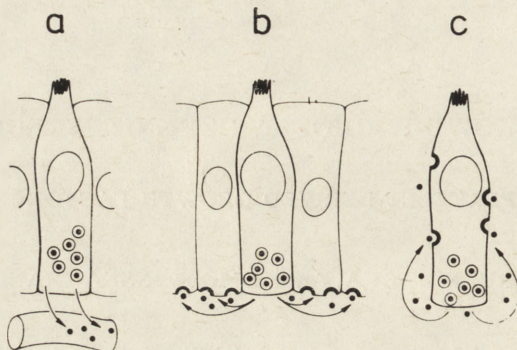
Streszczenie. Płytkowo-pochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor PDGF) należy do rodziny autokrynowych i parakrynowych peptydów wzrostu płytkowo-podobnych. Jest on głównym białkowym mitogenem osocza, działającym na komórki pochodzenia mezenchymalnego. Strukturalnie PDGF jest podobny do transformującego białka p28 „sis” retrowirusa mięsaka małpy wełnistej. W niniejszej pracy przedstawiono biologię i budowę PDGF, oraz kaskadę znanych obecnie zjawisk, jakie zachodzą w komórce po związaniu się PDGF ze specyficznym receptorem powierzchniowym.

Summary. Platelet derived growth factor (PDGF) belongs to the family of autocrine and paracrine PDGF-like peptides. PDGF is the major polipeptide mitogen for mesenchymal cells. Structurally PDGF is related to the transforming protein p28 “sis” of simian sarcoma virus. This review summarized the data on the biology and structure of PDGF and described the molecular cascade events in cells under PDGF action.

W ostatnich kilku latach w piśmiennictwie światowym obserwuje się falę zainteresowania płytkowo-pochodnym czynnikiem wzrostu (platelet-derived growth factor, w skrócie PDGF) w związku z jego wpływem na wzrost komórek i procesy naprawcze, a także z jego rolą w onkogenezie, w stanach zapalnych, w miażdżycy oraz w zwłóknieniu płuc i wątroby, jak również w zwłóknieniu szpiku.

Wzrost prawidłowych komórek podlega kontroli polegającej na współdziałaniu szeregu peptydowych hormonów i hormono-podobnych czynników wzrostu znajdujących się we krwi i w płynach tkankowych [38]. Pojęcie „sekrecji autokrynowej” (autocrine secretion), zaproponowane przez Sporna i Todaro [80], polega na autostymulacji. Komórka wydzie-

la hormono-podobny czynnik wzrostu, który działa na jej własne receptory znajdujące się na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej (ryc. 1).



Ryc. 1. Przedstawiona schematycznie sekrecja endokrynną (a), parakrynną (b) i autokrynną (c) [wg 80]

PDGF należy do rodziny autokrynowych i parakrynowych peptydów wzrostu płytkowo-podobnych (PDGF-like peptides). Jest on głównym białkowym mitogenem osocza działającym na komórki pochodzenia mezenchymalnego, nie wywołującym jednak ich nowotworowej transformacji, nawet przy zastosowaniu dużych dawek [81, 87]. Niemniej jednak PDGF dodany do hodowli prawidłowych komórek posiadających odpowiednie receptory może powodować wystąpienie pewnych cech fenotypowych, podobnych do tych, jakie obserwuje się w transformowanych komórkach [51, 87]. Ponadto PDGF wykazuje potężne działanie chemotaktyczne w stosunku do monocytów i neutrofilii, jak również do fibroblastów i komórek mięśni gładkich naczyń, których migracja wyraźnie zależy od stężenia PDGF. Chemotaktyczne i mitogenne działanie PDGF wiąże się z jego rolą w procesach zapalnych i naprawczych (piśmiennictwo zob. w [22a]).

PDGF jest kodowany przez komórkowy proto-onkogen „sis” zlokalizowany w chromosomie 22 w prążku q11 (q oznacza długie ramiona chromosomu) [18, 82]. Wykryto uderzającą homologię sekwencji między jednym z dwu łańcuchów polipeptydowych (łańcuchem B), z których składa się PDGF, a transformującym białkiem kodowanym przez onkogen „sis” wirusa mięsaka mały wełnistej (simian sarcoma virus, w skrócie SSV) [23, 86]. SSV należy do szybko transformujących retrowirusów, które w ciągu krótkiego czasu wywołują u zwierząt doświadczalnych mięsaki, a w hodowli transformują fibroblasty. Wirus ten po raz pierwszy został wyizolowany z komórek włókniako-mięsaka (fibrosar-

coma) małpy wełnistej, co dało początek jego nazwie [85]. Genom SSV jest chimerą powstałą przez rekombinację sekwencji wirusowych (delecyjnych genów wirusowych kodujących białka wnętrza wirionu i glikoproteiny osłonki) z proto-onkogenem „sis” pochodzącym z komórki małpy wełnistej [66, 67, 89].

Magazynem PDGF są ziarna alfa krwinek płytkowych [44, 45, 88], przy czym przypuszcza się, że PDGF jest syntetyzowany w megakariocytach (cyt. wg [81]). Natomiast inne peptydy PDGF-podobne w szczególnych warunkach, np. w okresie wzrostu zarodkowego lub po zranieniu tkanek, mogą być wytwarzane przez komórki mięśni gładkich (cyt. wg [79]). Ostatnio wykazano [49], że uaktywnione monocyty krwi obwodowej wykazują ekspresję proto-onkogenu „sis” i uwalniają czynnik PDGF-podobny, który współdziała z innymi stymulatorami proliferacji fibroblastów.

Każda ludzka krwinka płytkowa zawiera ok. 1000 cząsteczek PDGF izolowanych w ziarnach alfa, skąd są uwalniane po aktywacji płytek w następstwie uszkodzenia naczynia krwionośnego. Uszkodzenie śródbłonna naczyń i odsłonięcie włókien kolagenu, a także podśródbłonkowych elementów ściany naczyniowej stymuluje adhezję i agregację krwinek płytkowych oraz wywołuje reakcję uwolnienia. Podczas tego ostatniego procesu zostaje uwolniona do mikrośrodowiska zawartość ziaren wewnątrzpłytkowych, m. in. i PDGF.

PDGF nie jest jedyną aktywnością mitogenną zawartą w krwince płytkowej. W 1979 r. Castor i wsp. [10] opisali aktywność związaną z frakcją anionową, którą nazywali III aktywującym peptydem tkanki łącznej (connective tissue activating peptide III, w skrócie CTAP III). CTAP III aktywuje syntezę DNA w fibroblastach i komórkach maziówkowych, jego ciężar cząsteczkowy wynosi 9300 daltonów i jest zbliżony do 4 czynnika płytkowego o niskim powinowactwie (low affinity platelet factor 4). Inni autorzy [61] wyizolowali zasadowe białko płytkowe (platelet basic protein, w skrócie PBP) o ciężarze cząsteczkowym od 14 000 do 17 000 daltonów. Białko to wiąże heparynę i wykazuje antygenową konkurencję z 4 czynnikiem płytkowym. Rola tych częściowo oczyszczonych aktywności nie jest dokładnie poznana. Interesujące wydaje się powiązanie CTAP III i PBP z PDGF. Poza wyżej omówionymi białkami w ziarnach alfa krwinek płytkowych znajdują się jeszcze 4 czynnik płytkowy [7, 73] i beta tromboglobulina [45, 57]. Białka ziaren alfa uwalniane miejscowo silnie wiążą się z obnażoną błoną podstawową. Surowica człowieka zawiera 15 - 20 ng /ml PDGF, podczas gdy osocze zubożone w płytki zawiera tylko 1 - 2 ng/ml. Linie komórkowe wyprowadzone z fibroblastów, komórek mięśni gładkich i gleju, dla optymalnego wzrostu w warunkach *in vitro* wymagają 1 - 2 ng/ml PDGF [76, 87].

Wystąpienie aktywności PDGF w krzepnącej krwi zbiega się w rozwoju filogenetycznym z wystąpieniem układu naczyniowego u kręgowców. Ta koordynacja w przebiegu ewolucji uwiarygodnia sugestią Rossa i wsp. [69], że PDGF *in vivo* uczestniczy w procesach naprawczych wyściółki naczyniowej. Stąd pochodzi jego wcześniejsza nazwa „hormon zranienia” (wound hormone) [4, 5]. Ponadto badania peptydów PDGF-podobnych w komórkach mięśni gładkich w obrębie zranienia dostarczyły dowodu potwierdzającego wcześniejszą sugestią Sporna i Todaro [80] odnośnie do autokrynowego modelu działania czynników wzrostu w procesach naprawczych po uszkodzeniu tkanek [79]. Choć mięśnie gładkie ściany tętniczej wyizolowane z naczyń dorosłych szczurów nie wytwarzają znamiennej ilości peptydów PDGF-podobnych, to jednak analogiczne komórki pochodzące od szczurów, których tętnica została zraniona, uwalniają do środowiska pozakomórkowego biologicznie znamienne ilości tych peptydów.

Krwinka płytkowa zawiera niewielkie ilości PDGF, dlatego oczyszczenie tego peptydu nastroczało wiele trudności. Antoniades i wsp. [2] uzyskali PDGF z ludzkiej surowicy i zidentyfikowali go przy pomocy przeciwciał skierowanych przeciw PDGF. Niedawno otrzymano PDGF w wystarczających ilościach dla przeprowadzenia jego charakterystyki biochemicznej. Materiałem wyjściowym były przedatowane koncentraty ludzkich krwinek płytkowych [21]. Proces oczyszczania PDGF jest złożony i przebiega w kilku etapach. Etap pierwszy polega na przepuszczeniu koncentratu płytkowego przez kolumnę wypełnioną Sulfadexsem G 50. Następnie, wykorzystując kationową naturę białka i jego oporność na wysoką temperaturę, uzyskany z pierwszej chromatografii przesącz podgrzewa się do 100° C i przepuszcza przez kolumnę wypełnioną safedexsem (CM-Sephadex) i sefarozą (Blue-Sepharose). Końcowy etap oczyszczania polega na chromatografii w bio-żelu (Bio-Gel P 100). W zapisie chromatograficznym uzyskuje się dwie wartości szczytowe odpowiadające aktywnościom PDGF I i PDGF II. W porównaniu do produktu wyjściowego, po oczyszczeniu, specyficzna aktywność PDGF wzrasta ok. 100 000 razy. PDGF I i II różnią się ciężarem cząsteczkowym i składem węglowodanowym. Ciężar cząsteczkowy PDGF I wynosi ok. 31 000 daltonów, PDGF II — ok. 28 000 daltonów. PDGF I zawiera 7% grup węglowodanowych, a PDGF II — 4%. Dokładna analiza składu węglowodanowego wykazała, że PDGF I zawiera N-acetylogalaktozaminę i fukozę, których nie wykryto w PDGF II. Z drugiej strony immunizując króliki ludzkim PDGF I i II, uzyskano surowice skierowane przeciw tym białkom, które jednak tak samo reagują zarówno z PDGF I, jak i II. Oba PDGF-y są więc nierozróżnialne immunologicznie, chociaż czułość metody immunologicznej wynosi 0,2 ng PDGF/ml.

PDGF I i II składają się z dwu łańcuchów polipeptydowych, zwanych łańcuchami A i B, połączonych mostkami dwusiarczkowymi [1, 21, 37, 43, 64]. Ciężar cząsteczkowy łańcucha A — PDGF I wynosi ok. 18 000 daltonów, zaś PDGF II — 16 000 daltonów, natomiast ciężar cząsteczkowy łańcucha B jest taki sam zarówno dla PDGF I, jak i II i wynosi 15 000 daltonów [43]. W 1985 r. Collins i wsp. [14] opisali czynnik PDGF-podobny uzyskany z hodowli komórek śródbłonka. Ten śródbłonkowy mitogen jest homodimerem łańcuchów B. Nie ustalono, czy komórka śródbłonka syntetyzuje również łańcuch A PDGF i jaka jest relacja między płytkowym a śródbłonkowym PDGF.

Receptory specyficzne dla PDGF (R-PDGF) występują na powierzchni ludzkich fibroblastów, komórek NIH 3T3 (linia komórkowa 3T3 wyprowadzona z prawidłowych fibroblastów myszy w National Institute of Health (NIH) jest linią „unieśmiertelnioną” („immortalized”) posiadającą zdolność ciągłej proliferacji w hodowli), a także na powierzchni komórek mięśni gładkich tętnic i innych komórek tkanki łącznej u małp, myszy, szczurów i drobiu. Komórki nabłonków, śródbłonków i limfocyty krwi obwodowej nie wiążą ^{125}J -PDGF. Ilość receptorów na reagujących komórkach waha się w granicach 40 000 - 400 000 na komórce. R-PDGF jest białkiem błony komórkowej o ciężarze cząsteczkowym 165 000 - 185 000 daltonów [32, 36]. Budowa R-PDGF jest podobna do budowy receptorów dla innych czynników wzrostu, takich jak receptor dla czynnika wzrostu pobudzającego wytwarzanie kolonii makrofagów (macrophage-colony stimulating factor, w skrócie M-CSF), lub czynnika wzrostu naskórka (epidermal growth factor, w skrócie EGF), przy czym PDGF działa m. in. modulującą na ten ostatni receptor [60]. Ostatnio Yarden i wsp. [90] metodą klonowania cDNA kodującego pre-receptor dla PDGF komórek NIH 3T3 precyzyjnie ustalili jego strukturę. R-PDGF składa się z trzech części: pierwszej — która wystaje poza komórkę i posiada miejsce wiążące PDGF, drugiej — osadzonej w błonie komórkowej i trzeciej — znajdującej się w cytoplazmie we wnętrzu komórki, przy czym cytoplazmatyczna część R-PDGF wykazuje aktywność kinazy tyrozynowej i jest zdolna do autofosforylacji [36]. Zewnątrzkomórkowa część R-PDGF rozpoznaje i wiąże PDGF. Związanie PDGF prawdopodobnie powoduje zmiany w konformacji receptora, co aktywuje wewnętrzkomórkowy obszar kinazy tyrozynowej [15, 25, 26, 58]. Kinaza tyrozynowa jest enzymem przenoszącym wysoko energetyczne grupy fosforanowe z komórkowego nośnika energii, jakim jest trójfosforan adenozy (ATP), na rodniki tyrozyny białek komórkowych. Jak się wydaje, fosforylacja tyrozyny odgrywa ważną rolę w złożonym układzie regulacyjnym odpowiedzialnym za zachowanie kształtu komórki i kontrolę wzrostu (cyt. wg [40]). Równoległe z uaktywnieniem kinazy

tyrozynowej wzrasta ilość fosfotyrozyny w białkach komórkowych. W ten sposób poprzez fosforylację tyrozyny docelowego białka lub docelowych białek mitogeny sygnał zostaje przeniesiony z aktywnego receptora do wnętrza komórki [15].

Gen kodujący receptor dla PDGF zlokalizowano u człowieka w chromosomie 5 (5q31 → q32) [90]. Leży on między genem kodującym czynnik wzrostu pobudzający wytwarzanie kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, w skrócie GM-CSF) (5q23 → q31), a komórkowym proto-onkogenem „fms” (5q33 → q34), który koduje receptor dla M-CSF.

W mitogennej odpowiedzi komórkowej na PDGF wyróżniono dwa okresy: okres zjawisk bezpośrednich występujących w ciągu 1-10 min od ekspozycji na PDGF i okres zjawisk wczesnych, występujących w ciągu 30 min do 3 godz. W tabeli 1 przedstawiono bezpośrednie i wczesne cechy mitogennej odpowiedzi na PDGF.

TABELA 1

Mitogenna odpowiedź na PDGF [wg 81]

Zjawiska bezpośrednie (1-10 min) niezależne od transkrypcji	Zjawiska wczesne (30-180 min) zależne od transkrypcji
Uaktywnienie kinazy tyrozynowej znajdującej się w cytoplazmatycznej części receptora PDGF	Usunięcie DPGF ze środowiska hodowlanego już nie hamuje dalszej aktywności mitogennej
Hamowanie wiązania EGF	Pojawienie się względnie stabilnych sygnałów wewnątrzkomórkowych
Hamowanie wiązania insuliny świnki morskiej	Indukcja rzadkich sekwencji genowych kodujących stosunkowo niewielkie ilości mRNA
Stymulacja uwalniania fosfolipazy A ₂ i prostaglandyn	Pojawienie się rzadkich białek cytoplazmatycznych
Stymulacja tworzenia polisomu	Stymulacja wiązania somatomedyny C (insulino-podobny czynnik wzrostu I)
Stymulacja przemiany fosfatydyloinozytolu	Zwiększenie ilości receptorów dla lipoprotein o niskiej gęstości
Reorganizacja włókien aktyny	Stymulacja układu transportu aminokwasów

Listę zjawisk bezpośrednich otwiera wystąpienie aktywności kinazy tyrozynowej, która cechuje także działanie innych autokrynowych czynników wzrostu, takich jak EGF [24], insulina [46], insulino-podobny czynnik wzrostu I (insulin-like growth factor I, w skrócie IGF I) [70] oraz działanie produktów szeregu onkogenów szybko transformujących retrowirusów należących do rodziny „src”. Rodzinę produktów onkogenów „src” reprezentuje białko p 60 v-„src” kodowane przez onkogen

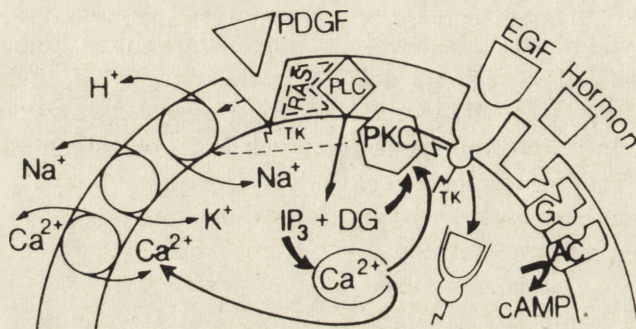
„src” wirusa mięsaka Rousa drobiu (Rous sarcoma virus, w skrócie RSV).

Do zjawisk bezpośrednich należy także reorganizacja włókien kurczliwego białka — aktyny. Za jej pośrednictwem PDGF wpływa na zmiany w szkielecie komórki, co jest intrygujące ze względu na znany związek między kształtem komórki, wzrostem komórki i anabolizmem komórki (cyt. wg [81]). Stąd też PDGF może wywoływać pewne cechy fenotypowe, które przypominają właściwości stransformowanych komórek. W hodowli komórek NIH 3T3, na którą zadziało PDGF, komórki tracą okrągłe kształty, stają się wrzecionowate i rosną, tworząc siatkę [87]. W hodowlach ludzkich komórek glejowych i fibroblastach PDGF powoduje wczesną reorganizację wiązek aktyny (actin bundle) i powstawanie dużych przypominających kwiaty pofałdowań błony, podobnych do tych, jakie występują w stransformowanych komórkach [51].

Jeśli idzie o zjawisko wczesne, to niezwykle interesujący jest fakt, że PDGF jest konieczny tylko początkowo do wywołania wzrostu. Już w ciągu 30 min od eksplozji na PDGF fibroblasty NIH 3T3 stają się „kompetentne” („competent”), tj. replikują DNA i dzielą się [63]. Od tego momentu usunięcia PDGF ze środowiska hodowlanego lub zadziaływanie przeciwciałami skierowanymi przeciw PDGF nie zmienia przebiegu odpowiedzi mitogennej [6, 11, 22, 63, 71, 77]. Takie nieciągłe działanie odróżnia PDGF od działania EGF i IGF I, które są stale konieczne (aż do początku fazy S) dla podtrzymania wzrostu. Jak się wydaje, po upływie 30 min do 3 godz. od ekspozycji na PDGF, reagujące komórki nabywają stabilny już układ wewnątrzkomórkowych sygnałów, które warunkują odpowiedź na PDGF [78]. Powstanie tych wewnątrzkomórkowych sygnałów zależy od pewnych sekwencji genowych indukowanych przez PDGF [12]. W komórkach pozostających w stanie spoczynku sekwencje genowe indukowane przez PDGF korespondują z niewielką ilością informacyjnego RNA (mRNA) (70 - 100 kopii w komórce). Po ekspozycji na PDGF ilość kopii mRNA wielokrotnie wzrasta (700 - 3000 kopii w komórce). Sekwencje indukowane przez PDGF stanowią jednak zaledwie 0,1-0,3% wszystkich genów ulegających transkrypcji i translacji w komórkach NIH 3T3 [81]. Należą one do tzw. „genów wczesnych” („early genes”) cyklu komórkowego, przynajmniej niektóre z nich Stiles nazywa „genami kompetencji” („competence genes”) warunkującymi wystąpienie i przebieg cyklu komórkowego (cyt. wg [27]).

O początkowych zdarzeniach molekularnych, jakie zachodzą na powierzchni komórki stymulowanej czynnikami wzrostu, już mamy trochę wiadomości (ryc. 2). Otóż po związaniu PDGF ze swoistym receptorem, poza uaktywnieniem kinazy tyrozynowej, występuje także aktywacja fosfolipazy C. Ten drugi enzym zapoczątkowuje powstanie trójfosfora-

nu inozytoli i dwuacylglicerolu. Trójfosforan inozytoli powoduje uwolnienie jonów wapnia (Ca^{2+}) z magazynów wewnątrzkomórkowych. Dwuacylglicerol uaktywnia kinazę białkową C, co jak się wydaje zapoczątkowuje wymianę Na^+/H^+ wraz z przejściowym wzrostem pH, który charakteryzuje komórki stymulowane czynnikami wzrostu.



Ryc. 2. Początkowe zmiany występujące na powierzchni komórek stymulowanych czynnikami wzrostu [wg 56]. PDGF — płytkowo-pochodny czynnik wzrostu, EGF — czynniki wzrostu naskórka, TK — kinaza tyrozynowa, RAS — komórkowe geny „ras”, PLC — fosfolipaza C, IP_3 — trójfosforan inozytoli, DG — dwuacylglicerol, PKC — kinaza białkowa C, AC — cyklaza adenylowa, cAMP — cykliczny monofosforan adenyzy

Szczególnie intrygujące jest pytanie, w którym miejscu w łańcuchu początkowych przemian działają produkty komórkowych proto-onkogenów „ras”. Komórkowe proto-onkogeny „ras” są homologiczne z onkogenami „ras” szybko transformujących retrowirusów mięsaka Harveya i Kirstena szczurów (Harvey and Kirsten rat sarcoma viruses, w skrócie odpowiednio Ha-RSV i Ki-RSV), które u zwierząt doświadczalnych w krótkim czasie wywołują nowotwory, a *in vitro* transformują komórki. U człowieka komórkowy proto-onkogen Ha-„ras” 1 zlokalizowano w krótkich ramionach chromosomu 11 ($11\text{p}15.1 \rightarrow \text{p}15.5$) (p — oznacza ramiona krótkie) [9, 19, 20, 29, 39], zaś komórkowy proto-onkogen Ki-„ras” 2 — w krótkich ramionach chromosomu 12 ($12\text{p}12 \rightarrow$ do końca p) [29, 42, 59, 72, 74]. Prawidłowe kodowane przez komórkowe proto-onkogeny „ras” białko p21„ras” (o ciężarze cząsteczkowym 21 000) uczestniczy w wewnątrzkomórkowym (pozareceptorowym) układzie informacyjnym (intracellular messenger system). p21„ras” jest zlokalizowane w obrębie błony komórkowej i wykazuje dwojaki rodzaj aktywności:

- po pierwsze, silnie wiąże guanozynotrójfosforan (GTP) [75],
- po drugie, posiada aktywność hydrolazy GTP (GTP-azy) rozkładającej GTP do nieaktywnej formy guanozynaodwufosforanu (GDP) i nieorganicznego fosforanu [30, 75, 83].

Ta druga aktywność neutralizuje pierwszą, dzięki czemu wewnątrzkomórkowy sygnał nie działa w sposób ciągły. Białko kodowane przez komórkowe proto-onkogeny „ras” wykazuje homologię sekwencji aminokwasów i, jak się wydaje, pełni podobne czynności co rodzina białek G (G proteins). Białka G stanowią pośrednie ogniwo przetwarzające sygnały pochodzące z różnych receptorów powierzchni komórki i przekazujące je do enzymu efektorowego — cyklazy adenylowej [31, 41, 68]. Gdy białka G zwiążą się z GTP, wchodzą w „stan aktywności” („active state”) i stymulują cyklazę adenylową. Gdy GTP ulegnie hydrolizie do GDP, białka G wracają do „stanu nieaktywności” („relaxed state”). A zatem hydroliza GTP ogranicza czas trwania aktywności białek G i przesyłanie wewnątrzkomórkowych sygnałów.

Białkowy produkt kodowany przez wirusowy onkogen „ras” posiada podstawiony aminokwas w pozycji 12 (glicyna 12 → arginina 12), co prawdopodobnie stabilizuje wiązanie GTP i warunkuje właściwości onkogenne tego białka. Mianowicie onkogenne białko efektywnie wiąże się z GTP, ale aktywność GTP-azy jest ok. dziesięciokrotnie mniejsza [28, 30, 48, 50, 83]. Niezdolność do efektywnej hydrolizy GTP stanowi pułapkę, utrzymującą docelowe białko w „stanie aktywności”, wskutek czego do wnętrza komórki jest przekazywany sygnał ciągły. Dotychczas jednak nie znamy docelowego białka dla p21_{ras}.

Interesujące, że gdy PDGF zwiąże ze swoim receptorem, ulega zmniejszeniu powinowactwo receptora EGF do EGF. Związanie PDGF aktywuje mechanizm zależny od kinazy białkowej C, pod wpływem której zachodzi fosforylacja rodnika seryny znajdującego się w cytoplazmatycznej części receptora EGF, tuż pod błoną komórkową.

W przeciwieństwie do skromnych, ale już udowodnionych danych dotyczących łańcucha przemian molekularnych, które zachodzą na powierzchni stymulowanej komórki, prawie nic nie wiemy o później występujących procesach we wnętrzu komórki. Zwłaszcza ważne jest ustalenie, które geny i w jakiej kolejności są indukowane przez surowicze czynniki wzrostu. Obecnie wiadomo, że PDGF zwiększa transkrypcję dwu genów komórkowych, a mianowicie „myc” [47] i „fos” [13, 34]. Komórkowy proto-onkogen „myc” jest homologiczny z onkogenem „myc” wirusa mielocytomatozy ptaków szczep MC 29 (avian MC 29 myelocytomatosis virus, w skrócie MC 29). U człowieka proto-onkogen „myc” znajduje się w dystalnym końcu chromosomu 8 w prążku q24 [17, 55, 84]. Komórkowy proto-onkogen „fos” jest homologiczny z onkogenem „fos” wirusa mięsaka kości FBJ myszy (Finel-Biskis-Jinkins (FBJ) murine osteosarcoma virus, w skrócie FBJ-MSV). U człowieka proto-onkogen „fos” został zlokalizowany w prążkach q21 → q31 chromosomu 14 [3]. Zarówno „myc” [35, 62], jak i „fos” [16] kodują białka związane ze zrę-

bem jądra komórkowego. Zrąb jądra komórkowego jest strukturą szkieletową odgrywającą rolę w replikacji DNA. Jednakże ostatnie dane, sugerują, że białko kodowane przez „myc” jest zlokalizowane obok (co-localized) jądra komórkowego i nie wiąże się z DNA, ale uczestniczy w przemianie RNA [65]. W związku z tą szczególną lokalizacją białka „myc” wydaje się, że odgrywa ono rolę regulacyjną w cyklu komórkowym. Przemawiają za tym badania Kelly i wsp. [47], którzy wykryli, że produkt „myc” pojawia się w rosnących komórkach na krótko przed podwojeniem się DNA. Wykazano ponadto [8, 47], że transkrypcja proto-onkogenu „myc” wiąże się z nabyciem „kompetencji” wzrostu (growth „competence”) i uniezależnieniem komórki od regulacyjnego wpływu czynników wzrostu, a więc i PDGF. Nie wiemy jednak, czy ekspresja proto-onkogenu „fos” przyczynia się do podobnej utraty wrażliwości komórki na działanie PDGF, zwłaszcza że aktywacja „fos” wyprzedza aktywację „myc” [52]. Ekspresja komórkowych proto-onkogenów „fos” i „myc”, a także innych genów kodujących białka związane z jądrem komórkowym, jak np. proto-onkogenu „myb”, który jest homologiczny z onkogenem „myb” wirusa mieloblastozy ptaków (avian myeloblastosis virus, w skrócie AMV), ulega zmianom podczas proliferacji [8, 34, 47] i różnicowania [33, 53, 54] komórek.

Stiles (cyt. wg [27 i 56]) wykazał ponadto, że PDGF w komórkach NIH 3T3 zwiększa transkrypcję nie tylko proto-onkogenów „fos” i „myc”, ale także genów kodujących interferon beta (gen pokrewny „fos”) i syntetazę 2'5'-oligoadenylnową. Transkrypcja tych dwu ostatnich genów występuje w późniejszym okresie niż „fos” i „myc”. Jak wiadomo wytwarzanie interferonu i syntetazy indukują wirusy. Co więcej, wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej, wcześniej, zanim wystąpi ekspresja genów dla interferonu i syntetazy, wywołuje ekspresję „fos” i „myc” (cyt. wg [56]). Z kolei syntetaza powoduje powstanie 2'5'-adenylnanu, który aktywuje rybonukleazę przypuszczalnie specyficzną wobec wirusowego mRNA (messenger RNA, w skrócie mRNA). Zwiększenie przez PDGF transkrypcji genów kodujących interferon beta jest niezwykle interesujące w świetle ostatnich doniesień [47a], które mówią o przeciwnym działaniu na cykl komórkowy interferonów (alfa i beta) i PDGF. Mianowicie interferony hamują przejście komórek z fazy G_0 cyklu komórkowego w fazę G_1 i S, podczas gdy PDGF działa mitogenicznie.

Stiles sugeruje istnienie dużej puli genów indukowanych czynnikami wzrostu, jednakże ekspresja tych genów jest tylko przejściowa, oczywiście jeśli wzrost komórki jest prawidłowo regulowany. Są to tzw. „geny kompetencji wzrostu” Stilesa. Do wyjaśnienia pozostaje, które z „genów kompetencji” odpowiadają „wczesnym genom” cyklu komór-

kowego, czy posiadają one aktywność transformującą i jakie są ich czynności.

PISMIENNICTWO

- [1] ANTONIADES, H. N., Human platelet-derived growth factor (PDGF): Purification of PDGF I and PDGF II and separation of their reduced subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 7314 - 7317, 1981.
- [2] ANTONIADES, H. N., SCHER, C. D., STILES, C. D., Purification of human platelet-derived growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 1809 - 1813, 1979.
- [3] BARKER, P. E., RABIN, M., WATSON, M., BREG, W. R., RUDDLE, F. H., VERMA, I. M., Human c-"fos" oncogene mapped within chromosomal region 14q21 → q31, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 5826 - 5830, 1984.
- [4] BALK, S. D., Calcium as a regulator of the proliferation of normal but not of transformed chicken fibroblasts in a plasma-containing medium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**: 271 - 275, 1971.
- [5] BALK, S. D., WHITFIELD, J. F., YOUNG, T., BRAUN, A. C., Roles of calcium, serum, plasma, and folic acid in the control of proliferation of normal and Rous sarcoma virus-infected chicken fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 675 - 679, 1973.
- [6] BRIGHT, M. D., GAFFNEY, E. V., Demonstration of competence and progression activities for human fibroblasts, *Exp. Cell Res.*, **137**: 309 - 316, 1982.
- [7] BROEKMAN, M. J., HANDIN, R. I., COHEN, P., Distribution of fibrinogen, and platelet factors 4 and XIII in subcellular fractions of human platelets, *Br. J. Haematol.*, **31**: 51 - 55, 1975.
- [8] 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.
- [9] CAPON, D. J., CHEN, E. Y., LEVINSON, A. D., SEEBURG, P. H., GOEDDEL, D. V., Complete nucleotide sequences of the T 24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue, *Nature*, **302**: 33 - 37, 1983.
- [10] CASTOR, C. W., RITCHIE, J. C., WILLIAMS, C. H. Jr., SCOTT, M.-E., WHITNEY S. I., MYERS, S. L., SLOAN, T. B., ANDERSON, B. E., Connective tissue activation. XIV. Composition and actions of a human platelet autoacid mediator, *Arthritis Rheum.*, **22**: 260 - 272, 1979.
- [11] CLEMMONS, D. R., VAN WYK, J. J., Somatomedin-C and platelet-derived growth factor stimulate fibroblast replication, *J. Cell Physiol.*, **106**: 361 - 367, 1981.
- [12] COCHRAN, B. H., REFFEL, A. C., STILES, C. D., Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor, *Cell*, **33**: 939 - 947, 1983.
- [13] COCHRAN, B. H., ZULLO, J., VERMA, I. M., STILES, C. D., Expression of the c-"fos" gene and of an "fos"-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor, *Science*, **226**: 1080 - 1082, 1984.
- [14] COLLINS, T., GINSBURG, D., BOSS, J. M., ORKIN, S. H., POBER, J. S., Cultured human endothelial cell express platelet-derived growth factor B chain. cDNA cloning and structural analysis, *Nature*, **316**: 748 - 750, 1985.
- [15] COOPER, J. A., BOWEN-POPE, D. F., RAINES, E., ROSS, R., HUNTER, T., Similar effects of platelet-derived growth factor, and epidermal growth

- factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins, *Cell*, **31**: 263 - 273, 1982.
- [16] CURRAN, T., MILLER, D. A., ZOKAS, L., VERMA, I. M., Viral and cellular "fos" proteins: A comparative analysis, *Cell*, **36**: 259 - 268, 1984.
- [17] DALLA-FAVERA, R., BERGINI, M., ERIKSON, J., PATTERSON, D., GALLO, R. C. CROCE, C. M., Human c-"myc" "onc" gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7824 - 7827, 1982.
- [18] DALLA-FAVERA, R., GALLO, R. C., GIALONGO, A., CROCE, C. M., Chromosomal localization of the human homolog (c-"sis") of the simian sarcoma virus "onc" gene, *Science*, **218**: 686 - 688, 1982.
- [19] DeMARTINVILLE, B., FRANCKE, U., The c-Ha-"ras"¹, insulin and beta-globin loci map outside the deletion associated with aniridia-Wilms' tumour, *Nature*, **305**: 641 - 643, 1983.
- [20] DeMARTINVILLE, B., GIACALONE, J., SHIH, C., WEINBERG, R. A., FRANCKE, U., Oncogene from human EJ bladder carcinoma is located on the short arm of chromosome 11, *Science*, **219**: 498 - 501, 1983.
- [21] DEUEL, T. F., HUANG, J. S., PROFFITT, R. T., BAENZIGER, J. U., CHANG, D., KENNEDY, B. B., Human platelet-derived growth factor. Purification and resolution into two active proteine fractions, *J. Biol. Chem.*, **256**: 8896 - 8899, 1981.
- [22] DICKER, P., ROZENGURT, E., Stimulation of DNA synthesis by transient exposure of cell cultures to TPA or polypeptide mitogens: Induction of competence or incomplete removal? *J. Cell Physiol.*, **109**: 99 - 109, 1981.
- [22a] DMOZYŃSKA-GIANNOPOULOS, A., RUPNIEWSKA, Z. M., Udział płytkowo-pochodnego czynnika wzrostu w patogenezie niektórych chorób. I. Rola płytkowo-pochodnego czynnika wzrostu w procesach zapalnych i miażdżycy, *Pol. Arch. Med. Wewn.*, w druku.
- [23] DOOLITTLE, R. F., HUNKAPILLER, M. W., HOOD, L. E., DEVARE, 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 - 277, 1983.
- [24] DOWNWARD, J., YARDEN, Y., MAYES, E., SCRACE, G., TOTTY, N., STOCKWELL, P., ULLRICH, A., SCHLESSINGER, J., WATERFIELD, M. D., Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-"erb-B" oncogene protein sequences, *Nature*, **307**: 521 - 527, 1984.
- [25] EK, B., HELDIN, C.-H., Characterization of a tyrosine-specific kinase activity in human fibroblast membranes stimulated by platelet-derived growth factor, *J. Biol. Chem.*, **257**: 10486 - 10492, 1982.
- [26] EK, B., WESTERMARK, B., WASTESON, A., HELDIN, C.-H., Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation by platelet-derived growth factor, *Nature*, **295**: 419 - 420, 1982.
- [27] EVAN, G., Growth factors, receptors and oncogenes, *Trends Genet.*, **2**: 2 - 3, 1986.
- [28] FINKEL, T., DER, C., COOPER, G. M., Activation of "ras" genes in human tumors does not affect localization, modification, or nucleotide binding properties of p 21, *Cell*, **37**: 151 - 158, 1984.
- [29] GERALD, P. S., GRZESCHIK, K. H., Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 10, 11, and 12. Seventh International Workshop on Human Gene Mapping, *Cytogenet. Cell Genet.*, **37**: 103 - 126, 1984.

- [30] GIBBS, J. B., SIGAL, I. S., POE, M., SCOLNICK, E. M., Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic "ras" p 21 molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 5704 - 5708, 1984.
- [31] GILMAN, A. G., G proteins and dual control of adenylate cyclase, *Cell*, **36**: 577 - 579, 1984.
- [32] GLENN K., BOWEN-POPE, D. F., ROSS, R., Platelet-derived growth factor. II. Identification of a platelet-derived growth factor by affinity labeling, *J. Biol. Chem.*, **257**: 5172 - 5176, 1982.
- [33] GONDA, T. J., METCALF, D., Expression of "myb", "myc" and "fos" proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukaemia, *Nature*, **310**: 249 - 251, 1984.
- [34] GREENBERG, M. E., ZIFF, E. B., Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-"fos" proto-oncogene, *Nature*, **311**: 433 - 438, 1984.
- [35] HANN, S. R., ABRAMS, H. D., ROHRSCHEIDER, L. R., EISENMAN, R. N., Proteins encoded by the v-"myc" and c-"myc" oncogenes: Identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell line, *Cell*, **34**: 789 - 798, 1983.
- [36] HELDIN, C.-H., EK, B., RÖNNSTRAND, L., Characterization of the receptor for platelet-derived growth factor on human fibroblasts. Demonstration of an intimate relationship with a 185 000 dalton substrate for the platelet-derived growth factor-stimulated kinase, *J. Biol. Chem.*, **258**: 10054 - 10061, 1983.
- [37] HELDIN, C.-H., WESTERMARK, B., WASTESON, A., Platelet-derived growth factor: Purification and partial characterization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 3722 - 3726, 1979.
- [38] HOLLEY, R. W., Control of growth of mammalian cells in cell culture, *Nature*, **258**: 487 - 490, 1975.
- [39] HUERNE, C., DESPOISSE, S., GILGENKRANTZ, S., LENOIR, G. M., JUNIEN, C., C-Ha-, "ras"-1 is not deleted in aniridia-Wilms' tumour association, *Nature*, **305**: 638 - 641, 1983.
- [40] HUNTER, T., The proteins of oncogenes, *Scient. Amer.*, **251**: 70 - 79, 1984 (August).
- [41] HURLEY, J. B., SIMON, M. I., TEPLow, D. B., ROBISHAW, J. D., GILMAN, A. G., Homologies between signal transducing G proteins and "ras" gene products, *Science*, **226**: 860 - 862, 1984.
- [42] JHANWAR, S. C., NEEL, B. G., HAYWARD, W. S., CHAGANTI, R. S. K., Localization of c-"ras" oncogene family on human germ-line chromosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 4794 - 4797, 1983.
- [43] JOHNSON, A., HELDIN, C.-H., WASTESON, A., WESTERMARK, B., DEUEL, T. F., HUANG, J. S., SEEBURG, P. H., GRAY, A., ULLRICH, A., SCRACE, G., STROOBANT, P., WATERFIELD, M. D., The c-"sis" gene encodes a precursor of the A chain of platelet-derived growth factor, *EMBO J.*, **3**: 921 - 928, 1984.
- [44] KAPLAN, D. R., CHAO, F. C., STILES, C. D., ANTONIADES, H. N., SCHER, C. D., Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts, *Blood*, **53**: 1043 - 1052, 1979.
- [45] KAPLAN, K. L., BROEKMAN, M. J., CHERNOFF, A., LESZNIK, G. R., DRILLINGS, M., Platelet alpha-granule proteins: Studies on release and subcellular localization, *Blood*, **53**: 604 - 618, 1979.
- [46] KASUGA, M., FUJITA-YAMOGUCHI, Y., BLITHE, D. L., WHITE, M. F., KAHAN, C. R., Characterization of the insulin receptor kinase purified from

- human placental membranes, *J. Biol. Chem.*, **258**: 10973 - 10980, 1983.
- [47] KELLY, K., COCHRAN, B. H., STILES, C. D., LEDER, P., Cell-specific regulation of the c-"myc" gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor, *Cell*, **35**: 603 - 610, 1983.
- [47a] LIN, S. L., KIKUCHI, T., PLEDGER, W. J., TAMM, I., Interferon inhibits the establishment of competence in G₀/S-phase transition, *Science*, **233**: 356 - 359, 1986.
- [48] MANNE, V., BEKESI, E., KUNG, H.-F., Ha-"ras" proteins exhibit GTPase activity: Point mutations that activate Ha-"ras" gene products result in decreased GTPase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 376 - 380, 1985.
- [49] MATTINET, Y., BITTERMAN, P. B., MORNEX, J.-F., GROTENDORST, G. R., MARTIN, G. R., CRYSTAL, R. G., Activated human monocytes express the c-"sis" proto-oncogene and release a mediator showing PDGF-like activity, *Nature*, **319**: 158 - 160, 1986.
- [50] McGRATH, J. P., CAPON, D. J., GOEDEL, D. V., LEVINSON, A. D., Comparative biochemical properties of activated human p21 "ras" protein, *Nature*, **310**: 644 - 649, 1984.
- [51] MELLSTRÖM, K., HÖGLUND, A. S., NISTÉR, M., HELDIN, C.-H., WESTERMARK, B., LINDBERG, U., The effect of platelet-derived growth factor on morphology and motility of human glial cells, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **4**: 589 - 609, 1983.
- [52] MÜLLER, R., BRAVO, R., BURCKHARDT, J., CURRAN, T., Induction of c-"fos" gene and protein by growth factors precedes activation of c-"myc", *Nature*, **312**: 716 - 720, 1984.
- [53] 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 J.*, **2**: 679 - 684, 1983.
- [54] MÜLLER, R., WAGNER, E. F., Differentiation of F 9 teratocarcinoma stem cells after transfer of c-"fos" proto-oncogenes, *Nature*, **311**: 438 - 442, 1984.
- [55] NEEL, B. G., JHANWAR, S. C., CHAGANTI, R. S. K., HAYWARD, W. S., Two human c-"onc" genes are located on the long arm of chromosome 8, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7842 - 7846, 1982.
- [56] NEWMARK, P., Events at the surface of the cell, *Nature*, **317**: 380, 1985.
- [57] NIEWIAROWSKI, S., WALZ, D. A., JAMES, P., RUCINSKI, B., KUEPPERS, F., Identification and separation of secreted platelet proteins by isoelectric focusing. Evidence that low-affinity platelet factor 4 is converted to beta-thromboglobulin by limited proteolysis, *Blood*, **55**: 453 - 456, 1980.
- [58] NISHIMURA, J., HUANG, J. S., DEUEL, T. F., Platelet-derived growth factor stimulates tyrosine-specific protein kinase activity in Swiss mouse 3T3 cell membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 4303 - 4307, 1982.
- [59] O'BRIEN, S. J., NASH, W. G., GOODWIN, J. L., LOWY, D. R., CHANG, E. H., Dispersion of the "ras" family of transforming genes to four different chromosomes in man, *Nature*, **302**: 839 - 842, 1983.
- [60] OLASHAW, N. E., O'KEEFE, E. J., PLEDGER, W. J., Platelet-derived growth factor modulates epidermal growth factor receptors by a mechanism distinct from that of phorbol esters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 3834 - 3838, 1986.
- [61] PAUL, D., NIEWIAROWSKI, S., VARMA, K. G., RUCINSKI, B., RUCKER, S., LANGE, E., Human platelet basic protein associated with antiheparin and mitogenic activities: Purification and partial characterization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 5914 - 5918, 1980.

- [62] PERSSON, H., LEDER, P., Nuclear localization and DNA binding properties of a protein expressed by human c-"myc" oncogene, *Science*, **225**: 718 - 721, 1984.
- [63] PLEDGER, W. J., STILES, C. D., ANTONIADES, H. N., SCHER, C. D., Induction of DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells by serum components: Reevaluation of the commitment process, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 4481 - 4485, 1977.
- [64] RAINES, E. W., ROSS, R., Platelet derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms, *J. Biol. Chem.*, **257**: 5154 - 5160, 1982.
- [65] Research News: c-"myc" implicated in RNA processing, *Science*, **233**: 159, 1986.
- [66] ROBBINS, K. C., DEVARE, S. G., AARONSON, S. A., Molecular cloning of integrated simian sarcoma virus: Genome organization of infectious DNA clones, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2918 - 2922, 1981.
- [67] ROBBINS, K. C., HILL, R. L., AARONSON, S. A., Primate origin of the cell-derived sequences of simian sarcoma virus, *J. Virol.*, **41**: 721 - 725, 1982.
- [68] ROSS, E. M., GILMAN, A. G., Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**: 533 - 564, 1980.
- [69] ROSS, R., GLOMSET, J., KARIYA, B., HARKER, L., A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 1207 - 1210, 1974.
- [70] RUBIN, J. B., SHIA, M. A., PLITH, P. R., Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation in vitro by insulin-like growth factor I, *Nature*, **305**: 438 - 440, 1983.
- [71] RUTHERFORD, R. B., ROSS, R., Platelet factors stimulate fibroblasts and smooth muscle cells quiescent in plasma serum to proliferate, *J. Cell Biol.*, **69**: 196 - 202, 1976.
- [72] RYAN, J., BARKER, P. E., SHIMIZU, K., WIGLER, M., RUDDLE, F. H., Chromosomal assignment of a family of human oncogenes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 4460 - 4463, 1983.
- [73] RYO, R., PROFFITT, R. T., DEUEL, T. F., Human platelet factor 4: Sub-cellular localization and characteristics of release from intact platelets, *Thromb. Res.*, **17**: 629 - 644, 1980.
- [74] SAKAGUCHI, A. Y., NAYLOR, S. L., SHOWS, T. B., TOOLE, J. J., McCOY M., WEINBERG, R. A., Human c-Ki-"ras"-2 proto-oncogene on chromosome 12, *Science*, **219**: 1081 - 1083, 1983.
- [75] SHIH, T. Y., PAPAGEORGE, A. G., STOKES, P. E., WEEKS, M. O., SCOLNICK, E. M., Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p 21 "src" protein of Harvey murine sarcoma virus, *Nature*, **287**: 686 - 691, 1980.
- [76] SINGH, J. P., CHAIKIN, M. A., STILES, C. D., Phylogenetic analysis of platelet-derived growth factor by radio-receptor assay, *J. Cell Biol.*, **95**: 667 - 671, 1982.
- [77] SINGH, J. P., CHAIKIN, M. A., PLEDGER, W. J., SCHER, C. D., STILES, C. D., Persistence of the mitogenic response to platelet-derived growth factor (competence) does not reflect a long-term interaction between the growth factor and the target cell, *J. Cell Biol.*, **96**: 1497 - 1502, 1983.
- [78] SMITH, J. C., STILES, C. D., Cytoplasmic transfer of the mitogenic response to platelet-derived growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 4363 - 4367, 1981.

- [79] SPORN, M. B., ROBERTS, A. B., Autocrine growth factors and cancer, *Nature*, **313**: 745 - 747, 1985.
- [80] SPORN, M. B., TODARO, G. J., Autocrine secretion and malignant transformation of cells, *N. Engl. J. Med.*, **303**: 878 - 880, 1980.
- [81] STILES, C. D., The molecular biology of platelet-derived growth factor, *Cell*, **33**: 653 - 655, 1983.
- [82] SWAN, D. C., McBRIDE, O. W., ROBBINS, K. C., KEITHLEY, D. A., REDDY, E. P., AARONSON, S. A., Chromosomal mapping of the simian sarcoma virus "onc" gene analogue in human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 4691 - 4695, 1982.
- [83] SWEET, R. W., YOKOYAMA, S., KAMATA, T., FERAMISCO, J. R., ROSENBERG, M., GROSS, M., The product of "ras" is a GTPase and T24 oncogenic mutant is deficient in this activity, *Nature*, **311**: 273 - 275, 1984.
- [84] TAUB, R., KIRSCH, I., MORTON, C., LENOIR, G., SWAN, D., TRONICK, S., AARONSON, S. A., LEDER, P., Translocation of the c-"myc" gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7837 - 7841, 1982.
- [85] THEILEN, G. H., GOULD, D., FOWLER, M., DUNGWORTH, D. L., C-type virus in tumor tissue of a woolly monkey (*Lagothrix* spp.) with fibrosarcoma, *J. Natl. Canc. Inst.*, **47**: 881 - 889, 1971.
- [86] WATERFIELD, M. D., SCRACE, G. T., WHITTLE, N., STROOBANT, P., JOHNSON, 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 p 28 "sis" of simian sarcoma virus, *Nature*, **304**: 35 - 39, 1983.
- [87] WESTERMARK, B., HELDIN, C.-H., JOHNSON, A., MELLSTRÖM, K., NISTÉR, M., WASTESON, A., Biochemistry and biology of platelet-derived growth factor, [w:] *Growth and Maturation Factors*, red. G. Guroff, John Wiley and Sons, New York, 1: 73 - 115, 1983.
- [88] WITTE, L. D., KAPLAN, K. L., NOSSEL, H. L., LAGES, B. A., WEISS, H. J., GOODMAN, D. S., Studies of the release from human platelets of the growth factor for cultured human arterial smooth muscle cell, *Circ. Res.*, **42**: 402 - 409, 1978.
- [89] WONG-STAAL, F., DALLA-FAVERA, R., FRANCHINI, G., GELMANN, E. P., GALLO, R. C., Three distinct genes in human DNA related to the transforming genes in mammalian sarcoma retroviruses, *Science*, **213**: 226 - 228, 1981.
- [90] YARDEN, Y., ESCOBEDO, J. A., KUANG, W.-J., YANG-FENG, T. L., DANIEL, T. O., TREMBLE, P. M., CHEN, E. Y., ANDO, M. E., HARKINS, R. N., FRANCKE, U., FRIED, V. A., ULLRICH, A., WILLIAMS, L. T., Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors, *Nature*, **323**: 226 - 232, 1986.

Otrzymano: 3 listopada 1986.

Przyjęto: 7 grudnia 1986.

Adres autorów: Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin.

KRUCHOŚĆ CHROMOSOMÓW CZŁOWIEKA — WARIANTY CHROMOSOMOWE CZY PATOLOGIA STANOWIĄCA ZAGROŻENIE WYSTĄPIENIA WAD WRODZONYCH I CHORÓB NOWOTWOROWYCH

FRAGILITY OF HUMAN CHROMOSOMES — CHROMOSOMAL VARIANTS OR
PATHOLOGY WITH A HIGH RISK OF NEOPLASTIC DISEASE
AND CONGENITAL DEFECTS

Ewa WIERASZKO-SZACIKOWSKA

Centrum Zdrowia Dziecka

Streszczenie. Szczegółowo opisano zjawisko kruchości chromosomów człowieka, podając jednocześnie ich obowiązującą klasyfikację według Sutherlanda. Większość miejsc kruchych genomu człowieka nie jest związana z jakimkolwiek zespołem klinicznym lub nienormalnymi cechami, z wyjątkiem kruchego chromosomu X, który związany jest z zespołem upośledzenia umysłowego u mężczyzn. Nie znane jest kliniczne znaczenie tych miejsc kruchych, jednak w czasie ostatnich dwu lat zwrócono uwagę na to, że może istnieć zależność między występowaniem kruchości chromosomu i białaczkami, a także być może innymi nowotworami. Wstępne dane z trzech różnych źródeł wskazują, że istotnie może tak być. Czy miejsca kruche są czynnikiem predysponującym w kierunku transformacji nowotworowej, czy też działają jedynie w kierunku reorganizacji chromosomów, nie wiadomo. Złamanie chromosomu autosomalnego w miejscu kruchym może mieć oczywiście zupełnie inne następstwa w mitozie i w mejozie. O ile w kolejnych mitozach mogą doprowadzić do powstania jakościowo nowej komórki somatycznej, mozaicyzmu i ustalenia się patologicznego klonu, o tyle w mejozie złamanie chromosomu może predysponować do nowej reorganizacji chromosomów w gametach, które mogą następnie być zapładniane. Pewne dane kliniczne potwierdzają przypuszczenia, że kruchość chromosomów może sprzyjać powstającym de novo strukturalnym i liczbowym aberracjom autosomalnym.

Summary. Heritable fragile sites of human chromosomes have been described in details according to the Sutherland's classification. Most of these fragile sites do not appear to be associated with any clinical syndrome or abnormalities but X-chromosome fragile site is a marker for one form of X-linked mental retardation in the male. We do not yet know the clinical significance of the fragile sites. In the last couple of years attention has been put to some patients who

have a neoplastic disease and a fragile site in their lymphocyte culture. In 1983, Yunis reported that a relationship could exist between fragile sites and leukemia. Preliminary data from three sources suggest that this may be so. Whether these fragile regions carry genes related to cancer or whether these sites only represent predisposing factors for chromosomal rearrangements is not known yet. Chromosome breakage at autosomal fragile sites would, of course, have different outcomes in meiosis and mitosis. In mitosis the carriage of autosomal fragile sites would set the stage for a new somatic cell and mosaicism. Certain cells of these may be destined to constitute cancer. In meiosis chromosome breakage predisposes to new chromosome rearrangement observed in the gamete or consequent conception. Some clinical data confirm that fragility can be attributed to a de novo autosomal structural abnormalities or aneuploidies.

Intencją autorki niniejszego artykułu jest przedstawienie na podstawie najnowszej literatury bardzo trudnego problemu, budzącego wiele kontrowersji, nawet wśród fachowców uchodzących za autorytety. Chodzi mianowicie o obraz morfologiczny, jakim jest obserwowana przez cytogenetyków kruchość chromosomów człowieka. Jak ma się obserwowany pod mikroskopem obraz chromosomu, wynikający z jego chemicznej struktury, do funkcji jaką pełni taki właśnie kruchy chromosom w komórce? Czy miejsca kruche mogą być punktami złamań chromosomu i jakie owa kruchość może mieć ewentualne następstwa w mitozie i w mejozie, a więc co oznacza ona w ontogenezie dla organizmu, nosiciela kruchości, a co dla gamet, które on wytwarza? Oto podstawowe pytania, które nagromadziły się wokół problemu kruchości chromosomów.

Ogromny brak wiedzy w tym zakresie oraz brak odpowiedniej ilości danych klinicznych dotyczących tego zagadnienia, doprowadził do tego, że poszczególne ośrodki badawcze na podstawie własnego materiału sformułowały pewne wnioski i zależności, będące jaskrawym przeciwieństwem tego, co sformułowały inne ośrodki na równie obszernym i wartościowym materiale.

Trwające od około dwudziestu lat badania nad kruchością chromosomów człowieka doprowadziły do opisanie wielu takich miejsc w jego genomie. Starannie dzielono miejsca kruche na grupy i klasy, w zależności od warunków hodowli limfocytów, w których ujawniały się te kruchości, oraz w zależności od tego czy są one dziedziczne, czy nie. Na tym polu szczególnie aktywnie działała grupa badaczy australijskich. To właśnie z tej grupy Sutherland [10] jako pierwszy w 1979 r. w obszernej pracy podał bardzo szczegółowo warunki hodowli limfocytów, dzięki którym można sprowokować ujawnienie się kruchości chromosomów. On także zdefiniował pojęcie miejsca kruchego w chromosomie. Choć definicja ta uległa już znacznym zmianom i wyodrębniono klasy miejsc kruchych, z których każda ma swoją definicję, jednak ze względu na

fakt, że wielu badaczy po dzień dzisiejszy stosuje się do pierwotnie zdefiniowanych zasad oraz ze względu na fakt, że ta pierwotna definicja była punktem wyjścia do dalszych modyfikacji, jak i pewnych nieporozumień nomenklaturowych, warto wymienić trzy podstawowe warunki, które musiało według Sutherlanda spełniać miejsce kruche:

- 1 — jest to nie barwiący się odstęp różnej szerokości, który zazwyczaj włącza obie chromatydy,
- 2 — miejsce to dziedziczy się jako cecha dominująca w sposób zgodny z prawami Mendla,
- 3 — kruchość musi objawić się morfologicznie przez wytworzenie fragmentów acentrycznych lub figur trójpromienistych.

Precyzyjne wyodrębnianie różnych klas miejsc kruchych, uściślanie definicji i cała ta klasyfikacyjna dyskusja miała na celu bardzo dokładne oddzielenie miejsc kruchych od tzw. gorących punktów, czyli lezji autosomalnych [4, 11]. Te ostatnie dają pod mikroskopem najczęściej obraz identyczny jak miejsca kruche, jednak nie są dziedziczne, lecz powstają spontanicznie w pewnych warunkach hodowli i grupują się w pobliżu miejsc skłonnych do złamań. Z czasem jednak okazało się, że lezje autosomalne są tak rozpowszechnione (ponad 60% populacji wykazuje takie lezje), że w tej sytuacji jałowa stała się dyskusja na temat dziedziczenia tej cechy. Obecnie część badaczy uznaje lezje autosomalne za kolejną klasę miejsc kruchych, które niekoniecznie muszą być dziedziczone [7].

W normalnej populacji występowanie lezji autosomalnych jest jednak o wiele bardziej powszechne niż występowanie miejsc kruchych. Miejsca kruche w klasycznym ujęciu Sutherlanda występują rodzinnie i stanowią wielką rzadkość. Wyłącznie tak rozumiane miejsca kruche będą rozważane dalej w niniejszym tekście.

Sutherland już w 1979 r. opisał dziewięć dziedzicznych miejsc kruchych, występujących w siedmiu chromosomach genomu człowieka. Po dzień dzisiejszy opisano takich miejsc 17. Piętnaście z tych miejsc kruchych ujawnia się w warunkach braku kwasu foliowego w medium hodowlanym limfocytów i zlokalizowanych jest w następujących prążkach chromosomów: 2q13, 3p14, 6p23, 7p11, 8q22, 9p21, 9q32, 10q23, 11q13, 11q23, 2q13, 16p12, 20p11 oraz Xq27. Wszystkie one stanowią pierwszą grupę miejsc kruchych. W grupie drugiej i trzeciej znajdują się te miejsca kruche, które nie ujawniają się pod wpływem braku kwasu foliowego w medium hodowlanym, lecz wymagają specyficznego działania określonych substancji. Na przykład miejsca kruche 16q22, 17q12 i 10q25 wymagają specyficznego działania dystamycyny A lub netropsyny czy też bromodezoksyurydyny. Do czwartej grupy miejsc kruchych, zdefiniowanej dość enigmatycznie, zalicza się w gruncie rzeczy lezje autosomalne i pewne konstytucjonalne kruchości. Większość z miejsc kruchych zebra-

nych w owe cztery grupy, nie jest związana z jakimkolwiek zespołem klinicznym lub nienormalnymi cechami, z wyjątkiem kruchego chromosomu X, który jak wiadomo od wielu lat, związany jest z zespołem upośledzenia umysłowego u mężczyzn. Z 17 dotychczas znanych miejsc kruchych 16 dotyczy autosomów. Warto podkreślić, że występowanie miejsc kruchych w normalnej populacji stanowi wielką rzadkość. Najbardziej powszechny jest kruchy chromosom X, który występuje z częstością mniejszą niż 1 na 1000 osobników populacji. W przypadku obecności kruchego chromosomu u danego osobnika nigdy nie występuje on we wszystkich komórkach metafazalnych. W zależności od stosowanych podłoży hodowlanych oraz czynników stymulujących podziały uzyskuje się różny procent ujawniających się miejsc kruchych. Na ogół 30% metafaz zawierających kruchy chromosom stanowi wartość bardzo wysoką, zwykle sięga ona kilkunastu procent lub mniej. W niektórych przypadkach można uzyskać zaledwie 2 - 3% metafaz ujawniających kruchy chromosom. U niektórych pacjentów znalezienie kruchego chromosomu nastęrcza tak wielkie trudności, że znalezienie choć jednej komórki z miejscem kruchym jest potwierdzeniem nosicielstwa, natomiast negatywny rezultat poszukiwań nawet w 300 płytkach metafazalnych nie jest jeszcze zaprzeczeniem nosicielstwa kruchości. Tak więc wykrywanie kruchości chromosomów jest uciążliwe i nieadekwatne.

W czasie ostatnich dwu lat zwrócono uwagę na niektórych pacjentów cierpiących na chorobę nowotworową i będących jednocześnie nosicielami miejsca kruchego, dającego ujawnić się w hodowli limfocytów tych pacjentów. W 1983 r. Yunis [12] na podstawie własnych obserwacji klinicznych wyraził przypuszczenie, że może istnieć zależność między nosicielstwem miejsc kruchych i zapadaniem na białaczkę. W rok później Lebeau i Rowly [5] wykazali, że 7 z 17 dziedzicznych miejsc kruchych jest włączanych w nieprzypadkowe anomalie chromosomowe w przypadku białaczek i chłoniaków. Kolejny rok przyniósł dalsze potwierdzenia tych zależności. De Braekeller i współpracownicy [1] przeprowadzili komputerową analizę cytogenetycznych danych 17 tysięcy przypadków białaczek i chłoniaków oraz 450 pacjentów z niehematologicznym litym guzem nowotworowym. I choć wyniki tej pracy wykazały, że większość, choć nie wszystkie prążki, w których mogą występować miejsca kruche, włączane są w strukturalne aberracje w przypadku nowotworu, to jednak nadal nie ma odpowiedzi na najtrudniejsze pytania dotyczące tego problemu. Chodzi o to, czy miejsca kruche są czynnikiem predysponującym w kierunku transformacji nowotworowej. Istnieje przypuszczenie, że regiony kruche noszą geny związane z nowotworzeniem lub że miejsca kruche reprezentują jedynie czynniki predysponujące do reorganizacji chromosomów w ogóle. Dane kliniczne również nie dają odpo-

wiedzi jednoznacznej. De Braekeller [1] cytuje trzy rodziny z rodzinnie występującym nowotworem oraz z dziedzicznym w tej rodzinie regionem kruchym 16q22, przejawiającym się zarówno u zdrowych, jak i zatakowanych przez nowotwór członków tej rodziny. Z drugiej zaś strony Hecht i Hecht [3] opisują trzy pokolenia dużej rodziny, gdzie dziedziczny kruchy chromosom 16q22 występuje bezobjawowo u wszystkich członków tej rodziny. Z najnowszych danych klinicznych oraz wyników prac eksperymentalnych, jak i wielkich zbiorczych opracowań danych cytogenetycznych i klinicznych metodą analizy komputerowej wynika, że nieznane jest przede wszystkim znaczenie kliniczne miejsc kruchych w chromosomie. Na podstawie tych wstępnych opracowań można przypuszczać, że pewne autosomalne miejsca kruche mogą okazać się całkowicie nieszkodliwe, podczas gdy inne mogą być rzeczywiście kruche, prowadzić do złamań chromosomów i szkodliwych konsekwencji. Większość miejsc kruchych obserwowano jedynie u heterozygot. Pewne autosomalne miejsca kruche mogą być szkodliwe w homozygotie i mieć charakter letalny, prowadząc do spontanicznych poronień. Złamanie chromosomu w miejscu kruchym może mieć zupełnie inne następstwa w mitozie i w mejozie. W mitozie przenoszenie autosomalnego miejsca kruchego może utworzyć stan sprzyjający powstaniu jakościowo nowej komórki somatycznej, zmienionej chromosomowo, co prowadzi do mozaicyzmu ze strukturalnie zmienionym fragmentem chromosomu. Niektóre z tych komórek mogą być skłonne do dalszych zmian w kierunku utworzenia komórek nowotworowych. Dalszy rozwój i ustalenie się patologicznego klonu następuje według wzoru innych proliferatywnych zaburzeń pochodzenia klonalnego. Dobrą ilustracją kliniczną takiego właśnie mechanizmu działania jest praca Sessarego i wsp. [9]. W opisanym w tej pracy przypadku pacjent wykazuje obecność miejsca kruchego 11q13 w 12% płytek metafazalnych limfocytów krwi obwodowej, hodowanych w medium bez kwasu foliowego. Komórki hematopoetyczne mają natomiast interstycjalną delecję w tym samym miejscu tegoż chromosomu, przy współistnieniu białaczki. Autorzy sugerują oczywisty związek między występowaniem opisanej kruchości chromosomu u pacjenta i preferowaniem tego miejsca w zmianach, które doprowadziły do ustalenia się białaczkowej linii limfocytów. Podobnych doniesień można znaleźć więcej. Często dotyczą one miejsca kruchego 16q22.

Złamanie chromosomu w miejscu kruchym ma oczywiście zupełnie odmienne następstwa w mejozie, predysponując do nowej reorganizacji chromosomowej obserwowanej w gametach. Reorganizacja ta może prowadzić w rezultacie do jakościowo nowych zmian w obrębie kruchego chromosomu. Takie gamety mogą brać udział w zapłodnieniu. Tak więc nosicielstwo kruchości chromosomu wydaje się zdecydowanie sprzyjać

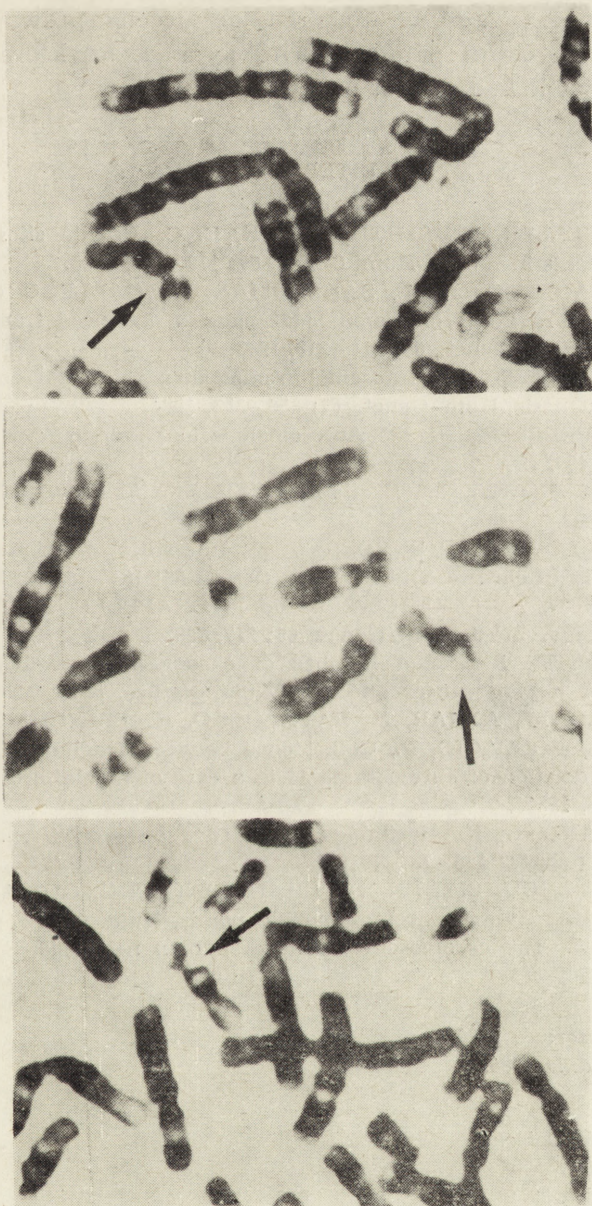
powstawaniu aberracji chromosomowych. Niektórzy autorzy — szczególnie szkoła hiszpańska [2] — stoją na tak dalece skrajnym stanowisku w tej sprawie, że w niektórych przypadkach, a dotyczy to szczególnie kruchości miejsca 16q22, autorzy ci traktują nosicieli wymienionej kruchości jako grupę o zwiększonym ryzyku wystąpienia *de novo* aneuploidii lub chromosomowej anomalii strukturalnej i kwalifikują przyszłych rodziców z tej grupy do diagnostyki prenatalnej.

Tymczasem amerykańscy badacze Hecht i Hecht [3] stoją na całkowicie odmiennym stanowisku. Ich zdaniem postulowanie biopsji kosmówki w przypadkach nosicielstwa kruchości w chromosomie 16 u jednego z rodziców jest wprowadzaniem zbędnego ryzyka. Dysponują oni bowiem pewną liczbą rodzin, gdzie nosicielstwo miejsca kruchego 16q22 przebiega bezobjawowo. Hiszpanie, przeciwnie, zebrali własny materiał uzupełniony doniesieniami kanadyjskimi [1, 6] i innymi, z których wynika, że w rodzinach takich nagminnie występują anomalie chromosomowe, a więc dzieci z wadami oraz inne niepowodzenia rozrodu. Amerykanie sugerują, że jest to przypadkowy zbieg okoliczności, a ogólna liczba przypadków klinicznych zbyt mała, aby wyciągnąć wnioski co do stosowania w tych przypadkach diagnostyki przedurodzeniowej.

Ryc. 1 prezentuje kruchy chromosom 16 we fragmentach trzech różnych mitoz. Zdjęcie pochodzi z pracy Garcia i in. [2]. Nosicielem tego chromosomu jest dorosły zdrowy mężczyzna. Jednak jego syn urodził się z powstałą *de novo* translokacją, ocenioną cytogenetycznie jako zrównoważoną, między chromosomami 1 i 16. Pęknięcie chromosomu 16 nastąpiło w q22. Translokacja ta nie była jednak w pełni zrównoważona pod względem przeniesionego materiału genetycznego. Dziecko wykazuje liczne wady rozwojowe.

Wiele najnowszych prac [1, 2, 6, 8] coraz wyraźniej wskazuje na udział miejsca kruchego 16q22 w predysponowaniu (przynajmniej w niektórych rodzinach) tak w kierunku transformacji nowotworowej, w wyniku ciągu mitoz zmienionych genetycznie komórek somatycznych, jak i w kierunku powstawania aberracji chromosomowych w gametach w wyniku zmian, które zaszły w trakcie mejozy. Z pewnością w zachodzeniu tych zjawisk olbrzymią rolę odgrywają inne jeszcze czynniki, obecnie nie znane, jednak już dziś można określić nosicieli miejsca kruchego 16q22 jako ludzi obarczonych pewnym ryzykiem produkowania wadliwych genetycznie gamet, jak i predyspozycji do wytwarzania klonów nowotworowych. Najprawdopodobniej ryzyko takie zachodzi również w przypadku innych chromosomów kruchych, lecz w obliczu dotychczas zebranych faktów rysuje się to mniej wyraźnie.

Zjawisko kruchości chromosomów jest niesłychanie intrygujące. Będąc u pewnych osobników, a nawet w pewnych rodzinach, cechą prze-



Ryc. 1. Fragmenty trzech różnych mitoz z kruchym chromosomem 16q22 zaznaczonym strzałką. Zdjęcie pochodzi z pracy Garcia i wsp. [2]

biegającą bezobjawowo, fizjologicznie i zachowując się jak wariant chromosomowy, styka się jednak niemal z możliwością zainicjowania procesu kancerogenezy i możliwością powstania de novo aberracji chromosomowych w gametach. Kiedy miejsce kruche staje się niebezpieczne? Jakże

okoliczności muszą zajść w komórce, aby cecha prawie fizjologiczna doprowadziła do ostrej patologii? Oto pytania, na które mogą rzucić światło intensywne badania lat przyszłych.

LITERATURA

- [1] De BRAEKELLER, M., SMITH, B., LIN, C. C., Fragile sites and structural rearrangements in cancer, *Hum. Genet.*, **69**: 112 - 116, 1985.
- [2] GARCIA-SAGREDO, J. M., SAN ROMAN, C., GALLEGGO GOMEZ, M. E., LLEDO, G., Fragile chromosome 16q22 cause a balanced translocation at the same point, *Hum. Genet.*, **65**: 211 - 213, 1983.
- [3] HECHT F., HECHT, B., Autosomal fragile sites not a current indication for prenatal diagnosis, *Hum. Genet.*, **67**: 352 - 353, 1984.
- [4] HOWARD-PEEBLES, P. N., Autosomal lesions versus fragile sites, *Hum. Genet.*, **65**: 408, 1984.
- [5] LEBEAU M., ROWLY, M., Heritable fragile sites in cancer, *Nature*, **308**: 607 - 608, 1984.
- [6] LIN C. C., LOWRY, R., SNYDER, F. F., Interstitial deletion for a region in the long arm of chromosome 16, *Hum. Genet.*, **65**: 134 - 138, 1983.
- [7] MARKKANEN, A., KNUTILLA, S., de la CHAPELLE, A., Inducible fragile site on chromosome 3, *Hum. Genet.*, **65**: 217, 1983.
- [8] MITELMAN, F., Restricted number of chromosomal regions implicated in aetiology of human cancer and leukaemia, *Nature*, 5975: 325 - 327, 1984.
- [9] SESSAREGO, M., AJMAR, F., RAVAZOOLLO, R., BIANCHI SCARRA, G. L., GARRE, C., BOCCACIO, P., Coincidence between fragile site expression and interstitial deletion of chromosome 11 in a case of myelofibrosis, *Hum. Genet.*, **63**: 299 - 308, 1983.
- [10] SUTHERLAND, G. R., Heritable fragile sites on human chromosomes, *Am. J. Hum. Genet.*, **31**: 125 - 135, 1979.
- [11] XIANTING ZHOU, BIZHEN XU, CHAUGLING CHU, GUIFANG XIA, NING LI, REU SHA, Human chromosome hot points, *Hum. Genet.*, **67**: 249, 1984.
- [12] YUNIS, J. J., The chromosomal basis of human neoplasia, *Science* **221**: 227 - 236, 1983.

Otrzymano: 30 czerwca 1986.

Przyjęto: 29 grudnia 1986.

Adres autorki:

Centrum Zdrowia Dziecka

Zakład Genetyki

Al. Dzieci Polskich 20

04-736 Warszawa — Międzylesie

STAN BADAŃ NAD BIAŁKAMI WIAŻĄCYMI WAPŃ —
REFLEKSJE PO MIĘDZYNARODOWYM SYMPOZJUM
W CRANS-MONTANA

Jacek KUŹNICKI

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

W dniach 16 - 18 września 1986 r. odbyło się w Crans-Montana (Szwajcaria) sympozjum pt. „Calcium and Calcium Binding Proteins”, w którym uczestniczyło około 50 osób. Na program sympozjum składały się wykłady zaproszonych gości oraz doniesienia innych autorów. Jeden dzień poświęcony był białkom wiążącym wapń z mięśni i z komórek niemięśniowych; drugi dzień — kalmodulinie i jej roli w regulacji procesów komórkowych, natomiast trzeci dzień obrad dotyczył problemu zatytułowanego „Wapń w różnych systemach biologicznych”. Niniejsze sprawozdanie, ze względu na konieczność syntetycznego ujęcia, nie będzie dokładnie pokrywało się ze strukturą sympozjum. Przede wszystkim zostaną omówione informacje o poszczególnych białkach: ich występowaniu, strukturze i funkcji. Przedstawię następnie doniesienia na temat regulacji poziomu wapnia w komórce i jej organellach, w normie i patologii.

Zarówno organizmy jednokomórkowe, jak i komórki wchodzące w skład organizmów tkankowych, znajdują się stale w środowisku zawierającym milimolowe stężenie jonów wapnia. Stężenie tego kationu wewnątrz komórek jest niższe o co najmniej 3 - 4 rzędy wielkości i wynosi poniżej $10^{-7}M$. Ten gradient stężenia jonów wapnia jest utrzymywany dzięki pracy pomp, tj. ATPaz błonowych, wypompowujących jony wapnia na zewnątrz lub do miejsc przechowywania wewnątrz komórki. Zgodnie z obowiązującym paradygmatem, niski poziom jonów wapnia występuje w komórkach nie pobudzonych, natomiast po aktywacji komórki, np. w wyniku pojawienia się potencjału czynnościowego, następuje wzrost stężenia jonów Ca^{2+} . Akceptorami tych jonów są białka o niskim ciężarze cząsteczkowym, takie jak kalmodulina, troponina C, parwalbumi-

na, białko S-100, onkomodulina lub kalbindyna (białko wiążące wapń zależne od witaminy D). Białka te, pośrednio lub bezpośrednio, wywołują efekty fizjologiczne charakterystyczne dla stanu pobudzenia danej komórki. Wszystkie wymienione białka mają podobne elementy strukturalne, zwane domenami o budowie „EF-hand”. Domena zbudowana jest z dwóch odcinków spirali α -heliksu (odcinka „E” i odcinka „F”) oraz łączącej je pętli. Teoretycznie wszystkie domeny „EF-hand” powinny wiązać jony wapnia; w rzeczywistości tylko niektóre z nich wiążą jony wapnia z wysoką stałą powinowactwa.

Wiązanie kationów dwuwartościowych przez kalmodulinę omówił J. A. Cox. Kalmodulina zawiera cztery domeny „EF-hand”. Dane z NMR wskazują, że I i II domena cząsteczki ma niższe powinowactwo względem wapnia niż domena III i IV, natomiast dane z użyciem pH-statu, metod mikrokalorymetrycznych oraz bezpośrednie pomiary wiązania jonów wapnia wskazują, że kalmodulina ma 4 jednakowe miejsca wiązania o stałej równowagi asocjacji $K_{Ca} = 10^5 M^{-1}$. Ponadto, kalmodulina zawiera cztery miejsca wiązania jonów magnezu ($K_{Mg} = 10^2 M^{-1}$), różne od miejsc wiązania wapnia i działające antagonistycznie względem siebie. Jony wapnia koordynowane są przez reszty aminokwasów znajdujące się w pętli domeny „EF-hand”, podczas gdy jony magnezu są najprawdopodobniej wiązane przez reszty aminokwasów kwaśnych, znajdujące się na odcinkach „E” α -heliksu.

Wiązanie kolejnych jonów wapnia przez domeny „EF-hand” kalmoduliny indukuje zmiany konformacyjne, ale dopiero po związaniu trzeciego jonu możliwa staje się interakcja kalmoduliny z docelowymi białkami, głównie enzymami.

Do enzymów roślinnych aktywowanych przez kalmodulinę należą Ca^{2+} -ATPazy błonowe, kinazy NAD (kinaza cytoplazmatyczna, kinaza w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i kinaza w błonie chloroplastów), oksydoreduktaza ubichinon-NAD oraz różne kinazy białkowe, w tym kinaza zależna od fosfolipidów (referat D. Marmè). Autor sugerował też, że inne procesy zależne od jonów wapnia, takie jak mitozą, wzrost komórki, ruch chloroplastów i cytoplazmy oraz niektóre efekty działania auksyn i cytokinin, zależą również od kalmoduliny. Niski poziom jonów wapnia w komórce roślinnej utrzymywany jest przez ATPazę błonową, aktywowaną przez wapń i kalmodulinę. Aktywność tego systemu obniża się pod wpływem światła, co prowadzi do wzrostu stężenia jonów wapnia w cytoplazmie komórki. Sugeruje się, że ATPaza błonowa traci wrażliwość na kalmodulinę pod wpływem światła, ale dokładny mechanizm tego zjawiska nie jest znany.

W komórce zwierzęcej kalmodulina również reguluje wiele enzymów, m. in. Ca^{+2} , Mg^{+2} -ATPazy błonowe, fosfodwuesterazę, cyklazę, różne ki-

nazy białkowe i niektóre fosfatazy białkowe. Jedną z nich jest fosfataza izolowana z mózgu, zwana kalcineuryną, składająca się z podjednostki A (60 kDa) i podjednostki B (19 kDa) (referat W. Y. Cheunga). Podjednostka B wiąże cztery jony wapnia z wysoką stałą powinowactwa i wykazuje 33% homologii z kalmoduliną. W podjednostce A wyróżnić można domenę katalityczną i dwie domeny regulacyjne: jedna wiąże kalmodulinę druga wiąże podjednostkę B. Podjednostka B nie może zastąpić kalmoduliny i odwrotnie. A zatem kalcineuryna jest enzymem aktywowanym synergistycznie przez dwa różne białka wiążące wapń. Najwyższe stężenie kalcineuryny wykryto w mózgu. Na poziomie komórkowym enzym zlokalizowano w ziarnistościach postsynaptycznych i w pobliżu mikrotubul postsynaptycznych dendrytów. W neuronach mózgu i w siatkówce oka synteza kalcineuryny jest skorelowana z głównym okresem synaptogenezy. Na tej podstawie sugeruje się, że kalcineuryna bierze udział w aktywności synaps.

Kalmodulina pełni kluczową rolę w regulacji skurczu mięśni gładkich jako podjednostka kinazy lekkiego łańcucha miozyny. Obecnie uważa się, że fosforylacja tego łańcucha nie jest jedynym mechanizmem regulującym skurcz mięśni gładkich. Na obecność dodatkowego systemu, związanego z filamentem aktynowym, wskazują m. in. doświadczenia, w których wykazano, że preparaty cienkich filamentów z mięśni gładkich stymulują aktywność ATPazową miozyny izolowanej z mięśni szkieletowych, w sposób zależny od jonów wapnia. S. B. Marston i niezależnie M. Walsh pokazali, że składnikami takich preparatów są aktyna, tropomiozyna i kaldesmon w proporcji 28 : 4 : 1 oraz niewielka ilość nie zidentyfikowanego białka 30 kDa. Marston omówił dane wskazujące, że kaldesmon — białko o ciężarze 120 kDa, wiążące kalmodulinę i aktynę — reguluje aktywność ATPazy aktomiozynowej mięśni gładkich *in vitro* i postulował, że kaldesmon może brać udział w regulacji skurczu tych mięśni *in vivo*. Według Marstona działanie kaldesmonu przypomina działanie troponiny w mięśniach szkieletowych. A mianowicie w nieobecności jonów wapnia kompleks kaldesmon-tropomiozyna hamuje interakcję aktyny z miozyną, natomiast w obecności wapnia kalmodulina odrywa kaldesmon od aktyny i znosi tę inhibicję. Inny pogląd zaprezentował Walsh. Badając nie tylko natywne filamenty aktynowe, ale również mieszaninę białek wchodzących w skład tego filamentu w różnych kombinacjach, stwierdził on, że czułość na wapń ATPazy aktomiozynowej jest zachowana nawet w nieobecności kaldesmonu. Zdaniem Walsha wyniki te sugerują, że kompleks kaldesmon-kalmodulina nie jest odpowiedzialny za zależną od wapnia regulację ATPazy aktomiozynowej mięśni gładkich. A zatem, problem dodatkowych mechanizmów regulujących skurcz tych mięśni pozostaje nie rozwiązany.

W 1977 r. stwierdzono, że kalmodulina aktywuje syntezę cyklicznych nukleotydów, ale mechanizm tego zjawiska nie był badany. Według G. Deliconstantinosa aktywacja cyklicznej guanidynowej w preparatach błon synaptosomalnych zachodzi tylko przy niskich stężeniach kalmoduliny, natomiast przy wysokich stężeniach kalmoduliny następuje obniżenie aktywności enzymu. W podsumowaniu referatu autor sugerował, że kalmodulina reguluje aktywność cyklicznej guanidynowej, działając na fizyczne właściwości błony, tzn. zwiększając jej płynność.

D. M. Watterson przedstawił wyniki badań nad zależnością między strukturą pierwszorzędową kalmoduliny a jej aktywnością biologiczną. Pierwszy cykl omówionych doświadczeń polegał na porównywaniu aktywności kalmodulin różniących się nieznacznie sekwencją aminokwasów. Badano kalmodulinę izolowaną z *Paramecium* — pierwotniaka, który wykazuje reakcje ruchowe zależne od wapnia, podczas których zachodzi aktywne wydalanie jonów potasu. Z mutantu *Paramecium* (pnTa), który nie ma wrażliwego na wapń wydalania potasu, wyizolowano kalmodulinę i oznaczono jej sekwencję. Okazało się, że oba białka różnią się jedną resztą aminokwasową. Następnie przeprowadzono mikroinjekcje obu kalmodulin do komórek zmutowanej formy *Paramecium*. Stwierdzono, że kalmodulina wyizolowana z formy dzikiej przywracała mutantom zależny od wapnia wyrzut potasu, natomiast kalmodulina z mutantu pnTa nie wykazywała tego działania.

Drugi cykl badań D. M. Wattersona i wsp. polegał na badaniu aktywności kalmoduliny, której sekwencję zmieniono przy użyciu technik rekombinacji DNA. Stosując metodę tzw. cassette mutagenesis, wymieniono trzy reszty kwasu glutaminowego na trzy reszty lizyny. Następnie przeprowadzono ekspresję zmutowanego genu w komórkach *E. coli*, która nie ma własnej kalmoduliny. Porównywano wpływ sztucznie zmutowanej kalmoduliny na aktywność trzech wybranych enzymów. Stwierdzono, że fosfodwuesteraza cyklicznych nukleotydów była aktywowana przez zmodyfikowane białko tak jak przez natywną kalmodulinę, kinaza NAD w ogóle nie była aktywowana, natomiast kinaza lekkiego łańcucha miozyny była aktywowana częściowo w porównaniu z normalną kalmoduliną. Główny wniosek z tych badań był taki, że miejsca interakcji różnych enzymów z kalmoduliną są niejednakowe.

J. P. MacManus przedstawił wyniki wskazujące, iż kalmodulina może wpływać na proliferację komórek. Brak jonów wapnia w środowisku zatrzymuje wzrost różnych komórek hodowanych in vitro na granicy fazy G1/S. Podobnie zachowują się niektóre komórki zwierząt wykazujących hypokalcemię, np. komórki regenerującej wątroby, czy aktywowane komórki ślinianki przyusznej. Po dodaniu wapnia, komórki — tak w hodowli, jak i w organizmie — kontynuują normalny cykl życiowy. Stwierdzono, że równoległe z przywróceniem zdolności do podziału wzra-

sta poziom kalmoduliny w tych komórkach. Ponadto okazało się, że związki hamujące aktywność kalmoduliny uniemożliwiały kontynuację cyklu rozwojowego tych komórek po dodaniu wapnia. Kalmodulina podana z zewnątrz stymulowała syntezę DNA w komórkach zatrzymanych w fazie G1 z powodu braku jonów wapnia w środowisku.

MacManus opisał niektóre zmiany w metabolizmie wapniowym komórek nowotworowych. W przeciwieństwie do komórek normalnych większość komórek nowotworowych może rosnąć w środowisku bez wapnia. Ponadto w komórkach nowotworowych obserwuje się dwa rodzaje zmian w poziomie białek wiążących wapń: po pierwsze, wzrost stężenia białek już obecnych w komórce, a więc kalmoduliny, parwalbumin lub S-100; po drugie, pojawienie się białek, których normalnie nie ma w tych komórkach, np. onkomoduliny. Kwestią otwartą jest to, czy zmiany poziomu białek wiążących wapń są odpowiedzialne za wzrost komórek nowotworowych w środowisku pozbawionym jonów wapnia, czy też nie. L. J. Van Eldik podała, że w komórkach nowotworowych poziom kinazy lekkiego łańcucha miozyny obniża się, co może być odpowiedzialne za zmiany w strukturze cytoszkieletu tych komórek.

Płytki krwi aktywowane trombiną lub forskoliną wydzielają do środowiska dwa białka: kalmodulinę i epidermalny czynnik wzrostowy (C. H. Barton). Dwukrotny wzrost stężenia obu białek stwierdzono również w ślinie pacjentów po operacji szczęki. Sugerowano, że może to mieć znaczenie fizjologiczne — stymulować podziały komórkowe.

Referat Ch. Gerdaya dotyczył parwalbumin — białek cytoplazmatycznych o ciężarze 12 kDa, które wiążą dwa jony wapnia i dwa jony magnezu. Parwalbuminy występują głównie w mięśniach szybkich w stężeniu około 1 mM. Chociaż istnieje ścisła korelacja między szybkością skurczu mięśni a stężeniem parwalbumin, ich rola nie jest jednoznacznie wyjaśniona. Prawdopodobnie ułatwiają one i przyspieszają rozkurcz mięśni, przenosząc jony wapnia z miofibrilli do sarkoplazmatycznego retikulum. Uważa się, że Mg^{2+} , Ca^{2+} -ATPaza sarkoplazmatycznego retikulum nie byłaby w stanie odpowiednio szybko obniżyć stężenia jonów wapnia do poziomu rozkurczowego. Ciekawą właściwością parwalbumin, mającą być może znaczenie fizjologiczne, jest wiązanie nukleotydów. W nieobecności kationów dwuwartościowych parwalbumina wiąże ATP, jednakże po związaniu jonów wapnia wzrasta jej powinowactwo względem ADP i 10-krotnie obniża się względem ATP.

M. W. Berchtold sklonował gen kodujący jedną z parwalbumin i porównał go z genami innych białek wiążących wapń. Stwierdził dzięki temu, że organizacja tego genu jest taka sama jak innych genów kodujących białka z rodziny „EF-hand”, co potwierdza wcześniejsze hipotezy o ich wspólnym pochodzeniu.

Przy pomocy metod immunologicznych zidentyfikowano parwalbu-

miny w różnych komórkach mięśniowych ssaków, w tym człowieka (referat C. W. Heizmanna). O ich funkcji można wnioskować na podstawie lokalizacji w tkankach. W układzie nerwowym parwalbuminy są obecne w metabolicznie i elektrycznie aktywnych neuronach. Obecność parwalbumin stwierdzono w neuronach zawierających GABA, co sugeruje ich ewentualną rolę w wydzielaniu neurotransmiterów. Z sześciu rodzajów komórek w siatkówce oka tylko trzy posiadają parwalbuminy. W jądrach stwierdzono dużą ilość parwalbumin, ale tylko w komórkach Leydiga, które przetwarzają testosteron w procesie zależnym od jonów wapnia i cAMP. Po aktywacji tych komórek wzrasta produkcja testosteronu i równolegle wzrasta zawartość parwalbumin. Parwalbumina wyizolowana z jąder jest identyczna z parwalbuminą mięśniową.

Białka S-100 występują w postaci trzech dimerów, zbudowanych z kombinacji dwóch monomerów: S100a (alfa-alfa), S-100a' (alfa-beta) i S-100b (beta-beta) (referat J. Baudiera). Każdy monomer wiąże dwa jony wapnia ze stałą równowagi wiązania $10^5 M^{-1}$. Dimery wiążą cztery jony wapnia, ale ze stałą niższą o jeden rząd wielkości. Dimer S-100b wiąże nie tylko jony wapnia, ale również cztery jony cynku. Powoduje to obniżenie stałej wiązania wapnia o jeden rząd wielkości, ale nie zapobiega jego wiązaniu. Może to sugerować, że miejsca wiązania wapnia i cynku są różne. Dimer S-100a w ogóle nie wiąże cynku. Białko S-100b depolimeryzuje mikrotubule za pośrednictwem białka tau. L. J. Van Eldik wykryła kilka białek specyficznym reagujących z białkiem S-100; jedno z nich — o ciężarze 40 kDa — zidentyfikowała jako aldolazę. Pokazała też, że w obecności wapnia dimery białka S-100 3-krotnie zwiększają aktywność aldolazy z mózgu. Aktywują one również aldolazę mięśniową, ale niezależnie od stężenia jonów wapnia.

Białko S-100 występuje nie tylko w komórkach nerwowych. Przy pomocy metod immunologicznych stwierdzono jego obecność w jądrach (w komórkach Leydiga), w nerkach, sercu i skórze.

W jelitach kręgowców są dwa rodzaje białek wiążących wapń, zależnych od witaminy D. Jeden rodzaj to białka o ciężarze 28 kDa (kalbindyna D-28k), a drugi to białka o ciężarze 9 kDa. Ostatnio okazało się, że białko 28 kDa występuje nie tylko w jelicie, ale również w mózgu, nerkach i jądrze (referat M. R. Celio i K. Maruyamy). Synteza tego białka w nerkach, tak jak w jelicie, zależy od witaminy D, natomiast w mózgu — nie zależy. Przy pomocy przeciwciał zlokalizowano kalbindynę D-28k w komórkach Purkiniego oraz w komórkach nerwowych, których kanały wapniowe są blokowane przez pochodne dwuhydropirydyny. Stwierdzono, że w mózgu kalbindyna D-28k występuje komplementarnie do parwalbumin. Neurony zawierają albo parwalbuminę, albo kalbindynę. Opisano również neurony, które nie zawierają żadnego z tych białek.

Kalbindyna D-28k występuje głównie w cytoplazmie i prawdopodobnie jest związana ze strukturami cytoszkieletu. W niektórych stanach patologicznych obserwuje się zmniejszenie stężenia kalbindyny w mózgu, tak jak np. w chorobie Alzheimera charakteryzującej się m. in. zaburzeniem pamięci. Synteza kalbindyny D-28k zależy od stanu funkcjonalnego neuronów. Zakrycie jednego oka u kotów powoduje zanik kalbindyny w neuronach odpowiedzialnych za proces widzenia. Sekwencja aminokwasów kalbindyny z mózgu wołu wykazuje 78,5% homologii z sekwencją białka jelitowego z kurcząt.

J. Kuźnicki opisał właściwości białka wiążącego wapń wyizolowanego z komórek nowotworowych raka wysiękowego Ehrlicha. Wykryte białko wydaje się podobne do jelitowego białka o ciężarze 9 kDa, zależnego od witaminy D.

J. P. MacManus podsumował informacje na temat onkomoduliny. Jest to białko wiążące wapń, o ciężarze około 12 kDa, które normalnie pojawia się tylko w czasie rozwoju embrionalnego. Duże stężenie onkomoduliny wykryto w łożysku, gdzie aktywuje ona fosfodwuesterazę cyklicznych nukleotydów. Ponowną syntezę onkomoduliny obserwuje się w 70% nowotworów wywołanych przez wirusy lub czynniki chemiczne. Na podstawie sekwencji aminokwasowej oraz punktu izoelektrycznego można uważać onkomodulinę za parwalbuminę typu beta. Onkomoduliny wyizolowane z tkanek ludzkich i tkanek szczura są identyczne.

W mięśniach bezkręgowców nie ma parwalbumin, natomiast występują inne białka sarkoplazmatyczne wiążące wapń (SCaBP) (referat Ch. Gerdaya). Różnią się one od parwalbumin wyższym ciężarem cząsteczkowym (20 kDa) i zdolnością do tworzenia dimerów. Monomery SCaBP zbudowane są z czterech struktur „EF-hand”, z których niektóre utraciły zdolność wiązania jonów wapnia.

Według C. W. Heizmanna w warstwie proliferacyjnej skóry znajduje się białko wiążące wapń o ciężarze 12 kDa, zwane EP-12. Białko to ma niższy punkt izoelektryczny od parwalbuminy znajdującej się w podskórnej tkance mięśniowej i przypomina inhibitor jednej z proteaz epidermalnych.

Troponina C w kompleksie z innymi białkami reguluje cykl skurczowo-rozkurczowy w mięśniach szkieletowych i sercowych. Na podstawie sekwencji troponiny C z mięśni różnych organizmów uważa się obecnie, że nie jest to białko konserwatywne pod względem strukturalnym (referat W. Wnuka). Zmiany w sekwencji powodują, że liczba wiązanych jonów i specyficzność wiązania jonów wapnia i magnezu są różne dla różnych białek. Troponina C z mięśni szkieletowych królika ma dwa miejsca specyficzne względem wapnia (I, II) i dwa miejsca wapniowo-magnezowe (III, IV). Troponina C z mięśni wolnych i mięśnia sercowego

wiąże tylko trzy jony wapnia; tylko jedno miejsce jest specyficzne względem wapnia, a dwa pozostałe to miejsca wapniowo-magnezowe. Troponina C z *Ascidiaeae* wiąże dwa jony wapnia, a troponina C z langusty — tylko jeden jon wapnia.

Kilka doniesień przedstawionych w Crans-Montana dotyczyło regulacji poziomu wapnia w komórce (referaty R. M. Case, S. Cockcroft, J. Meldolesi, I. Schultz i M. Wibo). Najwięcej uwagi poświęcono udziałowi fosfolipidów w tym procesie i roli tzw. receptorów mobilizujących wapń, takich jak receptory muskarynowe, adrenergiczne, histaminowe i wazopresynowe. Receptory te nie tylko stymulują kanały wapniowe w błonie plazmatycznej, ale również mobilizują wapń z wewnątrzkomórkowych rezerwuarów. Oprócz mobilizowania wapnia receptory te mają wielofunkcyjną rolę w powstawaniu cGMP, uwalnianiu kwasu arachidonowego oraz w hydrolizie fosfoinozytydów do dwuacyloglicerolu (aktywatora kinazy białkowej C) i trójfosfoinozytolu. I. Schultz i niezależnie S. Cockcroft omówiły właściwości enzymu hydrolizującego fosfoinozytydy, a w szczególności wpływ analogów nukleotydydów guanidynowych na aktywność tego enzymu.

Na przykładzie preparatów z trzustki i z gruczołów ślinowych M. Case omówił uwalnianie białek w procesie egzocytozy i uwalnianie elektrolitów zachodzące równoległe ze wzrostem stężenia jonów wapnia w komórce.

Uwalnianie neurotransmiterów odbywa się na drodze egzocytozy w odpowiedzi na wzrost poziomu wapnia. J. Meldolesi stwierdził jednak, że kanały wapniowe w różnych komórkach mózgu są regulowane niejednakowo. Aktywacja kinazy białkowej C hamuje kanały wapniowe wrażliwe na impulsy elektryczne w komórkach PC-12, ale nie hamuje kanałów wapniowych w neuronach układu współczulnego.

Jest znanym faktem, że zbyt wysokie stężenie wapnia jest toksyczne dla komórki. F. di Virgilio omówił hipotezę, według której podwyższenie stężenia jonów wapnia w komórce jest początkowym etapem cyklu prowadzącego do śmierci komórki.

W chorobie zwanej spazmofilią stwierdzono spadek poziomu wapnia w limfocytach ze 106 nmoli/l do 78 nmoli/l, podczas gdy poziom wapnia w płynach ustrojowych nie zmieniał się (referat S. Ortolani). Po podaniu witaminy D i kalcitoniny poziom wapnia komórkowego podnosił się, a objawy chorobowe zanikały.

Fosfolamban jest jednym z integralnych białek sarkoplazmatycznego retikulum mięśnia sercowego. Po fosforylacji tego białka obserwuje się 5-krotny wzrost aktywności Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPazy. Fosfolamban składa się z 5 identycznych jednostek, z których każda ma dwa miejsca ulegające fosforylacji: jedno — rozpoznawane przez kinazę zależną od kal-

moduliny, drugie — przez kinazę zależną od cAMP. W sarkoplazmie mięśnia sercowego wykryto inhibitor Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPazy błon (referat M. Chiesi). Sugeruje on, że inhibitorem tym jest cytoplazmatyczna aktyna. Różne aktyny w niejednakowym stopniu hamują Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPazę błonową z mięśni sercowych: aktyna z mięśni gładkich 100 razy słabiej, natomiast aktyna z miofibryli mięśnia sercowego 20 razy słabiej niż białko izolowane z sarkoplazmy mięśnia sercowego. Stwierdzono, że DNAza oraz albumina zapobiegają działaniu tego inhibitora.

Badania i hipotezy przedstawione na sympozjum w Crans-Montana obejmowały prawie całokształt tematyki dotyczącej białek wiążących wapń. Na tej podstawie można pokusić się o próbę podsumowania badań w tej dziedzinie i określenie najbardziej przyszłościowych kierunków.

Badania dotyczące roli kalmoduliny w regulacji procesów komórkowych stanowią obecnie główny nurt w dziedzinie białek wiążących wapń, natomiast badanie białek wiążących wapń, biorących udział w skurczu mięśni, nie jest już tak rozpowszechnione, jak było uprzednio, prawdopodobnie dlatego, że w latach siedemdziesiątych w znacznym stopniu wyeksploatowano to zagadnienie. Coraz większą uwagę zwraca się na inne niż kalmodulina białka wiążące wapń — pod kątem ich ewentualnej roli w regulacji procesów metabolicznych w komórkach normalnych i nowotworowych. Przykład białka S-100 aktywującego aldolazę, onkomoduliny aktywującej fosfodwuesterazę i syntezę DNA oraz informacje o aktywacji Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPazy błonowej przez kalbindynę D-28k wskazują, że badania w tej dziedzinie przynieść mogą, już w niedalekiej przyszłości, wiele nowych interesujących informacji.

Praca finansowana z Programu CPBP 04.01.

Adres autora: Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

Przyjęto: 10 listopada 1986.

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumeratę na kraj przyjmują i informacji o cenach udzielają urzędy pocztowe i doręczyciele na wsi oraz Oddziały RSW „Prasa—Książka—Ruch” w miastach.

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

Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:

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

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa.

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 bankres:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

TRESC

J.	NIWELIŃSKI, 25 lat Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików	49
P.	W. BARLOW, Hierarchia organizacji roślin oraz przekaz informacji podczas rozwoju	63
A.	TRETYN, Charakterystyka roślinnego systemu cholinergicznego. Cholinoesterazy roślinne	83
Z.	M. RUPNIEWSKA, A. DMOSZYŃSKA-GIANNOPOULOS, Płytkowo-pochodny czynnik wzrostu	97
E.	WIERASZKO-SZACIKOWSKA, Kruchosć chromosomów człowieka — warianty chromosomowe czy patologia stanowiąca zagrożenie wystąpienia wad wrodzonych i chorób nowotworowych	113
J.	KUŹNICKI, Stan badań nad białkami wiążącymi wapń — refleksje po międzynarodowym sympozjum w Crans-Montana	121