

PL ISSN 0324-833X

234-2al

**POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE**

# Postępy Biologii Komórki

**TOM 14-NR 3**

**1987 (131-254)**

*Jerzy Kuznicki*

**PWN WARSZAWA-WROCŁAW**

<http://rom.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 PRZE-  
LĘCKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

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

---

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział Wrocławski

Nakład 566 + 94 egz. Ark. wyd. 10. Ark. druk. 7,75. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100 cm.  
Oddano do składania 18 V 1987 r. Podpisano do druku w październiku 1987 r. Druk. ukończono  
w październiku 1987 r. Zam. 275/87. Cena 140 zł

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

<http://rcin.org.pl>

## REAKCJE WIELKICH AMEB NA ŚWIATŁO

## LIGHT REACTIONS IN GIANT AMOEBAE

Krzysztof ŁAZOWSKI

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

*Streszczenie.* W artykule omówiono wpływ światła na zachowanie się dużych, bezbarwnych ameb typu proteus. Po przedstawieniu historii badań fotoreakcji ameby omówiono indukowane światłem reakcje pierwotniaka: fotofobową i ujemną fototaktyczną, a także zmiany aktywności w cyklu dobowym oraz wpływ warunków zewnętrznych na przebieg fotoreakcji. Opierając się na piśmiennictwie i badaniach własnych omówiono mechanizmy leżące u podstaw reakcji świetlnych pierwotniaka.

*Summary:* The effect of light on the behaviour of giant, colourless proteus-type amoebae is presented. Following a historical outline of the research in this field such photoreactions as a photophobic and a negative phototactic responses, as well as the circadian activity and the influence of external factors on photoreactions are presented. The mechanisms underlying the protozoan photoreactions are discussed on the basis of current references and author's studies.

Pod koniec XIX w. stwierdzono, że niektóre heterotroficzne pierwotniaki, w szczególności wielkie drapieżne ameby o bezbarwnej cytoplazmie, wykazują wrażliwość na światło. Engelmann [11] np. obserwując dużą wolno żyjącą amebę, określoną przez niego jako *Pelomyxa palustris*<sup>1</sup>, zauważył, że jej oświetlone intensywnym światłem pseudopodia kurczą się i wycofują z naświetlonego obszaru. Davenport [10], badając lokomocję *Amoeba proteus* w horyzontalnie padającej wiązce światła, zaobserwował, że pierwotniaki zmieniają kierunek ruchu i wykazują negatywną fototaksję. Autor ten nie stwierdził natomiast reakcji ameby na zmiany natężenia światła przy przechodzeniu granicy cień—światło. Harrington i Leaming [21], fotografując aktywnie poruszające się

<sup>1</sup> Była to inna wielojądrowa ameba. Wydaje się, że *Pelomyxa palustris* jest nieczuła na światło [20].

ameby (*A. proteus*), zauważyli, że zastosowany impuls silnego światła białego indukuje zatrzymanie przepływu i formowania się pseudopodiów w przedziale czasu pozwalającym na zrobienie ostrych, wyraźnych zdjęć. Zahamowanie aktywności ruchowej było znoszone poprzez umieszczenie w wiązce świetlnej filtra czerwonego, zielonego lub fioletowego.

Jeden z najwybitniejszych badaczy ruchu amebowego S. O. Mast w pracach publikowanych w latach 1910 - 1941 zweryfikował dotychczasowe obserwacje i znacznie rozwinął badania fotoreakcji ameb, m.in. wskazując na związek indukowanych światłem zmian aktywności ruchowej ze zmianami strukturalnymi cytoplazmy. W fotobehaviorze pełzaków wyróżnił dwa rodzaje reakcji: fotofobową typu „step-up” i fototaksję ujemną<sup>2</sup>, wskazując na ich wzajemną zależność [35, 36]. Duże znaczenie miało też określenie przez Masta [35] przybliżonego przedziału spektralnego światła (430 - 490 nm) aktywującego reakcję ameb. Inman [25] rozszerzył ten zakres na środkową część widma nadfioletu, który okazał się bardzo silnym induktorem reakcji fotofobowej ameb, a także pinocytozy, zarówno w nienaruszonych pierwotniakach, jak i w ich jądrowych i bezjądrowych fragmentach [49].

Dalsze badania wykazały hamujący wpływ wysokich natężeń światła na procesy wewnątrzkomórkowe, np. na podziały komórkowe [6]. Stwierdzono także, że światło o niskich natężeniach aktywuje przepływ cytoplazmy [26]. *A. proteus* zasiedla ocienione partie czystych zbiorników wodnych i chętnie gromadzi się pod zawieszonymi w wodzie liśćmi, unikając bezpośredniej ekspozycji na światło słoneczne. Badając młode hodowle w fazie wzrostu logarytmicznego [26], obserwuje się zależność między aktywnością ruchową a natężeniem oświetlenia w cyklu dobowym. Podobne zmiany można indukować, modulując natężenia światła szmaragdowego.

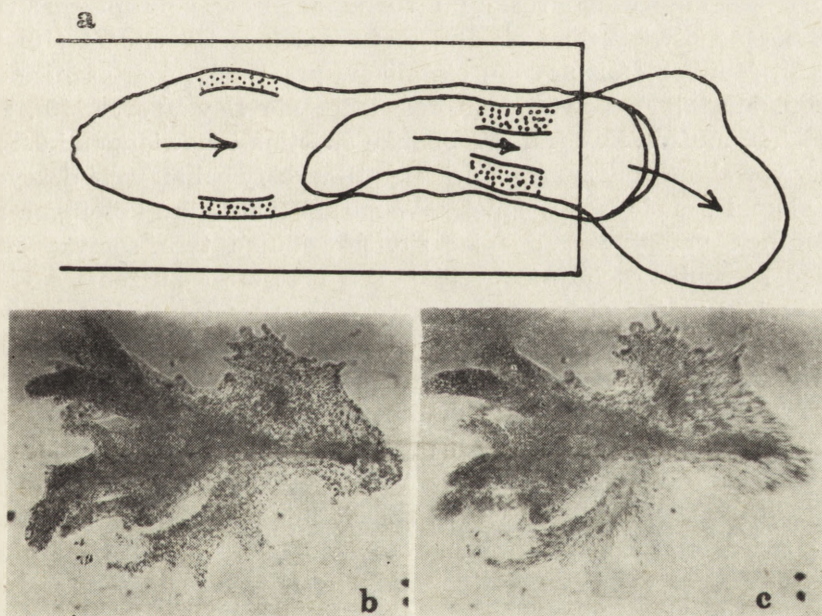
#### REAKCJA FOTOFOBOWA

Ameby typu chaos—proteus reagują na zmiany natężenia światła i na kierunek padania wiązki. Analizując aktywność przepływową i lokomocyjną oraz orientację pierwotniaków, wyróżniamy obecnie dwa typy reakcji: fotofobową typu „step-up” i fototaktyczną ujemną.

Po raz pierwszy reakcję fotofobową opisali Harrington i Leaming [21] oraz Mast [35], którzy stwierdzili, że gwałtowne zwiększenie natęże-

<sup>2</sup> Podana terminologia jest współczesna. Reakcje „step-up” charakteryzują się, po nagłym wzroście natężenia światła, chwilowym zatrzymaniem ruchu i następnie podjęciem go w innym niż uprzednio kierunku. Negatywna fototaksja to ruch od źródła światła.

nia światła padającego na aktywnie poruszającego się pierwotniaka powoduje przejściowy (do 4 min.) zanik przepływu cytoplazmy i lokomocji. Zatrzymanie przepływu zaczyna się od aktywnych pseudopodiów i rozprzestrzenia się w stronę uroidu komórki, a jego zasięg zależy od wielkości zmiany natężenia światła. Przy impulsowych, podprogowych<sup>3</sup> zmianach wartości energii wiązki świetlnej padającej na komórki, obserwuje się przejściowe zwolnienie przepływu cytoplazmy w postępujących pseudopodiach. Światło o większych energiach indukuje przejściowe zatrzymanie przepływu cytoplazmy w aktywnych pseudopodiach. Po okresie immobilizacji kierunek lokomocji może być zachowany lub może nastąpić wycofanie cytoplazmy i zanik wysuwanego pseudopodium, czemu towarzyszy zmiana kierunku ruchu. Na impulsy świetlne o wartościach energii znacznie większych od energii progowej ameba reagują skurczem aktywnych pseudopodiów, a nawet skurczem całej komórki i zerwaniem kontaktu z podłożem. Mast [40], mierząc stosunek grubości warstwy plaz-



Ryc. 1. Wpływ światła na lokomocję ameb. a — zmiana kształtu ciała wywołana oświetleniem całej ameby z wyjątkiem frontalnej części przodu, wyraźny skurcz części oświetlonej, pozostały fragment ciała rozszerza się [40]. b — naświetlenie całej ameby światłem niebieskim o dużym natężeniu powoduje zatrzymanie cytoplazmy. c — ten sam osobnik co poprzednio, ale oświetlony światłem czerwonym, wyraźnie widoczny przepływ cytoplazmy w części ogonowej. W obu doświadczeniach czas ekspozycji 3 sekundy, przedział czasu między zdjęciami 10 sek.

<sup>3</sup> Energia progowa — wartość energii wiązki świetlnej indukująca zatrzymanie przepływu cytoplazmy w całym pierwotniaku.

mażelowej do grubości przepływającego plazmazolu, stwierdził, że w części ameby oświetlonej silnym światłem dochodzi on do 1,45, podczas gdy w komórkach kontrolnych wynosi 0,78. Grubość warstwy plazmażelowej praktycznie nie ulega zmianie, zmniejsza się natomiast średnica oświetlonej części, świadcząc o wypchnięciu części plazmazolu i tym samym o zachodzącym aktywnym skurczu (ryc. 1).

Poziom restytuowanej aktywności ruchowej zależy od natężenia światła utrzymującego się po zadziałaniu bodźca [44]. Przy stopniowym zwiększaniu natężenia światła nie obserwuje się reakcji fotofobowej, aczkolwiek występują zmiany aktywności ruchowej związane z wielkością natężenia światła.

#### LOKALNA STYMULACJA AMEB BODŻCEM ŚWIETLNYM

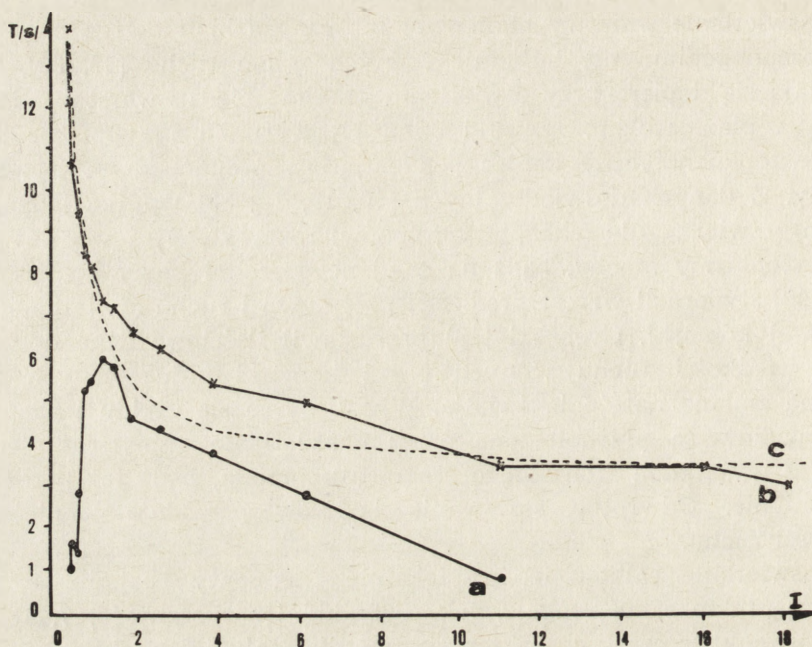
Pierwsze obserwacje reakcji i ruchu ameb w polu przedzielonym ostrą linią na oświetloną i ciemną część wykonał Davenport [10] i nie stwierdził żadnych zmian ruchu osobników przechodzących granicę światło—cień. Mast [35], powtarzając doświadczenie Davenporta [10], zastosował do stymulacji kwadratową plamkę świetlną o powierzchni 0,5 mm<sup>2</sup>. Zaobserwował on zatrzymywanie się i wycofywanie wchodzących w obręb plamki pseudopodiów ameby. W następstwie kilku kolejnych reakcji kierunek przepływu zmieniał się, powodując tym samym zmianę ogólnego kierunku ruchu ameby [43]. Ten tzw. efekt „uczenia się” pierwotniaka [40] można otrzymać, stosując także pojedynczy impuls świetlny o większym natężeniu. W obu wypadkach „uczenie się” pierwotniaka było wynikiem nakładania się następujących po sobie lokalnych żelifikacji, powodujących powstanie gradientu siły elastycznej plazmażelu, a w następstwie zmianę kierunku przepływu cytoplazmy. Żelujące plazmazol działanie miejscowego bodźca nie jest przenoszone poza obręb stymulacji, co stwierdził Mast [40], naświetlając za pomocą prostokątnej plamki świetlnej różne partie pierwotniaka. Żelifikacja plazmazolu następuje w sąsiedztwie plazmażelu, zwiększając jego grubość i sprężystość (elastic strength). Oświetlenie przednich części aktywnych pseudopodiów ameb politaktycznych (terminologia [17]) powoduje opóźnienie lub zanik przepływu w stymulowanych pseudopodiach, nie indukując jednakże takich zmian w innych. Obserwowane wielokrotnie zmiany przepływu w nie stymulowanych pseudopodiach są efektem wtórnym, związanym z ogólną zmianą przepływu wymuszoną zmianami aktywności naświetlonych pseudopodiów [40], [19], i zależą od aktywności i wzajemnej lokalizacji pseudopodiów w stosunku do głównego strumienia przepływu (Łazowski — wyniki nie publikowane).

Naświetlenie warstwy hialinowej lub czepka hialinowego postępującego pseudopodium nie indukuje żadnych zmian ruchu [40, 33], które pojawiają się dopiero przy oświetleniu granicy między warstwą plazmażelową a plazmazolem. Bovee i Jahn [4] wysunęli przypuszczenie, że tylko ektoplazmatyczny koniec postępującego pseudopodium jest światłoczuły. Z danych doświadczalnych [40, 15, 16, 33] wynika jednak, że elementy światłoczułe (akceptory fotonów) rozproszone są w całej objętości cytoplazmy ameby, bądź na całej powierzchni błony komórkowej. Mast [40] stwierdził wzrost prędkości przepływu i ruchu oświetlonej części tylnej komórki. Grębecki [16] przedstawił ilościowe dane dotyczące zmian prędkości ruchu różnych partii komórki indukowanych około 4-krotną zmianą natężenia światła. Wycofywanie się uroidu i ekspansja pseudopodiów są przyspieszone przez naświetlanie różnych części komórki, z wyjątkiem frontального fragmentu przodu, bądź też przez jego zaciemnienie. Odwrotne stosowanie bodźców powoduje zmniejszenie szybkości ruchu.

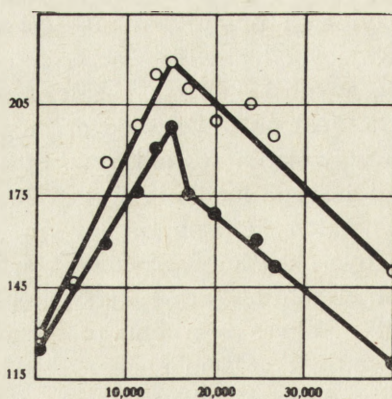
Naświetlane całkowicie lub lokalnie fragmenty bezjądrowe ameb wykazują takie same reakcje, jak osobniki nienaruszone [5, 7, 18, 21], z tym jednak, że czasy charakterystyczne dla reakcji fotofobowej i restytucji aktywności są dłuższe [5].

#### ZALEŻNOŚCI KINETYCZNE REAKCJI FOTOFOBOWEJ

Analizując przebieg reakcji fotofobowej *A. proteus*, można wyróżnić kilka charakterystycznych faz parametryzowanych czasami ich trwania [12, 14]. Reakcja zatrzymania przepływu nie jest natychmiastowa. Czas reakcji, tj. czas upływający od chwili włączenia bodźca do zatrzymania przepływu cytoplazmy, wynosi 1 - 15 s i zależy w sposób hiperboliczny od natężenia światła. Jest on dłuższy od czasu trwania impulsu świetlnego niezbędnego do wywołania reakcji, tzw. czasu stymulacji. Różnica między czasami reakcji i stymulacji nie jest stała i zależy od natężenia światła (ryc. 2). Przy ustalonym ponadprogowym natężeniu światła czas stymulacji wydaje się być określony progową wartością energii niezbędnej do wywołania reakcji fotofobowej [12]. Następująca po naświetleniu ameb faza bezruchu, tzw. okres bezruchu (do 4 min.), wzrasta wraz ze wzrostem natężenia światła i czasem ekspozycji [14]. Przy długich czasach ekspozycji ameba podejmuje lokomocję w nowych warunkach świetlnych. Mamy tu do czynienia z procesem adaptacji, wyrażającym się podjęciem na nowo aktywności przepływowej cytoplazmy i lokomocji o innych parametrach (ryc. 3). W warunkach ciągłego oświetlenia przed-



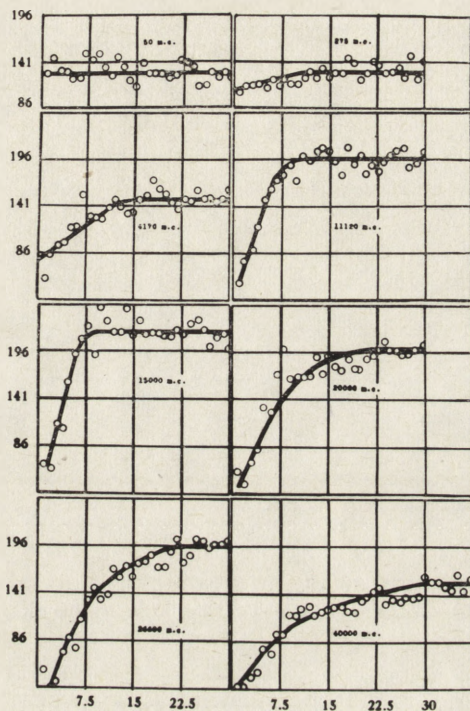
Ryc. 2. Kinetyka reakcji fotofobowej [12]. a — zależność czasu utajonego reakcji od natężenia światła ( $\cdot$ ). b — zależność czasu reakcji od natężenia światła ( $\times$ ). c — hiperbola dopasowująca zależność czasu reakcji od natężenia światła (---). Oś odciętych — względnie natężenie światła  $I$ , oś rzędnych — czas w sekundach.



Ryc. 3. Zależność prędkości lokomocji od natężenia światła [44]. Krzywa górna — średnia maksymalna prędkość, krzywa dolna — prędkość średnia. Oś odciętych — natężenie światła (mcd), oś rzędnych — prędkość lokomocji ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ).



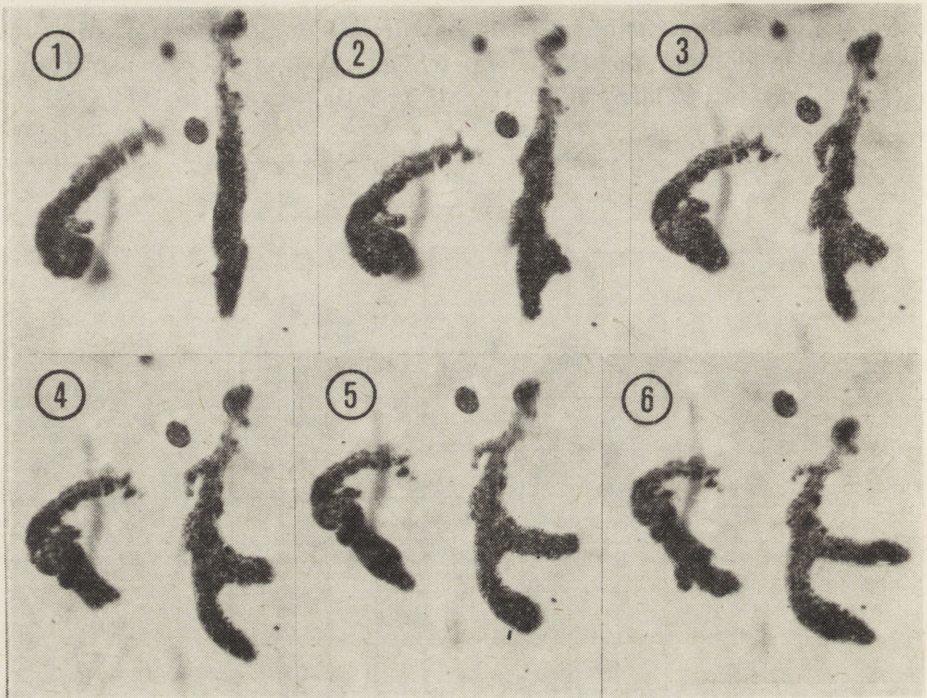
kość lokomocji odnawianej po fazie bezruchu stopniowo wzrasta i osiąga wartość stałą dopiero po upływie pewnego czasu, tzw. czasu restytucji (ryc. 4), który jest zależny od natężenia światła.



Ryc. 4. Kinetyka adaptacji do zmienionych warunków świetlnych dla różnych natężeń padającego światła [44]. Oś odciętych — czas (min) upływający od chwili podjęcia ruchu przez badanego osobnika, oś rzędnych — prędkość lokomocji pierwotniaka ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ).

#### REAKCJA FOTOTAKTYCZNA

Ameby znajdujące się w horyzontalnej lub ukośnie padającej wiązce światła przemieszczają się w kierunku od jego źródła, przyjmując często wydłużoną, ortotaktyczną postać (ryc. 5). Zachowanie to, po raz pierwszy opisane przez Davenporta [10], było szczegółowo badane przez Masta [35], który pierwszy zasugerował, że orientacja ameby wymuszona kierunkowym bodźcem może wynikać z zahamowania formowania się nibynóżek po bardziej oświetlonej stronie komórki. Reakcja fototaktyczna miałaby zatem to samo podłoże co reakcja fotofobowa [38], a zmiana kształtu ciała pierwotniaka (przyjmowanie postaci ortotaktycznej) byłaby konsekwencją spowodowanego absorpcją i rozpraszaniem (zjawisko zacieniania —



Ryc. 5. Indukowane światłem zmiany orientacji pierwotniaka. Światło pada z lewej strony. Przedział czasu upływający między kolejnymi ekspozycjami — 10 s.

shading effect) gradientu natężenia światła, wytwarzającego z kolei gradient własności elastycznych cytoplazmy. Uroid powstaje po najbardziej oświetlonej stronie komórki, aktywne pseudopodia po stronie przeciwnej. Takie samo zjawisko obserwuje się w trakcie restytucji ruchu ameb obserwowanych w silnym świetle oświetlającego układu mikroskopu. Powstające pseudopodia rozwijają się początkowo ku górze, a nie na boki, aż do momentu wpłynięcia w nie prawie całej cytoplazmy ameby. Dopiero po kilku takich próbach rozwijają się u podstawy i rozprzestrzeniają horyzontalnie, tworząc lokalne kontakty ze szkłem, niezbędne dla podjęcia lokomocji.

Hipoteza Masta [35, 38] wyjaśniająca orientację pierwotniaka na gruncie gradientu własności lepkoelastycznych komórki znalazła potwierdzenie w wynikach uzyskanych przez Müller [45]. Autorka ta wskazała również na istnienie i ilościowo wyznaczyła progowe natężenie światła białego (2000 - 6500 lux) indukującego reakcję fototaktyczną.

Fragmenty bezjądrowe, stymulowane wiązką horyzontalną, przybierają, podobnie jak osobniki posiadające jądro, cylindryczny kształt ciała, minimalizując powierzchnię wystawioną na działanie światła [7]. Po wy-

łączeniu bodźca kierunkowego fragmenty przybierają kształt sferyczny. Autorzy pracy [18] stwierdzili, że fragmenty bezjądrowe, które nie utraciły kontaktu z podłożem, stymulowane granicą światło—cień przesuwają się w stronę cienia. Podobnie reagują osobniki z większą liczbą jąder.

Schaeffer [51] i Mast [40] wzmiankowali, że niektóre osobniki *A. proteus* w przeciwieństwie do innej wolno żyjącej ameby *Chaos carolinensis*, reagują w identyczny sposób jak *A. proteus*, wykazują w bardzo słabym natężeniu światła dodatnią fototaksję. Autorzy ci nie przedstawili jednak bezpośrednich danych potwierdzających opisane obserwacje.

#### CYKL DOBOWY

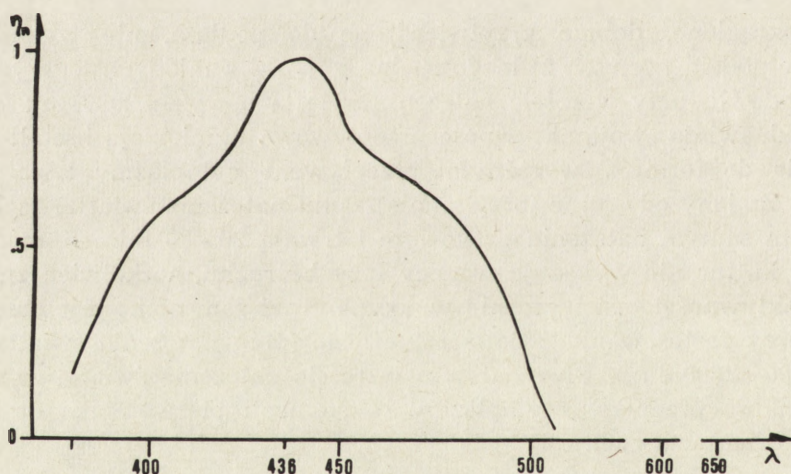
Obserwowany przez Masta [41] zanik przepływu cytoplazmy w niskich natężeniach światła został potwierdzony przez Jamesa [26], który wskazał na zmiany poziomu aktywności ruchowej ameb w cyklu dobowym.

Zaokrąglone, dobrze przytwierdzone do podłoża, nie wykazujące w czasie godzin nocnych żadnego ruchu komórki z młodych logarytmicznych hodowli, przy wzroście natężenia światła powyżej 2000 lux (temp. 24°C), odnawiają swoją aktywność przepływową i zmieniają kształt ciała. Przejście do form z wyraźnym przepływem cytoplazmy trwa około 10 min. Zmiany odwrotne (przy zmniejszaniu natężenia światła) zachodzą przy tym samym natężeniu progowym i trwają 20 - 30 min. Komórki ze starych kultur nie wykazują w nocy fazy bezruchu, aczkolwiek zmniejszenie aktywności jest wyraźnie widoczne. Taki sam efekt jest obserwowany przy zastosowaniu światła sztucznego (próg natężenia światła białego 2000 - 2600 lux). Przy dalszym wzroście natężenia światła zwiększa się prędkość przepływu cytoplazmy i lokomocji pierwotniaka oraz następuje orientacja ruchu.

#### WIDMA REAKCJI ŚWIETLNYCH

Praca Harringtona i Leaminga [21] była pierwszą próbą określenia przedziału widmowego światła indukującego reakcję fotofobową ameb. Autorzy stwierdzili, że światło o barwie fioletowej najefektywniej zmniejsza prędkość, bądź zatrzymuje przepływ cytoplazmy. Doświadczenia Masta [35, 36] potwierdziły te obserwacje wskazujące, że światło niebieskie (430 - 490 nm) wyraźnie wpływa na szybkość przepływu cytoplazmy, podczas gdy inne barwy mają wpływ nieznaczny.

Inman z współautorami [25] rozszerzyli badania nad widmem reakcji ameb na zakres środkowego nadfioletu (275 nm). U pierwotniaka wkraczającego w naświetlony region natychmiast zatrzymuje się przepływ cytoplazmy, a następnie po 1 - 2 sek. następuje odwrócenie kierunku jej przepływu i wycofanie się pseudopodiów. Hitchcock [24], potwierdzając wyraźny wpływ światła niebieskiego na reakcje ruchowe ameb, wysunął przypuszczenie o istnieniu dwóch spektralnie różnych układów absorbujących światło: jednego dla reakcji fotofobowej, drugiego dla reakcji fototaktycznej. U ameby jeden lub drugi układ jest włączany w zależności od natężenia padającego światła. Uzyskane obecnie wyniki (Łazowski — wyniki nie publikowane) zaprzeczają wnioskowi Hitchcocka [24]. U *A. proteus* istnieje zgodność przedziałów spektralnych światła aktywującego reakcję fototaktyczną i fotofobową (Łazowski — dane nie publikowane). Stwierdzone przeze mnie widmo światła aktywującego (ryc. 6) potwierdza obserwacje wcześniejsze, wskazując na możliwość udziału pochodnych flawinowych w procesie recepcji [52].



Ryc. 6. Zależność względnej czułości kwantowej —  $\eta_n$  reakcji fotofobowej od długości fali świetlnej —  $\lambda$ (nm).  $\eta_n = \eta_{436} \cdot \eta(\cdot)$ ,  $\eta(\cdot)$  — czułość kwantowa dla badanej długości fali,  $\eta_{436}$  — czułość kwantowa dla  $\lambda = 436$  nm (wyniki własne).

Saks i współautorzy [50] wykazali, że u niektórych osobników *A. proteus* można wywołać zolifikację cytoplazmy światłem czerwonym (694,3 nm) o natężeniu  $10^6 \div 19 \times 10^6$  W/m<sup>2</sup>. Jest to natężenie ponad  $10^6$  razy większe od natężeń światła 450 nm wywołującego 100% reakcji fotofobowej. Zachowanie się niektórych ameb w świetle czerwonym jest prawdopodobnie spowodowane efektem fotodynamicznym, który też zachodzi podczas naświetlania daleką czerwienią i bliską podczerwienią.

W podczerwieni i dalekiej czerwieni zanika u ameb możliwość formowania pseudopodiów związana z zolifikacją cytoplazmy. Ameby mają szerokie wachlarzowate pseudopodia, wypełnione dużymi obszarami cieczy hialinowej. Działanie światła czerwonego i podczerwieni wzmagają dodane do hodowli ameb barwniki niebieskie i zielone (np. chlorek błękitu metylowego) [3, 50], co przemawia za tezą o możliwości zachodzenia efektu fotodynamicznego przy bardzo wysokich natężeniach światła czerwonego —  $10^6$  W/m<sup>2</sup>.

#### WPLYW ŚRODOWISKA NA FOTOREAKCJĘ AMEB

Czas reakcji ameb na światło wydłuża się ze wzrostem kwasowości środowiska, a także w wyniku zmniejszania się stężenia KCl i MgCl<sub>2</sub> [42]. Zmiany stężenia NaCl nie wywierają żadnego wpływu. Badania te potwierdziły wcześniejszą sugestię Masta [37], że wzrost czasu reakcji fotofobowej zachodzi pod wpływem czynników zwiększających lepkość cytoplazmy, a skrócenie czasu reakcji wywołują czynniki zmniejszające lepkość. Hipotezę tę potwierdziły badania Heilbrunna i Daugherty [22], którzy stwierdzili, że NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> zmniejszają lepkość plazmażelu, podczas gdy CaCl<sub>2</sub> ją zwiększa; wskazali ponadto, że obecność Ca<sup>2+</sup> w środowisku jest niezbędna dla wywołania światłem zmian lepkości [3].

Dodanie do środowiska rózu bengalskiego, eozyiny [3] czy chlorku błękitu metylowego [50], nie powoduje zmian w cytoplazmie, w połączeniu jednak z bodźcem świetlnym zmniejsza jej lepkość i prowadzi do cytolyzy ameb (efekt fotodynamiczny).

#### WSPÓLNE PODŁOŻE REAKCJI FOTOFOBOWYCH I FOTOTAKTYCZNYCH

Z dotychczasowych badań wynika, że reakcje ruchowe *A. proteus* i innych wielkich drapieżnych ameb są różne w zależności od wielkości i szybkości zmian natężenia światła. Przy ciągłym, ale powolnym zwiększaniu natężenia światła występuje stopniowe zwiększanie prędkości lokomocji. Przy gwałtownym zwiększeniu następuje przejściowe zwolnienie lub nawet zatrzymanie przepływu cytoplazmy — immobilizacja całej komórki. Po okresie szoku lokomocja powraca i ameba osiąga szybkość zależną od utrzymującego się natężenia światła [44]. Światło ma również dodatni wpływ na poziom aktywności ruchowej ameb. Obserwowany w niskich natężeniach zanik przyprływu cytoplazmy [26, 41] był odnawiany po zwiększeniu natężenia światła powyżej wartości progowej, niezależnie od tego, czy zmiana natężenia następowała stopniowo, czy

gwałtownie. Progowe natężenie światła wzbudzające przepływ cytoplazmy w *A. proteus* [26] jest równe natężeniu progowemu efektu fototaktycznego [45]. Wyniki te, razem ze stwierdzoną zgodnością widm indukujących reakcje fotofobową i fototaktyczną, potwierdziły hipotezę Masta o wspólnym mechanizmie obu reakcji.

Efekt fototaktyczny obserwowany w wiązce horyzontalnej, ukośnej, a także przy zmianie natężenia światła w płaszczyźnie preparatu, wytworzonej za pomocą neutralnego filtru gradientowego, jest bezpośrednio związany z powstającymi w pierwotniaku przestrzennymi zmianami lepkości i struktury cytoplazmy, podobnie jak to ma miejsce przy lokalnej stymulacji aktywnych pseudopodiów czy innych części komórki. Zachodzące w cytoplazmie zmiany są ograniczone tylko do miejsc naświetleń i nie są przenoszone na inne obszary komórki. Wytworzony w ten sposób, zależny od zmiany natężenia światła, gradient własności elastycznych cytoplazmy [44] powoduje ruch pierwotniaka w kierunku mniejszego natężenia światła. Reakcja fotofobowa spowodowana analogicznymi zmianami lepkości i własności elastycznych cytoplazmy, jak to ma miejsce w przypadku reakcji fototaktycznych, jest pierwszym etapem adaptacji do gwałtownie zmienionych warunków świetlnych. Przy stopniowym i powolnym zwiększaniu natężenia nie obserwuje się reakcji fotofobowej, gdyż komórka przechodzi przez szereg kolejnych stanów quasi-równowagi dynamicznej cytoplazmy, regulowanych zmianami poziomu komórkowych nośników informacji, najprawdopodobniej stężeniami jonów wapnia i wodoru.

#### PRZYPUSZCZALNE MECHANIZMY MOLEKULARNE FOTOREAKCJI AMEB

Folger [12, 13] pierwszy zwrócił uwagę na zbieżność w przebiegu reakcji *A. proteus* wywołanych bodźcem świetlnym i drażnieniem mechanicznym. Co więcej, zaobserwował on, że następujące po sobie bodźce świetlne i mechaniczne lub na odwrót o sile zbyt małej, by wywołać oddzielnie dostrzegalną reakcję, mogą się sumować, indukując zatrzymanie przepływu cytoplazmy i lokomocji ameb. Mast [39] i Alsup [2] stwierdzili taką samą odpowiedź pierwotniaka przy drażnieniu prądem przemiennym jak pod wpływem światła. Ponadto Alsup [2] wykazał, że podprogowe bodźce świetlne i elektryczny mogą się sumować, podobnie jak świetlne i mechaniczne. Lokalna stymulacja podawanymi w sąsiedztwie ameby anestetykami [29, 30] i c-AMP [60] indukuje takie samo zachowanie się pierwotniaków i ich jądrowych i bezjądrowych fragmentów, jak stymulacja horyzontalną wiązką światła czy granicą światło—cień. Identyczne jak w horyzontalnej wiązce światła orientowanie się

pierwotniaka w stałym polu elektrycznym ku katodzie, wyjaśnione powstaniem gradientu pH i kationów w objętości i na powierzchni komórki [39] potwierdza istnienie, w przypadku reakcji fototaktycznej, indukowanego światłem gradientu koncentracji jonów w komórce. Hipoteza ta znalazła weryfikację w doświadczeniach nad zachowaniem się pierwotniaka w przemiennym polu elektrycznym [2, 39], jak i w doświadczeniach Nuccitellego [46], który stwierdził wpływ kationów (w tym zwłaszcza jonów wapnia i wodoru) z aktywnych pseudopodiów i ich wpływ w okolicach uroidu. Istnienie gradientu koncentracji jonów wapnia zostało wykazane przez Stockema i Kleina [55], którzy znaleźli, że w normalnie poruszającej się amebie (*A. proteus*) miejsca wiążące wapń są zlokalizowane głównie w uroidzie, natomiast w części frontalnej ich liczba jest wyraźnie zredukowana. Analogiczne wyniki otrzymali Taylor et al. [58], którzy zaobserwowali stałą luminescencję ekworyny w okolicach uroidu poruszającej się ameby i przejściową w aktywnych pseudopodiach.

Zatrzymanie przepływu i lokomocji oraz gwałtowny skurcz wywołany silnym bodźcem świetlnym może być konsekwencją wzrostu stężenia jonów wapniowych [59, 60] regulujących układ białek korteksu, jak i mechanizm aktomiozynowy odpowiedzialny za skurcz [8, 9]. Hipoteza ta znajduje potwierdzenie w doświadczeniach z wstrzykiwaniem  $0,7 \mu\text{M}$  roztworu jonów wapnia do anterioru lub uroidu komórki [54], który powoduje taki sam jak przy działaniu silnym bodźcem świetlnym, ograniczony do miejsca iniekcji, skurcz cytoplazmy.

Przedstawione dane świadczą, że o ile miejsca odbioru bodźców zewnętrznych i początkowe drogi transdukcji mogą być różne, to sam mechanizm reakcji jest wspólny i może być wyzwalany tym samym czynnikiem, np. wolnymi jonami wapnia i wodoru [1, 55 - 57, 59]. Oznaczałoby to, że bodziec świetlny indukuje za pomocą nie znalezionej do tej pory mechanizmu zmiany wewnątrzkomórkowych stężeń przekaźników informacji (second messenger), które z kolei regulują lokalne przejścia fazowe w cytoplazmie. Za przyjęciem takiej hipotezy przemawiają wyniki doświadczeń Heilbrunna i Daugherty [23] oraz Alsupa [3], którzy stwierdzili, że światło nadfioletowe i widzialne zwiększa lepkość cytoplazmy o około 30%, podczas gdy w obecności  $1/32 \text{ M}$  szczawianu amonu (tworzącego kompleksy z  $\text{Ca}^{2+}$ ) zmiany takie nie są obserwowane, a co więcej następuje spadek lepkości cytoplazmy.

Indukujące pinocytozę działanie środkowego zakresu widma nadfioletowego [28, 49], które jest także silnym induktorem reakcji fotofobowej [25], potwierdza włączenie w cykl transdukcji jonów wapnia, które są ważnym elementem pośredniczącym w reakcji pinocytozy [27, 48]. Wskazuje poza tym, że światło może zmieniać własności elektryczne bło-

ny cytoplazmatycznej, zmieniając tym samym jej przepuszczalność dla jonów [23]. Może też aktywować układy enzymatyczne błony komórkowej lub systemów błon wewnętrznych, które z kolei zmieniają koncentrację czynników pośredniczących [32, 34] w przekazywaniu informacji do struktur efektorowych [56].

Na recepcję fotonów na poziomie błonowych układów wewnątrzkomórkowych, np. mitochondriów, jak ma to miejsce w *Dictyostelium discoideum* [47] czy w *Physarum polycephalum* [31], wskazuje pośrednio brak fotoreakcji [20] w dużej wolno żyjącej amebie *Pelomyxa palustris* nie mającej mitochondriów i innych wewnątrzkomórkowych układów błonowych [4, 61], podczas gdy inne, mające tego typu organelle gatunki, *Chaos carolinensis* i *Amoeba dubia* [40], wykazują wyraźne reakcje świetlne opisywanego typu. Na wewnątrzkomórkowy poziom recepcji wskazuje występowanie reakcji fotofobowej u osobników przebywających w wodzie destylowanej [42] czy w roztworze TRIS-HCl o pH = 7,3 (Łazowski — wyniki nie publikowane). Nie wyklucza to jednak możliwości absorpcji fotonów w substrukturach błony komórkowej powodującej zmiany przepuszczalności błony dla jonów znajdujących się w otaczającej komórkę warstwie glikokaliksu.

#### PIŚMIENNICTWO

- [1] ALLEN R. D., TAYLOR, D. L., The molecular basis of Amoeboid movement, [w] *Molecules and Cell Movement*, red. S. Inoue, R. E. Stephens, Raven Press, New York, 239 - 258, 1975.
- [2] ALSUP, F. W., Relation between the responses of *A. proteus* to alternating electric current and sudden illumination, *Physiol., Zool.*, **12**: 85 - 96, 1939.
- [3] ALSUP, F. W., The effect of light alone and photodynamic action on the relative viscosity of *Amoeba protoplasm*, *Physiol. Zool.*, **15**: 168 - 183, 1942.
- [4] BOVEE, E. C., JAHN, T. L., Taxonomy and phylogeny, [w] *Biology of Amoeba*, red. K. W. Jeon, Acad. Press, New York, London, 1 - 628, 1973.
- [5] CLARK, A. M., The responses of enucleated amoeba to stimuli, *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **22**: 185 - 196, 1944.
- [6] CHALKEY, H. W., DANIEL, G. E., The relation between the form of the living cell and the nuclear phase of division in *A. proteus*, *Physiol. Zool.*, **6**: 592 - 619, 1933.
- [7] COHEN, A. I., The effect of enucleation on the DPN level of *Amoeba*, *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, **2**: 15 - 21, 1956.
- [8] CONDEELIS, J., Microfilament membrane interactions in cell shape and surface architecture, [w] *International Cell Biology 1980 - 1981*, red. H. G. Schweiger, Springer Verlag, 1981.
- [9] CONDEELIS, J. S., TAYLOR, D. L., The contractile basis of amoeboid movement. V. The control of solation, gelation and contraction in extracts from *D. discoideum*, *J. Cell Biol.*, **74**: 901 - 927, 1977.
- [10] DAVENPORT, C. B., Effect of chemical and physical agents upon protoplasm, [w] *Experimental Morphology 1*: London, 280, 1897.



- [11] ENGELMANN, Th. W., Ueber Reizung Contraktillen protoplasmas durch plötzliche beleuchtung, *Archiv Ges. Physiol. Mensch. Thiere*, **19**: 1 - 7, 1879.
- [12] FOLGER, H. T., A quantitative study of reactions to light in *Amoeba*, *J. Exp. Zool.*, **41**: 261 - 291, 1925.
- [13] FOLGER, H. T., The relation between the responses by *Amoeba* to mechanical shock and to sudden illumination, *Biol. Bull.*, **51**: 405 - 412, 1927.
- [14] FOLGER, H. T., The period of quiescence in the response to light by *Amoeba*, *Biol. Bull.*, **93**: 45 - 51, 1947.
- [15] GRĘBECKI, A., Behaviour of *Amoeba proteus* exposed to light—shade difference, *Protistologica*, **16**: 103 - 113, 1980.
- [16] GRĘBECKI, A., Effects of localized photic stimulation on amoeboid movement and their theoretical implications, *Europ. J. Cell Biol.*, **24**: 163 - 175, 1981.
- [17] GRĘBECKI, A., GRĘBECKA, L., Morphodynamical types of *Amoeba proteus*: a terminology proposal, *Protistologica*, **14**: 349 - 358, 1978.
- [18] GRĘBECKI, A., KALININA, L. V., GRĘBECKA, L., Response to light—shade difference in anucleate and polynucleate specimens of *Amoeba proteus*, *Cytobiologie*, **17**: 343 - 353, 1978.
- [19] GRĘBECKI, A., KŁOPOCKA, W., Functional interdependence of pseudopodia in *Amoeba proteus* stimulated by light—shade difference, *J. Cell Sci.*, **50**: 245 - 258, 1981.
- [20] GRIFFIN, J. L., The comparative physiology of movement in the giant multinucleate Amoebae, [w] *Primitive motile syst. in cell biology*, red. R. D. Allen, N. Kamiya, Acad. Press New York, London, 1964.
- [21] HARRINGTON, N. R., LEAMING, E., The reactions of *Amoeba* to light of different colors, *Amer. J. Physiol.*, **3**: 9 - 16, 1900.
- [22] HEILBRUNN, L. V., DAUGHERTY, K., The action of ultraviolet rays on amoeba protoplasm, *Protoplasma*, **18**: 596 - 619, 1933.
- [23] HEILBRUNN, L. V., MAZIA, D., The action of radiation on living protoplasm, [w] *Biological effects of radiation*, red. B. M. Dugger, New York, 624 - 750, 1936.
- [24] HITCHCOCK, L., Colour sensitivity of the amoeba revisited, *J. Protozool.*, **8**: 322 - 324, 1961.
- [25] INMAN, D. L., BOWIE, W. T., BARR, C. E., The reversal of physiological dominance in *Amoeba* by UV light, *J. Exp. Zool.*, **43**: 475 - 484, 1926.
- [26] JAMES, T. W., Synchronization of cell division in Amoebae, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **78**: 501 - 514, 1959.
- [27] JOSEFSSON, J. O., Induction and inhibition of pinocytosis in *Amoeba proteus*, *Acta Physiol. Scand.*, **73**: 481 - 490, 1968.
- [28] JOSEFSSON, J. O., HANSSON, S. E., Effect of ultraviolet radiation on pinocytosis in *Amoeba proteus*, *Acta Physiol. Scand.*, **96**: 456 - 470, 1976.
- [29] KOROHOVA, W., Positive chemotactic reactions of *Amoeba proteus* to general anaesthetics, *Acta Protozool.*, **11**: 333 - 336, 1972.
- [30] KOROHOVA, W., Experimental induction of locomotion in enucleated fragments of *Amoeba proteus* and its bearing on the theories of amoeboid movement, *Cytobiologie*, **14**: 338 - 349, 1977.
- [31] KOROHOVA, W., SHRAIDEH, Z., BARANOWSKI, Z., WOHLFARTH-BOTTERMANN, K. E., The blue light reaction in plasmodia of *Physarum polycephalum* is coupled to respiration, *Planta*, **158**: 54 - 62, 1983.
- [32] KRETSINGER, R. H., Evolution of the informational role of calcium in Eukaryotes, [w] *Calcium binding proteins and calcium function*, Elsevier North-Holland, New York, 63 - 72, 1977.

- [33] ŁAZOWSKI, K., KUŹNICKI, L., The microbeam system and its application to the study of the motile behaviour of *Amoeba proteus*, Post. Biol. Kom. 11: 397 - 401, 1983.
- [34] MARTONOSI, A. N., The regulation of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration in muscle and nonmuscle cells, [w] Muscle and nonmuscle motility, red. A. Stracher, Acad. Press, 1: 234 - 358, 1983.
- [35] MAST, S. O., Reaction in *Amoeba* to light, J. Exp. Zool., 9: 265 - 277, 1910.
- [36] MAST, S. O., Light and behaviour of organisms, J. Wiley and Sons, New York 410, 1911.
- [37] MAST, S. O., Factors involved in changes in form of *Amoeba*, J. Exp. Zool., 51: 97 - 120, 1928.
- [38] MAST, S. O., The nature of the response to light in *Amoeba proteus*, Z. Vergl. Physiol. 15: 139 - 147, 1931.
- [39] MAST, S. O., The nature of the action of electricity in producing response and injury in *Amoeba proteus* (Leidy) and the effect of electricity on the viscosity of protoplasm, Z. Vergl. Physiol., 15: 309 - 328, 1931.
- [40] MAST, S. O., Localized stimulation, transmission of impulses, and the nature of response in *Amoeba*, Physiol. Zool., 5: 1 - 15, 1932.
- [41] MAST, S. O., Motor responses to light in the invertebrate animals, [w] Biological effects of radiation, red. B. M. Dugger, New York, 573 - 623, 1936.
- [42] MAST, S. O., HULPIEU, H. R., Variation in the response to light in *A. proteus* with special reference to the effects of salts and hydrogen-ion concentrations, Protoplasma, 11: 412 - 431, 1930.
- [43] MAST, S. O., PUSCH, L., Modification of response in the amoeba, Biol. Bull., 46: 55 - 59, 1924.
- [44] MAST, S. O., STAHLER, N., The relation between luminous intensity, adaptation to light and rate of locomotion in *Amoeba proteus* (Leidy), Biol. Bull., 73: 126 - 133, 1937.
- [45] MÜLLER, T., Zur Phototaxis von *Amoeba proteus*, Exp. Cell Research, 39: 225 - 232, 1965.
- [46] NUCCITELLI, R., POO, M. M., JAFFE, L. F., Relations between ameboid movement and membrane-controlled electrical currents, J. General Physiol., 69: 743 - 763, 1977.
- [47] POFF, K. L., LOOMIS, W. F., BUTLER, W. L., Isolation and purification of the photoreceptor pigment associated with phototaxis in *D. discoideum*, J. Biol. Chem., 249: 2164 - 2167, 1974.
- [48] PRUSCH, R. D., Calcium and pinocytosis, [w] The Role of Calcium in Biological systems, red. L. J. Anghileri, CRS Press Inc. Boca Raton, Florida, 219 - 227, 1982.
- [49] RINALDI, R., The induction of pinocytosis in *Amoeba proteus* by ultraviolet radiation, Exp. Cell Res., 18: 70 - 75, 1959.
- [50] SAKS, N. M., ZUZOLO, R. C., KOPAC, M. J., Microsurgery of living cells by ruby laser irradiation, Ann. N. Y. Acad. Sci., 122: 695 - 704, 1965.
- [51] SCHAEFFER, A. A., On the behaviour of *Amoeba* toward fragments of glass and carbon and other indigestible substances and toward some very soluble substances, Biol. Bull., 31: 303 - 328, 1916.
- [52] SCHMIDT, W., Physiological bluelight reception, Structure and Bonding, 41: 1 - 44, 1980.
- [53] STOCKEM, W., KLEIN, H. P., Pinocytosis and locomotion of amoebae XV.

- Demonstration of  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites during induced pinocytosis in *Amoeba proteus*, *Protoplasma*, **100**: 33 - 44, 1979.
- [54] TAYLOR, D. L., Motile model systems of Amoeboid movement, [w] *Cell Motility*, red. R. Goldman, T. Pollard, J. Rosenbaum, Cold Spring Harbor Laborat., New York, 797 - 821, 1976.
- [55] TAYLOR, D. L., The contractile basis of amoeboid movement, IV. The viscoelasticity and contractility of amoeba cytoplasm in vivo, *Exp. Cell Res.*, **105**: 413 - 426, 1977.
- [56] TAYLOR, D. L., CONDEELIS J. S., Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells, *Internat. Rev. Cytol.*, **56**: 57 - 144, 1979.
- [57] TAYLOR, D. L., CONDEELIS, J. S., MOORE, P. L., ALLEN, R. D., I. The chemical control of motility in isolated cytoplasm, *J. Cell Biol.*, **59**: 378 - 394, 1973.
- [58] TAYLOR, D. L., BLINKS, J. R., REYNOLDS, G. T., Contractile basis of amoeboid movement. VIII. Aequorin luminescence during amoeboid movement, endocytosis and capping, *J. Cell Biol.*, **86**: 599 - 607, 1980.
- [59] TAYLOR, D. L., FECHHEIMER, M., Cytoplasmic structure and contractility: the solution—contraction coupling hypothesis, *Phil. Trans. R. Soc., London B* **299**: 185 - 197, 1982.
- [60] TAYLOR, D. L., HEIPLE, J., WANG, Y. L., LUNA, E. J., TANASUGARN, L., BRIER, J. SWANSON, J., FECHHEIMER, M., AMATO, P., ROCKWELL, M., DALEY G., Cellular and molecular aspects of amoeboid movement, [w] *Cold Spring Harbor Symp. Cold Spring Harb. Lab.* **46**: 101 - 111, 1982.
- [61] WHATLEY, J. M., Bacteria and nuclei in *Pelomyxa palustris*: Comments on the theory of serial endosymbiosis, *New Phytol.*, **76**: 111 - 120, 1976.

Otrzymano: 20 lutego 1985.

Przyjęto: grudzień 1986.

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



## ZASTOSOWANIE ANALIZY FOURIEROWSKIEJ DO BADANIA KSZTAŁTÓW OBRAZÓW KOMÓREK I INNYCH OBIEKTÓW BIOLOGICZNYCH

### APPLICATION OF THE FOURIER ANALYSIS OF SHAPE IN THE INVESTIGATIONS OF CELL IMAGES AND OTHER BIOLOGICAL OBJECTS

Paweł STROJNY<sup>1</sup>, Kazimierz OSTROWSKI<sup>1</sup>, Anna DZIEDZIC-GOCLAWSKA<sup>2</sup>

<sup>2</sup>Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Biostruktury, Akademia Medyczna w Warszawie

<sup>1</sup>Zakład Transplantologii, Instytut Biostruktury, Akademia Medyczna w Warszawie

*Streszczenie.* W artykule omówiono dwie metody analizy kształtu obiektów biologicznych i przykłady ich zastosowania w badaniach komórek o różnym stopniu transformacji nowotworowej.

Podstawą obu metod jest transformacja Fouriera funkcji opisującej kształt obiektu. W metodzie I funkcją tą jest długość promienia wodzącego w zależności od jego kąta nachylenia, w metodzie II — kąt nachylenia stycznej do konturu w zależności od długości łuku. W wyniku transformacji Fouriera takiej funkcji otrzymuje się szereg parametrów, które stanowią jednoznaczną i możliwą do interpretacji geometrycznej charakterystykę analizowanego kształtu.

*Summary.* The paper reviews two methods of shape analysis of biological objects and their applications in investigations of transformed cells.

The basis of the methods is the Fourier transformation of the function which describes the shape of the analysed object. In the first method such a function is created by the counter-clockwise rotating radius vector. In the second method such a function is created by the angle between the tangent to the contour and the reference direction. The result of the Fourier transformation of this function is the series of parameters which characterize the shape unambiguously and make the geometrical interpretation possible.

W badaniach biomedycznych zarówno podstawowych, jak i rutynowych zachodzi często potrzeba opisu kształtu różnych obiektów reprezentowanych przez ich dwuwymiarowe rzuty. Kształt obiektów biologicznych (komórek, narządów, całych organizmów) wynika z pełnionych przez nie funkcji oraz z wpływu środowiska. Analiza kształtu takich obiektów dostarcza więc cennych informacji o przebiegu pewnych procesów biochemicznych lub fizycznych oraz pozwala na odróżnianie pewnych klas obiektów od innych.

Stosowany dość powszechnie w naukach biomedycznych jakościowy opis kształtu jest subiektywny i nieprecyzyjny, co utrudnia bądź uniemożliwia stosowanie metod automatycznych komputerowych. Opis ilościowy pozwala na zastosowanie kompu-

terów do zbierania, przechowywania i przetwarzania danych. Ma to znaczenie w badaniach podstawowych, ale przede wszystkim w badaniach rutynowych, w których zachodzi potrzeba badań dużych populacji (np. wczesna diagnostyka nowotworowa). Ilościowa analiza kształtu może być cennym narzędziem zarówno w badaniach, w których różnice są łatwo widoczne, jak i tych, w których różnice są bardzo subtelne. Istnieje wiele metod morfometrycznych pozwalających na ilościową charakterystykę geometrycznych cech badanych obiektów. Parametry uzyskane tymi metodami są często łatwe do obliczenia nawet bez użycia komputera, jednakże pewnego typu zmiany kształtu analizowanych obiektów mogą nie zmienić wartości tych parametrów a tym samym nie zostaną wykryte.

Fourierowska analiza kształtu [1, 5] wymaga dość złożonych obliczeń, co pociąga za sobą konieczność zastosowania komputera. Jednakże obecnie, gdy komputery, a zwłaszcza mikrokomputery stają się coraz tańsze, nie stanowi to dużego ograniczenia. W zamian za to analiza fourierowska pozwala na opis kształtu dwuwymiarowego obiektu (figury) przy użyciu serii parametrów z dowolną dokładnością, tym większą, im większa jest długość serii, a ponadto parametry te nie zależą ani od orientacji figury, ani od jej rozmiarów. Przydatną, choć nie najważniejszą ich cechą jest prosta interpretacja geometryczna.

#### 1. TRANSFORMACJA FOURIERA JAKO MATEMATYCZNA PODSTAWA FOURIEROWSKIEJ ANALIZY KSZTAŁTU

Według jednego z twierdzeń Fouriera [4] każdą ciągłą funkcję okresową  $F(x)$  o okresie  $T$  można przedstawić w postaci szeregu złożonego z funkcji harmonicznich o odpowiednich amplitudach i malejących okresach według ciągu:  $T, T/2, T/3, \dots$  W ogólnej postaci funkcję  $F(x)$  można przedstawić następująco:

$$F(x) = A_0 + \sum_{n=1}^{\infty} A_n \cos \frac{2\pi nx}{T} + \sum_{n=1}^{\infty} B_n \sin \frac{2\pi nx}{T}, \quad (1.1)$$

lub korzystając z własności funkcji harmonicznich w nieco inny sposób:

$$F(x) = A_0 + \sum_{n=1}^{\infty} C_n \cos \left( \frac{2\pi nx}{T} - \varphi_n \right). \quad (1.2)$$

Związek pomiędzy postacią (1.1) a (1.2) jest następujący:

$$C_n = \sqrt{A_n^2 + B_n^2}, \quad (1.3)$$

$$\varphi_n = \arctg \frac{B_n}{A_n}, \quad (1.4)$$

gdzie  $n = 1, 2, 3, \dots$  nazywamy rzędem (numerem) harmonicznej,  $C_n$  — amplitudą harmoniczną, a  $\varphi_n$  — harmonicznym kątem fazowym. Wartości amplitud  $A_n$  i  $B_n$  można obliczyć, korzystając ze wzorów na transformację Fouriera funkcji  $F(x)$ . Ogólna postać transformacji Fouriera jest następująca:

$$f(u) = \int_{-\infty}^{\infty} F(x) e^{2\pi i u x} dx, \quad (1.5)$$

gdzie  $u = 1/T$  nazywamy częstością funkcji  $F(x)$ ,  $i = \sqrt{-1}$ , a  $f(u)$  jest transformatą Fouriera funkcji  $F(x)$  o wartościach w przestrzeni liczb zespolonych. Amplitudy  $A_n$  i  $B_n$  są wartościami części rzeczywistej i urojonej funkcji  $f(u)$  dla  $u = n/T$ . Odpowiednie wzory mają więc następującą postać:

$$A_0 = \frac{1}{T} \int_0^T F(x) dx, \quad (1.6)$$

$$A_n = \frac{2}{T} \int_0^T F(x) \cos \frac{2\pi n x}{T} dx, \quad (1.7)$$

$$B_n = \frac{2}{T} \int_0^T F(x) \sin \frac{2\pi n x}{T} dx. \quad (1.8)$$

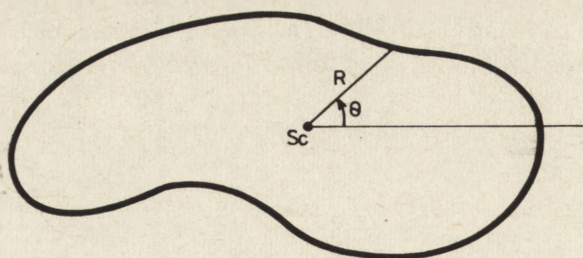
Biorąc skończoną liczbę ( $N$ ) wyrazów szeregu Fouriera (1.1), możemy zrekonstruować funkcję  $F(x)$  z dowolną dokładnością, tym większą, im większa jest wartość  $N$ .

W następnych rozdziałach omówimy dwie metody analizy kształtu w dwóch wymiarach, których podstawą jest transformacja Fouriera. W obu metodach transformacji Fouriera poddawać będziemy funkcje charakteryzujące jednoznacznie kształt analizowanego obiektu. Różnice między metodami polegają głównie na sposobie wyboru tych funkcji.

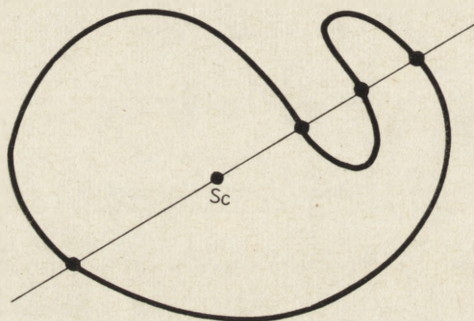
## 2. FOURIEROWSKA ANALIZA KSZTAŁTU. METODA I

Kształt dwuwymiarowego obiektu (figury) możemy opisać przy użyciu funkcji  $R(\theta)$  wyrażającej długość promienia wodzącego wystawionego z geometrycznego środka ciężkości figury w zależności od kąta  $\theta$  mierzonego względem dowolnie wybranego kierunku odniesienia (ryc. 2.1), [1].

Tak zdefiniowana funkcja jest funkcją różnowartościową tylko wtedy, gdy każda prosta przechodząca przez środek ciężkości figury przecina jej brzeg dokładnie dwa razy (ryc. 2.2). W przeciwnym wypadku  $R(\theta)$  nie można poddać transformacji Fouriera i metoda I nie daje się zastosować.



Ryc. 2.1. Sposób tworzenia funkcji  $R(\theta)$  opisującej kształt figury.  $Sc$  — środek ciężkości figury



Ryc. 2.2. Przykład figury, dla której  $R(\theta)$  nie jest funkcją różnowartościową

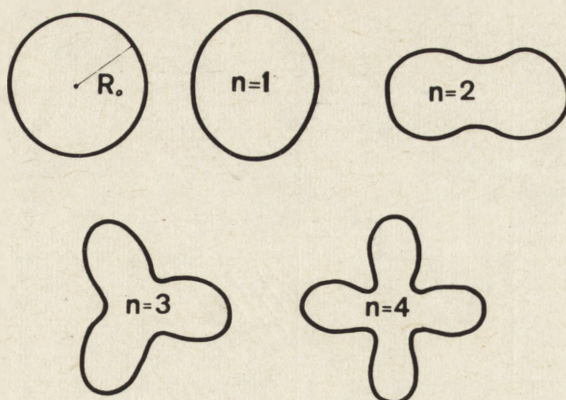
To niewątpliwe ograniczenie stosowalności metody I często nie ma znaczenia, gdyż w wielu biomedycznych zastosowaniach obiekty tego typu co na ryc. 2.2 nie występują. Często też niejednoznaczności funkcji  $R(\theta)$  są na tyle drobne, że pominięcie ich („wyprostowanie” figury) prawie nie wpływa na dokładność analizy. Gdy funkcja  $R(\theta)$  spełnia założenia twierdzenia Fouriera, wówczas korzystając z postaci (1.2) oraz z faktu, że okres funkcji  $T = 2\pi$ , szereg Fouriera można przedstawić w postaci:

$$R(\theta) = R_0 + \sum_{n=1}^{\infty} R_n \cos(n\theta - \varphi_n). \quad (2.1)$$

Pierwszy wyraz tego szeregu ( $R_0$ ) jest promieniem koła, którego pole jest równe polu analizowanej figury. Z charakteru funkcji  $R(\theta)$  wynika, że  $n$ -ta harmoniczna reprezentuje regularną figurę o  $n$  wybrzuszeniach (ryc. 2.3).  $R_n$  wyraża względny udział  $n$ -tej harmonicznej w tworzeniu całej figury, a  $\varphi_n$  — jej ułożenie kierunkowe względem kierunku odniesienia.

Pierwszym etapem metody I jest zarejestrowanie współrzędnych kartezjańskich punktów brzegowych figury. Punktów powinno być jak najwięcej, gdyż od tego zależy dokładność opisu. Ich minimalna liczba powinna być co najmniej dwa razy większa od liczby harmonicznych, przy użyciu których chcemy opisać kształt figury.





Ryc. 2.3. Geometryczna ilustracja kilku kolejnych harmonicznych nałożonych na okrąg o promieniu  $R_0$

Warunek ten wynika z twierdzenia Nyquista o częstości próbkowania funkcji. Układ współrzędnych oraz punkt początkowy wybieramy dowolnie. Punkty rejestrujemy kolejno, w kierunku przeciwnym do ruchu wskazówek zegara. Współrzędne można rejestrować ręcznie, stosując odpowiednią siatkę, półautomatycznie korzystając z różnego typu digitizerów oraz automatycznie — urządzeniami złożonymi z kamery telewizyjnej i odpowiedniego systemu do analizy obrazów.

W najkrótszym zarysie metoda I sprowadza się następnie do obliczenia współrzędnych geometrycznego środka ciężkości figury, zamiany współrzędnych kartezjańskich punktów brzegowych  $(x, y)$  na biegunowe  $(R, \theta)$  i obliczenia współczynników Fouriera według wzorów (1.6-1.8) oraz (1.3) i (1.4) dla harmonicznych  $n = 1, 2, \dots, M$ .  $M$  ustalamy w zależności od pożądanej dokładności analizy, pamiętając o twierdzeniu Nyquista ( $M < N/2$ , gdzie  $N$  — liczba zarejestrowanych punktów brzegowych).

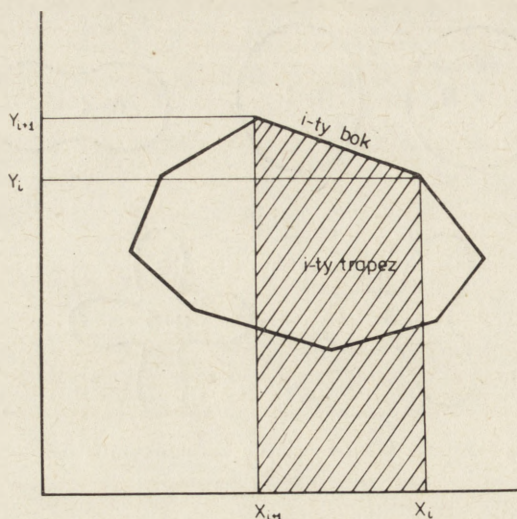
Analizowaną figurę możemy przybliżyć przez wielokąt o  $N$  wierzchołkach ponumerowanych kolejno w kierunku przeciwnym do ruchu wskazówek zegara i mających współrzędne  $(x_i, y_i)$ ,  $i = 1, 2, \dots, N$  (ryc. 2.4).

Równanie prostej zawierającej  $i$ -ty bok wielokąta (łączy  $i$ -ty wierzchołek z  $i+1$ -szym) ma następującą postać:

$$y_i(x) = \frac{y_{i+1} - y_i}{x_{i+1} - x_i} x + \frac{y_i x_{i+1} - y_{i+1} x_i}{x_{i+1} - x_i}. \quad (2.2)$$

Można wykazać, że współrzędne środka ciężkości  $(x_0, y_0)$  dają się obliczyć z następujących wzorów:

$$x_0 = \frac{-\sum_{i=1}^N M_{x_i}}{\sum_{i=1}^N A_i}, \quad y_0 = \frac{\sum_{i=1}^N M_{y_i}}{\sum_{i=1}^N A_i}, \quad (2.3)$$



Ryc. 2.4. Wielokąt będący przybliżeniem analizowanej figury w kartezjańskim układzie współrzędnych. Wierzchołki są ponumerowane w kierunku przeciwnym do ruchu wskazówek zegara

gdzie  $M_{x_i}$  oraz  $M_{y_i}$  są momentami pierwszego rzędu dla  $i$ -tego trapezu odpowiednio względem osi  $y$  oraz  $x$ ,  $i$ -ty trapez jest zawarty pomiędzy  $i$ -tym bokiem a jego rzutem na oś  $x$ ,  $A_i$  jest polem  $i$ -tego trapezu.

$M_{x_i}$ ,  $M_{y_i}$  oraz  $A_i$  można obliczyć, korzystając z odpowiednich wzorów całkowych:

$$M_{x_i} = - \int_{y_i}^{y_{i+1}} \int_0^{x_i(y)} x dx dy = \frac{(x_{i+1}^2 + x_{i+1}x_i + x_i^2)(y_i - y_{i+1})}{6}, \quad (2.4)$$

$$M_{y_i} = - \int_{x_i}^{x_{i+1}} \int_0^{y_i(x)} y dy dx = \frac{(y_{i+1}^2 + y_{i+1}y_i + y_i^2)(x_i - x_{i+1})}{6}, \quad (2.5)$$

$$A_i = - \int_{x_i}^{x_{i+1}} \int_0^{y_i(x)} dy dx = \frac{(y_{i+1} + y_i)(x_i - x_{i+1})}{2}. \quad (2.6)$$

Mając współrzędne środka ciężkości figury, możemy zamienić współrzędne kartezjańskie punktów brzegowych (wierzchołków) figury na współrzędne biegunowe:

$$R_i = \sqrt{(y_i - y_0)^2 + (x_i - x_0)^2}, \quad (2.7)$$

$$\theta_i = \arctg \frac{y_i - y_0}{x_i - x_0}. \quad (2.8)$$

Współczynniki fourierowskie dla funkcji  $R(\theta)$  możemy obliczyć, podstawiając we wzorach (1.6), (1.7), (1.8)  $T = 2\pi$ ,  $F = R$ ,  $x = 0$  oraz przechodząc od funkcji ciągłej  $R(\theta)$  do dyskretnej  $R_i(\theta_i)$ :

$$R_0 = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} R(\theta) d\theta = \frac{1}{2\pi} \sum_{i=1}^N \int_{\theta_i}^{\theta_{i+1}} R_i(\theta) d\theta, \quad (2.9)$$

$$A_n = \frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} R(\theta) \cos n\theta d\theta = \frac{1}{\pi} \sum_{i=1}^N \int_{\theta_i}^{\theta_{i+1}} R_i(\theta) \cos n\theta d\theta, \quad (2.10)$$

$$B_n = \frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} R(\theta) \sin n\theta d\theta = \frac{1}{\pi} \sum_{i=1}^N \int_{\theta_i}^{\theta_{i+1}} R_i(\theta) \sin n\theta d\theta. \quad (2.11)$$

Zakładając, że dla małych różnic  $\theta_{i+1} - \theta_i$  promień  $R$  jest liniową funkcją kąta  $\theta$  w przedziale  $\theta_i, \theta_{i+1}$ , możemy analogicznie do równania prostej danej wzorem (2.2) napisać, że:

$$R_i(\theta) = \frac{R_{i+1} - R_i}{\theta_{i+1} - \theta_i} \theta + \frac{R_i \theta_{i+1} - R_{i+1} \theta_i}{\theta_{i+1} - \theta_i}. \quad (2.12)$$

Po podstawieniu  $R_i(\theta)$  do wzorów (2.9), (2.10), (2.11) i scałkowaniu otrzymujemy ostateczne wzory na współczynniki fourierowskie:

$$R_0 = \frac{1}{4\pi} \sum_{i=1}^N (R_{i+1} + R_i)(\theta_{i+1} - \theta_i), \quad (2.13)$$

$$A_n = \frac{1}{\pi} \sum_{i=1}^N \frac{(R_{i+1} - R_i)(\cos n\theta_{i+1} - \cos n\theta_i)}{(\theta_{i+1} - \theta_i)n^2} + \frac{R_{i+1} \sin n\theta_{i+1} - R_i \sin n\theta_i}{n}, \quad (2.14)$$

$$B_n = \frac{1}{\pi} \sum_{i=1}^N \frac{(R_{i+1} - R_i)(\sin n\theta_{i+1} - \sin n\theta_i)}{(\theta_{i+1} - \theta_i)n^2} - \frac{R_{i+1} \cos n\theta_{i+1} - R_i \cos n\theta_i}{n}. \quad (2.15)$$

Współczynniki  $A_n$  i  $B_n$  niosą informację o kształcie figury łącznie z informacją o jej ułożeniu kierunkowym. Rozdzielenie tych informacji jest możliwe po zamianie współczynników  $A_n$  i  $B_n$  na  $R_n$  i  $\theta_n$  i zastosowaniu szeregu Fouriera w postaci danej wzorem (2.1). Dla każdej harmonicznej obliczamy więc tak jak we wzorach (1.3), (1.4):

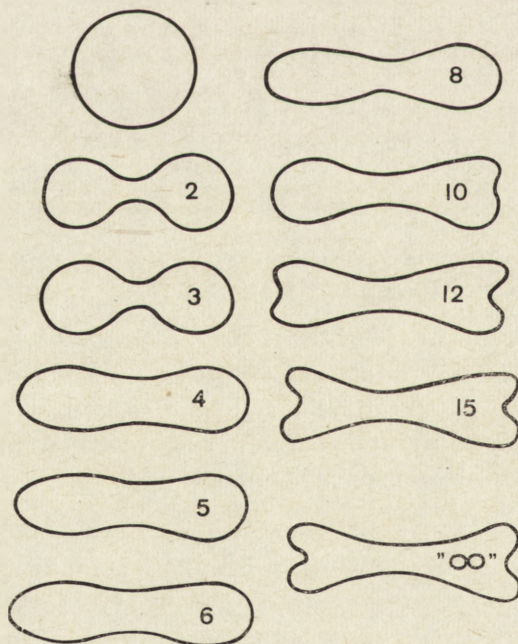
$$R_n = \sqrt{A_n^2 + B_n^2}, \quad (2.16)$$

$$\varphi_n = \arctg \frac{B_n}{A_n}. \quad (2.17)$$

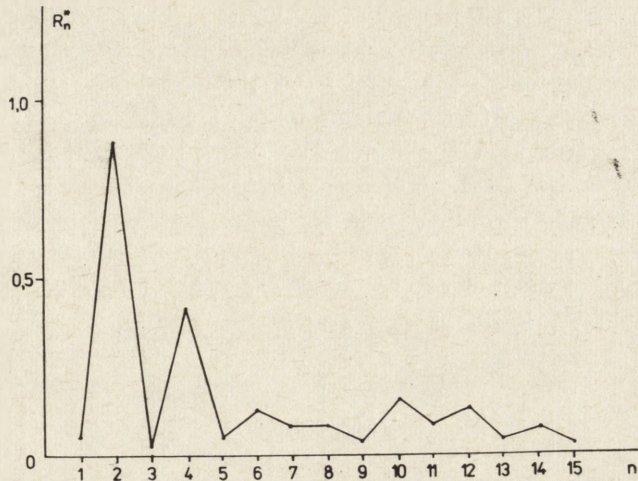
Ponadto w celu uniezależnienia się w analizie kształtu od wielkości figury wszystkie obliczone amplitudy harmoniczne  $R_n$  możemy znormalizować względem wyrazu  $R_0$ , tzn. obliczyć:

$$R_n^* = \frac{R_n}{R_0}. \quad (2.18)$$

Można wykazać, że dla funkcji  $R(\theta)$  amplitudy  $R_n$  są dla każdego  $n$  mniejsze od  $R_0$ , tak więc  $R_n^*$  należą do przedziału  $[0, 1]$ . Seria współczynników fourierowskich  $R_n$  i  $\theta_n$  jednoznacznie określa kształt analizowanej figury. Przy ich użyciu możemy dowolnie dokładnie zrekonstruować figurę, tym dokładniej, im dłuższa jest seria. Z uwagi na ortogonalność funkcji harmonicznych współczynniki fourierowskie nie są skorelowane — określonej wielkości (w stosunku do całej figury) pofałdowaniom brzegu figury odpowiadają ściśle określone harmoniczne. Tak więc opisując pewne obiekty w celu ich późniejszego porównywania czy klasyfikacji, można się ograniczyć tylko do tych harmonicznych, w których różnice są najwyraźniejsze. Ryc. 2.5a ilustruje rekonstrukcję wyjściowej figury oznaczonej symbolem „∞” z użyciem coraz to większej liczby harmonicznych. Ryc. 2.5b przedstawia widmo pierwszych piętnastu znormalizowanych amplitud  $R_n^*$ . Łatwo widoczne na pierwszy rzut oka największe zmiany kształtu po dołączeniu harmonicznych 2, 4, 10 znajdują swoje odbicie w lokalnych maksimach widma dla odpowiednich  $n$ .



Ryc. 2.5a. Rekonstrukcja przykładowej figury (oznaczonej „∞”)

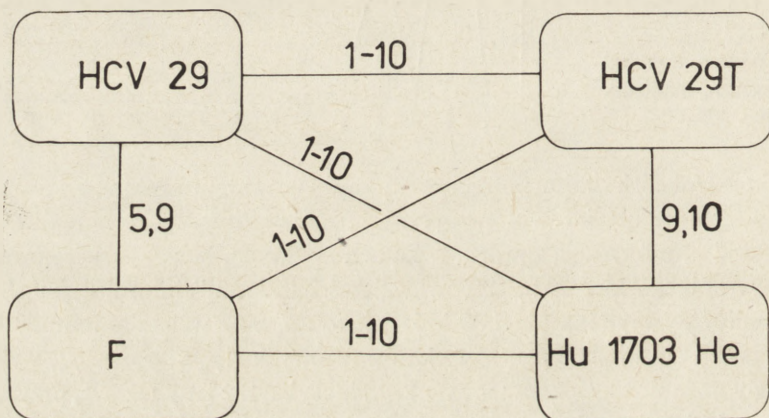


Ryc. 2.5b. Widmo amplitud harmonicznych  $R_n^*$  dla figury z ryc. 2.5a

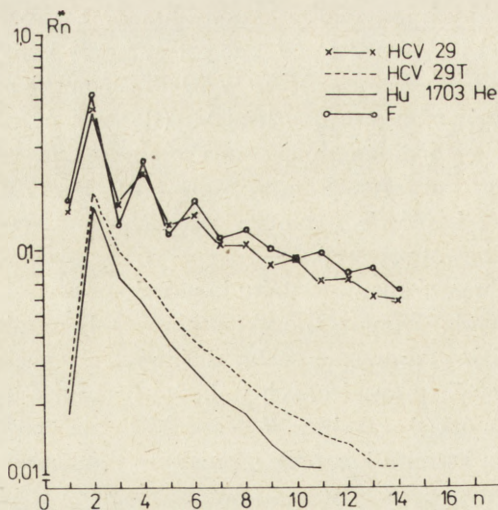
Do rekonstrukcji kształtu potrzebne są zarówno amplitudy, jak i kąty fazowe. Jednakże w analizie obiektów biomedycznych, które zazwyczaj cechuje duża różnorodność kształtu, informacja zawarta w kątach fazowych, nawet po ich normalizacji względem wspólnego kierunku, stanowi najczęściej „szum” informacyjny. Stosując metody analizy dyskryminacyjnej, w której jako zmienne wzięto amplitudy harmoniczne  $R_n^*$  oraz odpowiednie przyrosty kątów fazowych  $\Delta\varphi_n = \varphi_{n+1} - \varphi_n$ , wykazano, że amplitudy mają dużo większą moc dyskryminacyjną niż kąty fazowe, przynajmniej dla pierwszych dziesięciu harmonicznych. Istnieje sposób zwiększenia mocy dyskryminacyjnej kątów fazowych przez powiązanie ich z odpowiadającymi im amplitudami. Przedstawimy go w rozdziale trzecim. Przykładem zastosowania metody I<sup>a</sup> w badaniach biomedycznych jest analiza kształtu komórek o różnym stopniu transformacji nowotworowej [3]. Analizie poddano cztery grupy komórek: F — ludzkie fibroblasty (komórki niezróżnicowane); HCV 29 — komórki nabłonka przejściowego śluzówki pęcherza moczowego człowieka (II stopień transformacji nowotworowej); HCV 29T — spontanicznie stransformowane in vitro komórki tego nabłonka (III stopień transformacji nowotworowej); Hu 1703 He — komórki raka wywodzące się z komórek nabłonka pęcherza moczowego człowieka (III stopień transformacji nowotworowej).

Celem tej pracy było porównanie kształtu komórek należących do wymienionych wyżej linii komórkowych. Stopnie transformacji zostały ustalone wg kryteriów biologicznych, takich jak wytwarzanie guzów złośliwych czy naciekanie normalnych tkanek w doświadczeniach prowadzonych w hodowli tkanek. Fibroblasty ludzkie zostały użyte jako komórki kontrolne. W tym tekście nie będziemy rozważać zależności między zmianą kształtu komórek a procesem transformacji nowotworowej. Zmiany te są najprawdopodobniej spowodowane zmianami w błonie komórkowej, co z kolei powoduje zmianę w stopniu przylegania komórek do podłoża, a w efekcie zmianę ich kształtu. Sprawy te dyskutowane są w piśmiennictwie specjalistycznym [3].

Kontury 100 komórek z każdej grupy obrysowano spod mikroskopu świetlnego przy użyciu camera lucida, następnie współrzędne punktów brzegowych komórek wprowadzono do pamięci minikomputera PDP-11/34A przy użyciu pióra ultradźwiękowego (o rozdzielczości 1 mm). Korzystając z programu napisanego w języku FORTRAN, obliczono po dziesięć amplitud harmonicznych dla każdej komórki. Dla każdej grupy i dla każdej harmonicznej utworzono histogramy, które porównano parami testem chi-kwadrat na poziomie istotności 5% [2]. Ryc. 2.6 przedstawia różnice pomiędzy badanymi grupami z zaznaczonymi numerami harmonicznych, w których stwierdzono różnice. Ryc. 2.7 przedstawia widma średnich amplitud  $R_n^*$  dla każdej grupy



Ryc. 2.6. Ilustracja różnic między grupami komórek. Podane liczby są numerami harmonicznych, dla których stwierdzono różnice testem chi-kwadrat na poziomie istotności 5%.

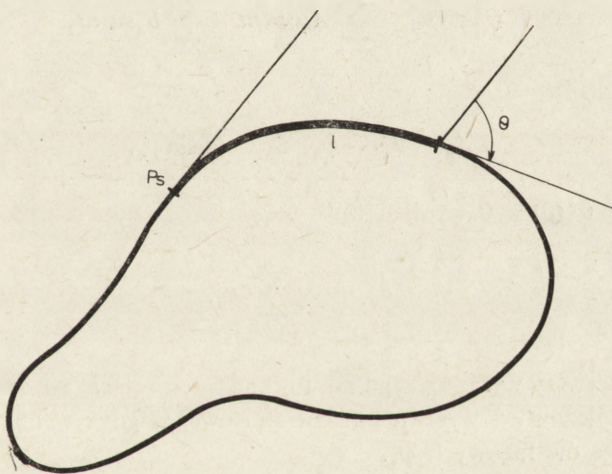


Ryc. 2.7. Widma średnich, znormalizowanych amplitud harmonicznych  $R_n^*$  dla czterech grup komórek

Uzyskane wyniki są ilustracją precyzji metody i prostej interpretacji geometrycznej parametrów charakteryzujących kształt analizowanych obiektów.

### 3. FOURIEROWSKA ANALIZA KSZTAŁTU. METODA II

Kształt dwuwymiarowego obiektu (figury) możemy opisać przy użyciu funkcji  $\theta(l)$  wyrażającej kąt pomiędzy styczną do krzywej ograniczającej figurę a styczną w punkcie startowym w zależności od długości łuku krzywej mierzonej od punktu startowego (ryc. 3.1). Przyjmijmy, że argument funkcji  $\theta(l)$  wzrasta w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara. Jeżeli przez  $L$  oznaczymy całkowitą długość krzywej, to  $\theta(0) = 0$ ,  $\theta(L) = -2\pi$ . Znak „-” wynika z konwencji, zgodnie z którą kąty dodatnie mierzone są w kierunku przeciwnym do ruchu wskazówek zegara.



Ryc. 3.1. Sposób tworzenia funkcji  $\theta(l)$  opisującej kształt figury.  $P_s$  – dowolnie wybrany punkt startowy

Tak zdefiniowanej funkcji nie można jednak poddać transformacji Fouriera, gdyż wartości funkcji na początku i na końcu przedziału  $[\theta, L]$  nie są sobie równe. W tym celu, a także w celu uniezależnienia analizy kształtu od wartości  $L$  związanej z rozmiarami figury, wprowadza się nową funkcję  $\theta^*(t)$ , która powstaje z funkcji  $\theta(l)$  w następujący sposób:

$$\theta^*(t) = \theta\left(\frac{Lt}{2\pi}\right) + t, \quad (3.1)$$

gdzie

$$t = \frac{2\pi l}{T}. \quad (3.2)$$

Łatwo zauważyć, że okresem nowej funkcji jest  $2\pi$  oraz że  $\theta^*(0) = \theta^*(2\pi) = 0$ . Widać również, że dla dowolnego koła funkcja  $\theta^*(t)$  jest tożsamościowo równa zeru, a więc dla innych figur jej wartości można interpretować jako odstępstwa od kształtu koła. Funkcja  $\theta^*(t)$  jest, w przeciwieństwie do funkcji  $E(\theta)$  z metody I, różnowartościowa dla dowolnie skomplikowanych kształtów. Przy jej użyciu można stosować analizę fourierowską do dowolnej krzywej zamkniętej, nawet takiej, która wielokrotnie przecina się ze sobą. Podobnie jak w metodzie I (patrz wzór (2.1)) funkcję  $\theta^*(t)$  można rozwinąć w szereg Fouriera, co można zapisać w postaci:

$$\theta^*(t) = \theta_0^* + \sum_{n=1}^{\infty} \theta_n^* \cos(nt - \varphi_n), \quad (3.3)$$

lub w postaci równoważnej:

$$\theta^*(t) = \theta_0^* + \sum_{n=1}^{\infty} A_n \cos nt + \sum_{n=1}^{\infty} B_n \sin nt, \quad (3.4)$$

gdzie

$$A_n = \theta_n^* \cos \varphi_n, \quad B_n = \theta_n^* \sin \varphi_n. \quad (3.5)$$

Z faktu, że  $\theta^*(0) = 0$  wynika, iż:

$$\theta_0^* = - \sum_{n=1}^{\infty} A_n. \quad (3.6)$$

Tak więc pierwszy wyraz szeregu ma tu inną interpretację niż w metodzie pierwszej, jest też zależny od wyboru punktu startowego, gdyż według (3.5) wartości  $A_n$  zależą od kątów fazowych  $\varphi_n$ .

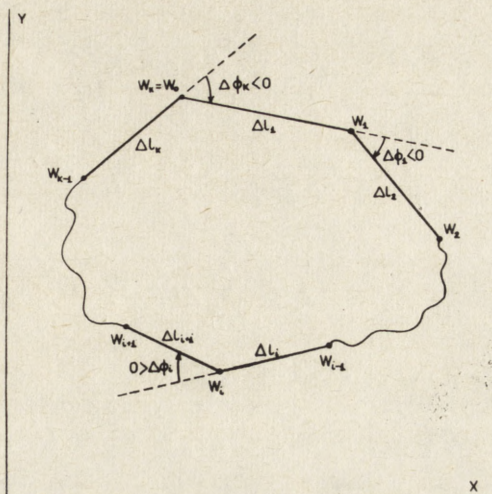
Pierwszym etapem w metodzie II jest zarejestrowanie współrzędnych punktów brzegowych figury, następnie obliczenie długości  $\Delta l_i$  wszystkich boków wielokąta przybliżającego analizowaną figurę oraz kątów  $\Delta \theta_i$  między sąsiednimi bokami w sposób przedstawiony na ryc. 3.2. Jeżeli przez  $K$  oznaczmy liczbę zarejestrowanych punktów będących równocześnie wierzchołkami wielokąta, wówczas:

$$L = \sum_{i=1}^K \Delta l_i. \quad (3.7)$$

Można zauważyć, że dla długości łuku krzywej  $l$  przybliżonego długością łamanej i należącego do przedziału:

$$\left[ \sum_{i=1}^m \Delta l_i, \sum_{i=1}^{m+1} \Delta l_i \right] \quad (3.8)$$





Ryc. 3.2. Wielokąt przybliżający analizowaną figurę z oznaczeniami przyjętymi w tekście:  $W_i$  — wierzchołki wielokąta,  $\Delta l_i$  — długości jego boków,  $\Delta\theta_i$  — kąty między sąsiednimi bokami

wartość funkcji  $\theta(l)$  wyraża się wzorem:

$$\theta(l) = \sum_{i=1}^m \Delta\theta_i, \tag{3.9}$$

gdzie  $m \in [1, K]$ . Ponadto  $\theta(l) = 0$  dla  $l \in [0, \Delta l_1]$ .

Korzystając ze wzorów (1.6), (1.7), (1.8) dla funkcji  $\theta^*(t)$  o okresie  $T = 2\pi$  oraz ze wzoru (3.1) otrzymujemy po zamianie zmiennych całkowania  $X = \frac{Lt}{2\pi}$  wzory na współczynniki fourierowskie dla rozwinięcia (3.4):

$$\mu_0 = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \theta^*(t) dt = \frac{1}{L} \int_0^L \theta(x) dx + \pi, \tag{3.10}$$

$$A_n = \frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} \theta^*(t) \cos nt dt = \frac{2}{L} \int_0^L \left( \theta(x) + \frac{2\pi x}{L} \right) \cos \frac{2\pi nx}{L} dx, \tag{3.11}$$

$$B_n = \frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} \theta^*(t) \sin nt dt = \frac{2}{L} \int_0^L \left( \theta(x) + \frac{2\pi x}{L} \right) \sin \frac{2\pi nx}{L} dx, \tag{3.12}$$

gdzie  $\mu_0$  odpowiada wyrazowi  $\theta_0^*$  we wzorze (3.3) i (3.4). Ponieważ funkcja  $\theta(l)$  jest funkcją dyskretną, powyższe wzory można po scałkowaniu przedstawić w postaci:

$$\mu_0 = -\pi - \frac{1}{L} \sum_{m=1}^K l_m \Delta\theta_m, \tag{3.13}$$

$$A_n = -\frac{1}{n\pi} \sum_{m=1}^K \Delta\theta_m \sin \frac{2\pi n l_m}{L}, \quad (3.14)$$

$$B_n = \frac{1}{n\pi} \sum_{m=1}^K \Delta\theta_m \cos \frac{2\pi n l_m}{L}, \quad (3.15)$$

gdzie

$$l_m = \sum_{i=1}^m \Delta l_i. \quad (3.16)$$

Współczynniki  $A_n$  i  $B_n$  zawierają informacje nie tylko o kształcie figury, lecz również o punkcie startowym. Lepiej więc skorzystać z szeregu Fouriera zapisanego w postaci (3.3), obliczając w tym celu  $\theta_n^*$  i  $\varphi_n$  ze wzoru (3.5):

$$\theta_n^* = \sqrt{A_n^2 + B_n^2}, \quad (3.17)$$

$$\varphi_n = \arctg \frac{B_n}{A_n}. \quad (3.18)$$

Geometryczna interpretacja amplitud harmonicznyc  $\theta_n^*$  i kątów fazowych  $\varphi_n$  jest podobna jak w metodzie I z tym, że dotyczy to tylko figur, do których metoda I daje się zastosować. W przypadku figur, dla których funkcja  $R(\theta)$  nie jest różnowartościowa, amplitudy harmoniczne  $\theta_n^*$  obliczone metodą II mogą przekraczać wartość 1,0 i wówczas ich interpretacja jako wkład odpowiedniej harmonicznyc w tworzenie całej figury traci sens.

Zazwyczaj, zwłaszcza przy porównywaniu grup obiektów biomedycznych, same amplitudy harmoniczne wystarczają do opisu różnic pomiędzy grupami (zob. rozdział 2). Czasem jednak uwzględnienie informacji zawartych w kątach fazowych może zwiększyć dokładność analizy. Kąty fazowe ( $\varphi_n$ ) nie nadają się bezpośrednio po obliczeniu ich wartości we wzorach (3.18), (3.14), (3.15) do analizy kształtu, gdyż zależą od wyboru punktu startowego. Do tego celu można użyć pewnej kombinacji kątów fazowych i amplitud harmonicznyc, która tej wady nie posiada. Miara ta ma następującą postać:

$$F_n = [(n+1)\varphi_n - n\varphi_{n+1}] W_n, \quad (3.19)$$

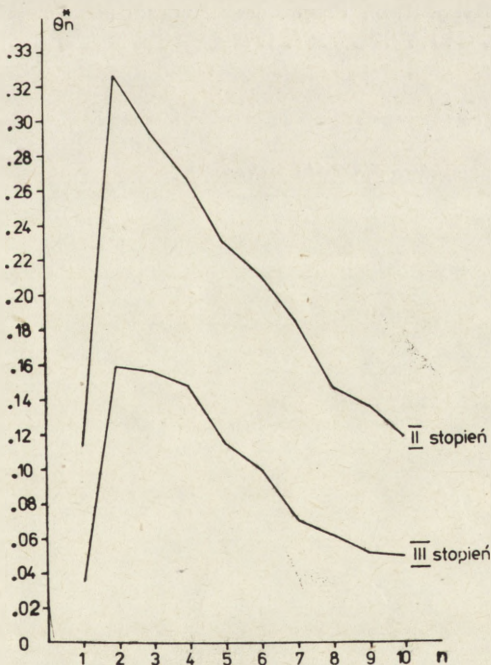
gdzie  $W_n = \min\{\theta_n^*, \theta_{n+1}^*\}$  jest wagą relatywnie zmniejszającą istotność miary, gdy odpowiadające jej amplitudy harmoniczne wnoszą niewielki wkład do całej figury. Przydatność tak określonych miar  $F_n$  została potwierdzona w analizie kształtu komórek o różnym stopniu transformacji nowotworowej przy użyciu metod analizy dyskryminacyjnej. Miary  $F_n$  znajdowały się często w pierwszej dziesiątce zmiennych o najwyższej mocy dyskryminacyjnej.

Przykładem zastosowania metody II w badaniach biomedycznych może być analiza dwóch grup komórek pochodzących z nabłonka ludzkiego pęcherza moczowego, różniących się stopniem transformacji nowotworowej, który oznaczany

jest jako II i III. Kontury 100 komórek z każdej grupy wprowadzono do pamięci minikomputera K-202 przy użyciu Cyfrowego Przetwornika Obrazów CPO-2 skonstruowanego w Instytucie Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej w Warszawie. Dla każdej komórki obliczono po 15 amplitud harmonicznych  $\theta_n^*$  i kątów fazowych  $\varphi_n$ , a na ich podstawie miar  $F_n$ . Amplitudy i miary  $F_n$  zostały następnie użyte jako zmienne w analizie dyskryminacyjnej, którą zastosowano do oceny różnic pomiędzy badanymi grupami. Różnice określono na podstawie odległości Mahalanobisa pomiędzy centroidami grup w przestrzeni funkcji dyskryminacyjnych. Uzyskano wartość odległości Mahalanobisa równą 7,66, co przy założeniu rozkładu normalnego każdej zmiennej odpowiada teoretycznemu błędowi prawidłowej klasyfikacji w każdej grupie przy użyciu obliczonych funkcji dyskryminacyjnych mniejszemu od 0,1%. Warunek normalności nie jest zwykle spełniony, co w tym przypadku znalazło swoje odbicie w błędnym zaklasyfikowaniu 9% komórek w jednej i 10% komórek w drugiej grupie. Odpowiedni test istotności dla odległości Mahalanobisa wykazał, że różnica pomiędzy grupami istnieje na poziomie istotności  $p < 0,001$ . Kolejność zmiennych ( $\theta_n^*$  i  $F_n$ ) uporządkowanych według malejącej mocy dyskryminacyjnej była następująca:

$$\theta_7^*, \theta_9^*, \theta_5^*, \theta_8^*, \theta_6^*, \theta_2^*, \theta_{13}^*, \theta_{14}^*, F_3, F_5.$$

Na podstawie powyższych wyników oraz wartości średnich poszczególnych amplitud harmonicznych (ryc. 3.3) można stwierdzić, że komórki o drugim stopniu



Ryc. 3.3. Widmo średnich amplitud harmonicznych  $\theta_n^*$  dla grup komórek o II i III stopniu transformacji nowotworowej

transformacji (II stopień) mają bardziej urozmaiconą powierzchnię niż komórki o trzecim stopniu transformacji (III stopień), z tym że różnice istnieją zarówno w stosunkowo niewielkich „pofałdowaniach” powierzchni, jak i w wydłużeniu komórek (w mniejszym stopniu).

Opisane powyżej dwie metody fourierowskiej analizy kształtu są bardzo uniwersalne. W tym tekście zilustrowaliśmy je dwoma przykładami z prac własnych. Dobrym argumentem dla uzasadnienia różnorodnych możliwości zastosowania omawianej metody będzie przypomnienie, że ten typ badań został wprowadzony po raz pierwszy do badań biologicznych przez geologów, a publikacja ta ukazała się w geologicznym piśmie poświęconym badaniom skał osadowych.

#### PIŚMIENNICTWO

- [1] EHRlich, R., WEINBERG B., An exact method for characterization of grain shape, *J. Sed. Petrology*, **40**: 205 – 212, 1970.
- [2] HEALY-WILLIAMS, N., WILLIAMS, D. F., Fourier analysis of test shape of planctonic foraminifera, *Nature*, **289**: 485 – 487, 1981.
- [3] KIELER, J., OSTROWSKI, K., STROJNY, P., DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A., BULSKI, W., Fourier analysis of the shape of normal and transformed epithelial cells derived from human transitional epithelium. *Histochemistry*, **81**: 119 – 128, 1984.
- [4] PLUTA, M., *Mikroskopia optyczna*, PWN, Warszawa, 1982.
- [5] ZAHN, C. T., ROSKIES, R. Z., Fourier descriptors for plane closed curves. *IEEE Transactions on Computers*, C-21, **3**: 269 – 281, 1972.

*Otrzymano: 10 października 1986*

*Przyjęto: 20 stycznia 1987*

*Adres autorów: ul. Chalubińskiego 5, 00-613 Warszawa.*

## GENY, NIEPRAWIDŁOWOŚCI CHROMOSOMOWE I BIAŁACZKI

## GENES, CHROMOSOMAL ABNORMALITIES AND LEUKAEMIAS

Zofia Monika RUPNIEWSKA, Maria KUROWSKA

Klinika Hematologii Instytutu Chorób Wewnętrznych  
Akademii Medycznej w Lublinie

*Streszczenie.* Każda komórka człowieka zawiera proto-onkogeny — geny, które mogą wywołać nowotwór (komórkowe onkogeny, cellular oncogenes, w skrócie c-„onc”). C-„onc” cechuje duża konserwatywność ewolucyjna charakterystyczna dla genów o ważnych funkcjach genetycznych. Przypuszcza się, że c-„onc” i ich produkty uczestniczą w kluczowych procesach odpowiedzialnych za wzrost i różnicowanie komórki. W artykule omówiono prawdopodobną rolę niektórych c-„onc” („myc”, „fos”, „myb”, „ras”, „fes”, „abl”, i „fms”) w limfo- i hemopoezie. Nieprzypadkowe aberracje chromosomowe występujące w białaczkach i chłoniakach wiążą się ze zmianą struktury i/lub czynności c-„onc”.

*Summary.* Every human cell contains proto-oncogenes — genes that have the potential to cause cancer (cellular oncogenes, c-„onc”). The great evolutionary conservation is characteristic of c-„onc” genes with significant genetic functions. The c-„onc” and their products seem to have roles that must be crucial in the cell growth and differentiation. This review summarizes very probable role of some c-„onc” („myc”, „fos”, „myb”, „ras”, „fes”, „abl” and „fms”) in normal lympho- and haematopoiesis. Nonrandom and specific chromosome aberrations commonly observed in leukaemias and lymphomas are associated with alteration in structure and/or function of c-„onc”.

## WPROWADZENIE

W prawidłowych komórkach prekursorowych linii mielopoetycznej występuje sprzężenie procesów proliferacji (multiplication) i różnicowania. W warunkach hodowli, pod wpływem zewnątrzpochodnych czynników wzrostu, komórki te proliferują, a następnie już same, bez zewnątrzpochodnego czynnika, różnicują się, wytwarzając własne czynniki różnicowania [177]. Czynniki wzrostu wywiera więc dwojakie działanie: wy-

wołuje proliferację komórek prekursorowych, co z kolei indukuje wytwarzanie przez nie czynnika różnicowania.

Czynniki wzrostu są klasyfikowane według ich specyficzności. U myszy np. wykryto cztery czynniki pobudzające wzrost i różnicowanie komórek mieloidalnych. Są to:

1. Wielopotencjalny czynnik wzrostu indukujący proliferację i różnicowanie komórek macierzystych [72, 82, 138, 156]. Czynnik ten pobudza wytwarzanie kolonii erytrocytów, megakariocytów, neutrofilii, makrofagów, komórek tucznych, a być może także komórek limfoidalnych. Nazywano go czynnikiem pobudzającym wytwarzanie większości kolonii szpikowych (multi-colony stimulating factor, w skrócie multi-CSF), lub interleukiną-3 (IL-3). Komórki linii WEHI-3B<sub>„D<sup>+</sup>”</sub> wyprowadzonej z ostrej białaczki mielo-monocytovej myszy [119, 216] wytwarzają znamienne ilości IL-3 [109, 118, 154].

2. Czynnik wzrostu pobudzający wytwarzanie kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor, w skrócie GM-CSF) [12].

3. Czynnik wzrostu pobudzający wytwarzanie kolonii makrofagów (macrophage-colony stimulating factor, w skrócie M-CSF) [197], a więc działający na bardziej zróżnicowane komórki.

4. Czynnik wzrostu pobudzający wytwarzanie kolonii granulocytów (granulocyte-colony stimulating factor, w skrócie G-CSF). Czynnik ten indukuje wzrost i różnicowanie kolonii granulocytów w półpłynnym agarze [137], a także *in vitro* hamuje proliferację komórek białaczki mielo-monocytovej myszy [13, 119].

U człowieka ze specyficznego medium hodowlanego linii komórkowej limfoblastów T wyizolowano i oczyszczono GM-CSF [62]. Ponadto udało się uzyskać klon sekwencji genowych kodujących ludzki GM-CSF [80].

Ostatnio z ludzkiej linii komórkowej 5637 wyprowadzonej z raka pęcherza moczowego wyizolowano i scharakteryzowano wielopotencjalny CSF [117, 133, 136, 148, 194, 222], o właściwościach odpowiadających zarówno mysiej IL-3, jak i G-CSF. Wielopotencjalny CSF podtrzymywał wzrost siedmiodniowych kolonii neutrofilów, a także wzrost kolonii prekursorów erytrocytów (erythrocyte-burst forming unit, w skrócie E-BFU), oraz komórek macierzystych zapoczątkowujących mieszane kolonie hemopoetyczne (colony forming unit — granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte, w skrócie GEMMeg). Ponadto czynnik ten wywoływał różnicowanie mysiej linii komórkowej WEHI-3B<sub>„D<sup>+</sup>”</sub>, a także różnicowanie do makrofagów i granulocytów komórek pochodzących z ludzkich ostrych białaczek szpikowych klasyfikowanych jako: ostra białaczka mieloblastyczna z tendencją do dojrzewania, białaczka promielocytowa i białaczka mielo-monocytovej [194].

NIEKTÓRE GENY RZĄDZĄCE PROLIFERACJĄ (ODNAWIANIEM SIĘ)  
I RÓŻNICOWANIEM KOMÓREK MACIERZYSTYCH I ICH ROLA  
W LEUKEMOGENEZIE

Niezwykłe interesujące są badania genów, które regulują odnawianie się i różnicowanie komórek. O roli genów w mielopoezie wiemy jeszcze bardzo niewiele. Większość badań dotyczy tzw. proto-onkogenów. Proto-onkogeny lub potencjalne onkogeny komórkowe (cellular-„onc”, w skrócie c-„onc”) są to geny homologiczne z onkogenami szybko transformujących retrowirusów (viral-„onc”, w skrócie v-„onc”), które w ciągu krótkiego czasu wywołują nowotwór. W retrowirusach zidentyfikowano ponad 20 v-„onc” odpowiedzialnych za rozwój nowotworów u ptaków, myszy, kotów i małp. Onkogeny te są opisane trzema inicjałami w zależności od zwierzęcia lub nowotworu, z których je po raz pierwszy izolowano. Każdy v-„onc” retrowirusa powstaje przez rekombinacje i mutacje c-„onc” gospodarza. Niepokojący jest fakt, że coraz częściej spotyka się retrowirusy posiadające dwa różne onkogeny, jak np. wirus mieloblastozy i erythroblastozy ptaków E 26 (avian E 26 myeloblastosis and erythroblastosis virus, w skrócie E 26) rozporządzający onkogenami „myb” i „ets” [140]. Onkogeny te kodują odmienne produkty białkowe, które jednak uzupełniają się w działaniu transformującym.

Co najmniej dwa argumenty przemawiają za tym, że c-„onc” odgrywają istotną rolę w fizjologii komórki. Po pierwsze: c-„onc” są pieczołowicie przechowywane (conservation) w procesie ewolucji. Bishop [9] sądzi, że są one przechowywane od ponad 1000 milionów lat. Wykryto je w gatunkach ewolucyjnie tak odległych od człowieka jak drożdże piwne [cyt. wg 155] lub owady [187, 188]. Po drugie: w prawidłowych tkankach w różnych okresach wzrostu i dojrzewania występuje ekspresja niektórych c-„onc” i jak się wydaje odgrywają one kluczową rolę w procesach odnawiania się i różnicowania komórek.

Proto-onkogeny i onkogeny wirusowe kodują białka, które działają na różne czynności komórki. Białkowe produkty onkogenów można podzielić na cztery grupy [77, 81, 221]. Pierwszą grupę stanowią produkty o właściwości czynników wzrostu, jak np. płytkowo-pochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor, w skrócie PDGF), kodowany (przynajmniej częściowo) przez c-„sis”, który wykazuje homologię z onkogenem v- $\Delta$  „gag”  $\Delta$  „env”-„sis” retrowirusa mięsaka małpy wełnistej (simian sarcoma virus, w skrócie SSV) [43, 217]. Onkogen retrowirusa jest genem hybrydowym powstałym z delecyjnych genów  $\Delta$  „gag” i  $\Delta$  „env” retrowirusa, oraz z komórkowego genu „sis”. (Wirusowy gen „gag” koduje białka wnętrza wirionu, „pol” — odwrotną transkryptazę, „env” — glikoproteiny osłonki).

Do drugiej grupy należą produkty o właściwości receptorów dla

czynników wzrostu, jak np. receptor dla czynnika wzrostu naskórka (epidermal growth factor, w skrócie EGF), którego część cytoplazmatyczną (wykazującą aktywność fosfokinazy tyrozynowej) koduje c-„erb-B” homologiczny z hybrydowym v-Δ„gag”-„erb-A”-„erb-B”-Δ „env” retrowirusa erythroblastozy ptaków (avian erythroblastosis virus, w skrócie AEV) [44]. Komórkowy gen dla receptora EGF jest doskonałym kandydatem na onkogen, ponieważ jego produkt posiada aktywność fosfokinazy tyrozynowej wspólną z co najmniej siedmioma produktami innych onkogenów wirusowych, których przedstawicielem jest białko kodowane przez v-„src” retrowirusa mięsaka Rousa drobiu (Rous sarcoma virus, w skrócie RSV) [81]. Obecnie przypuszcza się, że poza „erb-B” jeszcze dwa inne geny z rodziny „src”, a mianowicie „abl” i „fms” kodują białka o właściwościach receptorów dla czynników wzrostu [89]. O tych ostatnich genach będzie mowa dalej.

Trzecią grupę tworzą produkty działające poprzez wewnątrzkomórkowy układ informacyjny (intracellular messenger system), który pobudzany przez czynniki wzrostu zapoczątkowuje syntezę DNA i podział komórki. Należą tu białka wiążące guanozynotrójfosforan (GTP) kodowane przez rodzinę komórkowych genów „ras” (c-„Ha-ras-1”, c-„Ki-ras-2”, „N-ras”). C-„Ha-ras-1” i c-„Ki-ras-2” są homologiczne z v-„ras” retrowirusów mięsaka Harveya i Kirstena szczurów (Harvey and Kirsten rat sarcoma viruses, w skrócie Ha-RSV i Ki-RSV). „N-ras” jest onkogenem komórkowym, który wykryto m.in. w komórkach białaczki promielocytowej (linia komórkowa HL-60), a także w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej (linia komórkowa IMG), ostrych białaczek limfoblastycznych T i pre-B komórkowych (linie CCRF-CEM, MOLT-3, MOLT-4, 8392 itd.) i w chłoniaku Burkitta (linia komórkowa Ramos) [cyt. wg 111]. Eva i wsp. [50] podają, że ponad 50% ostrych białaczek szpikowych posiada „N-ras”.

Do czwartej grupy zaliczono produkty związane z jądrem komórkowym, bezpośrednio kontrolujące replikację DNA, jak np. białka kodowane przez c-„myc”, c-„fos”, c-„myb” i „Blym”, które to geny zostaną omówione dalej.

Znając zatem mechanizm działania produktów kodowanych przez c-„onc”, można wnioskować o roli tych genów w mielopoezie. Dodatkowo pośrednie wnioski można wyciągnąć z badań ekspresji i amplifikacji (zwielokrotnienia) c-„onc” w komórkach białaczkowych, a także z badań translokacji chromosomowych występujących w białaczkach.

W odnawianiu się komórek ważną rolę odgrywają produkty c-„onc”, które wiążą się z jądrem komórkowym (czwarta grupa produktów w przedstawionej powyżej klasyfikacji). Geny kodujące te produkty należą do tzw. genów stymulujących mitogenezę. W tab. 1 omówiono trzech przedstawicieli z tej grupy, a mianowicie c-„myc”, c-„fos” i c-„myb”.



TABELA I

Niektóre proto-onkogeny kodujące białka związane z jądrem komórkowym [modyfikacja wg 45, 61, 81]

c-, onc"	Homologiczny v-, onc"	Transformujący retrowirus	Nowotwory związane wywołane przez te retrowirusy	Transformacja komórek „in vitro”	Lokalizacja c-, onc" w chromosomach człowieka	Piśmiennictwo
„myc"	$\Delta$ „gag”-, myc”- $\Delta$ „env”	Retrowirus mielocytomatozy ptaków szczezu MC 29 (avian MC 29 myelocytomatosis virus, w skrócie MC 29)	Mięsaki, raki, ostre białaczki	Fibroblasty, komórki krwi	8q24.1	[27, 134, 206, 234]
„fos”	„fos”	Retrowirus mięsaka kości Finkel-Biskis-Jinkins (RBJ) myszy (Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma virus, w skrócie FBJ-MSV)	Mięsaki	Fibroblasty, komórki krwi	14q21→q31	[4]
„myb”	$\Delta$ „gag”-, „pol”-, „myb”	Retrowirus mieloblastozy ptaków (avian myeloblastosis virus, w skrócie AMV)	Ostre białaczki	Komórki krwi	6q23	[28, 74, 234]
	$\Delta$ „gag”-, „myb”-, „ets”- $\Delta$ „env”	Retrowirus mieloblastozy i erytroblastozy ptaków szczezu E 29 (avian E 29 myeloblastosis and erythroblastosis virus, w skrócie E 29)	Mieloblastoza, erytroblastoza			

\* Wydaje się, że istnieją strukturalne podobieństwa między c-, myc" i c-, myb" i c-, myb", które być może dotyczą także kodowanych przez nie produktów [155].

Stiles [cyt. wg 51] c-„myc” i c-„fos” nazywa genami kompetencji wzrostu (growth competence genes) warunkującymi wystąpienie i przebieg cyklu komórkowego. W niedawno opublikowanych pracach [14, 90] badano rolę c-„myc” w kontroli wzrostu zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych komórek. Kelly i wsp. [90] wykazali, że mitogen fibroblastów, jakim jest PDGF oraz dwa mitogeny limfocytów (konkanawalina A i liposacharyd) zwiększają ekspresję c-„myc” odpowiednio w fibroblastach i limfocytach. Wydaje się, że przejście z okresu spoczynkowego do okresu syntezy DNA otwiera fazę, zwana fazą zapoczątkowującą „kompetencję wzrostu” („growth competence”), podczas której komórki replikują DNA i dzielą się. Z fazą tą wiąże się przejściowa, w ciągu 1 - 2 godz., ekspresja c-„myc”.

Co ciekawsze, z chwilą nabycia przez komórkę „kompetencji wzrostu” PDGF staje się zbędny i fibroblasty replikują DNA i dzielą się nawet po usunięciu PDGF ze środowiska hodowlanego lub po zadziałaniu przeciwciałami skierowanymi przeciw PDGF [18, 39, 149, 174, 189]. Prawdopodobnie w ciągu 30 min. do 3 godz. od ekspozycji na PDGF reagujące komórki nabywają stabilny już układ wewnątrzkomórkowych sygnałów, które warunkują odpowiedź na PDGF [193]. Powstanie tych wewnątrzkomórkowych sygnałów zależy od pewnych genów indukowanych przez PDGF. Są to c-„myc” [90] i c-„fos” [19, 69]. Zdaniem Müllera i wsp. [127] aktywacja c-„fos” wyprzedza c-„myc” i występuje już w ciągu 5 min. od stymulacji fibroblastów przez surowicze czynniki wzrostu (do których m.in. należy PDGF). Stiles sądzi, że te dwa geny kompetencji wzrostu współdziałają z genami progresji wzrostu i sugeruje indukcję przez czynniki wzrostu różnego rodzaju genów. Autor ten wykazał [cyt. wg 135], że po stymulacji fibroblastów przez PDGF, po ekspresji „fos” i „myc”, w późniejszym okresie występuje ekspresja genów kodujących interferon beta i syntetazę 2'5'-oligoadenyłową (wytwarzanie interferonu i syntetazy zwłaszcza indukują wirusy). Należy jednak podkreślić, że przy prawidłowej regulacji wzrostu komórki ekspresja tych wszystkich genów jest tylko przejściowa.

W układzie wewnątrzkomórkowych (pozareceptorowych) sygnałów poza c-„myc” i c-„fos” uczestniczy jeszcze c-„Ha-ras-1” [195], homologiczny z v-„Ha-ras-1” Ha-RSV. Retrovirus ten u szczurów wywołuje mięsaki i ostre białaczki, a w hodowli transformuje fibroblasty i być może także komórki krwi [45]. U człowieka c-„Ha-ras-1” zlokalizowano w chromosomie 11 w prążkach p14.1 → 14.2 [63]. Prawidłowe, kodowane przez c-„ras” białko — p21 „ras” (o ciężarze cząsteczkowym 21.000) jest zlokalizowane na wewnętrznej cytoplazmatycznej powierzchni błony komórkowej [59, 227] i wykazuje dwojakiego rodzaju aktywność. Po pierwsze: silnie wiąże GTP [186]. Po drugie: posiada aktywność hydrolazy

GTP (GTPazy) rozkładającej GTP do nieaktywnej formy guanozynodwufosforanu (GDP) i nieorganicznego fosforanu [64, 186, 203].

Ta druga aktywność wywiera wpływ hamujący pierwszą, dzięki czemu wewnątrzkomórkowy sygnał nie działa w sposób ciągły. Białka kodowane przez c-„ras” wykazują homologię sekwencji aminokwasów i jak się wydaje, pełnią podobne czynności co rodzina białek-G (G-proteins), które stanowią pośrednie ogniwo przenoszące sygnały z molekuly receptora do enzymu efektorowego — cyklazy adenylowej (G<sub>s</sub>-protein-stimulatory regulatory protein of adenylate cyclase, G<sub>i</sub>-protein-inhibitory protein). Gdy białka-G zwiążą się z GTP wchodzą w tzw. stan uaktywnienia (active state) i stymulują cyklazę adenylową. Gdy GTP ulegnie hydrolizie do GDP, białka-G wracają do stanu nieaktywności. W warunkach prawidłowych reaktywacja białek-G zachodzi po wysłaniu następnego sygnału z molekuly receptora, który indukuje przemianę GDP w GTP [10].

Białkowy produkt kodowany przez v-„ras” również posiada zdolność wiązania GTP, ale aktywność GTPazy jest znacznie niższa [115, 203]. W związku z powyższym należy oczekiwać istotnego zwiększenia stymulacji enzymu efektorowego przez białko v-„ras” związane z GTP [81].

Dotychczas nie znamy enzymu efektorowego dla p21 „ras”. Beckner i wsp. [7] wykluczyli wpływ p21 „ras” na cyklazę adenylową. Sugeruje się, że takim enzymem efektorowym jest fosfolipaza C [192]. Fosfolipaza C katalizuje powstawanie trójfosforanu inozytolu i dwuacylglicerolu, przypuszczalnych przenośników (messengers), które uczestniczą w przemianach prowadzących do proliferacji komórki, wywołanych czynnikami wzrostu [10].

Campisi i wsp. [14] podają, że podczas transformacji prawidłowej komórki w komórkę nowotworową regulacja c-„myc” zostaje zaburzona, a jego aktywacja staje się niezależna od osoczowych czynników wzrostu. Jeśli w komórce wskutek zaburzonej regulacji c-„myc” nagromadzą się duże ilości produktów kodowanych przez „myc”, zostaje ona „unieśmiertelniona” („immortalize”) i bezustannie replikuje DNA w przeciwieństwie do prawidłowych komórek, które mają ograniczoną zdolność podziałów. Jednakże samo „unieśmiertelnienie” nie wystarczy do konwersji prawidłowej komórki w komórkę nowotworową. Dla wystąpienia innych aspektów stanu nowotworowego konieczna jest aktywacja co najmniej jeszcze jednego onkogenu. Według koncepcji Landa i wsp. [101] opartej na doświadczeniach, w których do hodowli zarodkowych fibroblastów wprowadzono kombinację dwu genów „myc” i „ras”, pierwszy z tych genów jest genem „unieśmiertelniającym” fibroblasty przynajmniej w warunkach in vitro, natomiast pozostającym bez wpływu na ich fenotyp, i dopiero drugi gen z rodziny „ras” jest konieczny dla całkowitej trans-

formacji. Ten udział kilku uzupełniających się genów w transformacji nowotworowej być może stanowi odpowiednik prawidłowego odnawiania się komórek wywołanego czynnikami wzrostu. Tak np. komórki NIH 3T3 wyprowadzone z fibroblastów myszy BALB/c dla rozpoczęcia replikacji wymagają współdziałania „czynników kompetencji” i „progresji” [149, 198].

Zwiększona ekspresja różnych c-„onc” nie musi się wiązać z transformacją nowotworową, a występuje np. w życiu płodowym i tuż po narodzeniu, oraz w tkankach pozazarodkowych jak łożysko, błony płodowe, owodnia [130]. Interesujący jest udział c-„onc” w mielopoecie, chociaż właściwa ich rola zostanie poznana dopiero w przyszłości.

Zwiększoną ekspresję c-„myc” i c-„myb” obserwowano podczas wczesnych etapów różnicowania prawidłowych komórek limfo- i mielo-poetycznych, przy czym ich aktywność zanikała w miarę dojrzewania [16, 21, 67]. Cofnięcie się ekspresji c-„myc” i/lub c-„myb” wiąże się z przejściem komórki mieloidalnej z programu proliferacji (odnawiania się) do programu różnicowania [223]. Ekspresja c-„myb” wydaje się specyficzna dla prekursorowych komórek linii granulocytów [223].

W komórkach szpiku stwierdzono także ekspresję c-„fos” [129]. Przypuszczalnie c-„fos” odgrywa rolę w różnicowaniu mielo-monocytów i makrofagów [66, 128, 129]. Zdaniem Müllera i wsp. [127, 128] ekspresja c-„fos” w niektórych komórkach, jak np. w fibroblastach stymulowanych surowiczymi czynnikami wzrostu występuje na przełomie fazy G<sub>0</sub> i G<sub>1</sub> cyklu komórkowego i warunkuje proliferację, natomiast ekspresja c-„fos” w takich komórkach jak makrofagi stymulowane M-CSF występuje w fazie G<sub>1</sub> aż do połowy fazy S i indukuje różnicowanie, a być może wiąże się z regulacyjnym wpływem produktu c-„fos” na niektóre czynności specyficzne dla makrofagów.

O znaczeniu omawianych c-„onc” w mielopoecie, jak już to powiedziano, można wnioskować także pośrednio, badając ich ekspresję i amplifikację w ustalonych liniach komórkowych wyprowadzonych od chorych na białaczki i w nie hodowanych komórkach białaczkowych pochodzących bezpośrednio z krwi lub szpiku pacjentów. W prawidłowych komórkach c-„onc” występuje zazwyczaj jako pojedyncza kopia na genom haploidalny. Natomiast w komórkach nowotworowych często występuje amplifikacja c-„onc”.

Amplifikacja c-„onc” niekiedy wiąże się z wystąpieniem w obrębie chromosomu (w którym znajduje się c-„onc”) długich jednorodnie barwiących się (zatarcie struktury prążkowania) odcinków chromatyny (homogenously staining regions, w skrócie HSRs). Zwielokrotnione fragmenty chromosomu mogą ulec oderwaniu, tworząc drobne pozachromosomowe ciała chromatyny (double minutes, w skrócie DMs). Z kolei

ciałka chromatyny mogą zostać ponownie wcielone w chromosom w postaci nieprawidłowo barwiących się fragmentów (abnormally banded regions, w skrócie ABRs) zgodnie z hipotezą powrotu do chromosomu [9].

Jednakże zmiany morfologiczne nie zawsze odpowiadają pierwotnej amplifikacji c-„onc”. Tak np. w cytowanym przez Kleina i Klein [94] przypadku owsianokomórkowego raka płuc wszystkie komórki pochodzące z ognisk przerzutowych wykazywały amplifikację c-„myc”, ale różniły się rozmieszczeniem HSRs.

Szczególnie znanym przykładem amplifikacji c-„myc”, wskazującym na jego rolę we wczesnych etapach mielopoezy, jest ustalona linia komórkowa HL-60. Linia HL-60 została wyprowadzona z komórek krwi obwodowej pacjenta z ostrą białaczką promielocytową i jest uważana za linię promielocytów, którą jednak można pobudzić do różnicowania w granulocyty i makrofagi [23, 30, 224]. W tej ciągle rosnącej linii komórkowej wykazano 30 - 50-krotną amplifikację „myc” z istotnie zwiększoną transkrypcją, która jednak bardzo szybko może być zahamowana, gdy komórki zostaną pobudzone do różnicowania. Amplifikację „myc” obserwowano również w nie hodowanych komórkach pochodzących bezpośrednio z krwi obwodowej pacjenta z białaczką promielocytową, od którego wyprowadzono linię HL-60. Zwielokrotnione sekwencje „myc” w komórkach linii HL-60 znajdowały się w DMs [30, 60]. Kilka lat później Nowell i wsp. [139], przeprowadzając badania tej samej linii HL-60, nie mogli już wykryć DMs, ale w miejscu prawidłowego chromosomu 8 występował chromosom 8q+ z ABRs, które odzwierciedlały miejsce amplifikacji „myc”. Ponadto amplifikację „myc” opisano w jednym przypadku przewlekłej białaczki szpikowej z przebytymi trzema przełomami promielocytowymi [114]. Występuje więc pewna tendencja do koincydencji między amplifikacją „myc” a proliferacją promielocytów.

Z drugiej jednak strony amplifikacja „myc” w białaczkach jest raczej rzadko spotykana. Rotheberg i wsp. [159] obserwowali amplifikację „myc” tylko w jednym przypadku chłoniaka Burkitta, pomimo przebadania 106 chorych z białaczkami i chłoniakami. Yokota i wsp. [230] wśród 21 chorych z białaczkami i chłoniakami u żadnego nie wykryli amplifikacji „myc”. Natomiast amplifikacja „myc” jest względnie powszechna w nowotworach epithelialnych i mięsach (11 - 22%) [94, 230], przy czym wiąże się z bardziej złośliwą odmianą pierwotnego nowotworu lub rozsiewem choroby nowotworowej. Zakres amplifikacji „myc” w nie hodowanych komórkach nowotworowych pochodzących bezpośrednio od pacjentów jest niższy (3 - 8-krotny) niż w ustalonych liniach komórkowych (5 - 50-krotny) [230].

Znacznie częściej niż amplifikację „myc” obserwuje się zwiększenie jego ekspresji, co zostanie przedstawione w tab. 2.

Istotnie zwiększoną ekspresję „myb” Slamon i wsp. [190] obserwowali we wszystkich siedmiu badanych przypadkach ostrych białaczek szpikowych, przy czym w trzech przypadkach towarzyszył jej wzrost ekspresji „myc”, a w jednym „fos”.

5-10-krotną amplifikację „myb” obserwowano w liniach komórkowych ML-1, ML-2 i ML-3 [145]. Linie ML-1, 2 i 3 są to trzy różne, niezależnie wyprowadzone linie, pochodzące z komórek krwi obwodowej tego samego pacjenta z ostrą białaczką mieloblastyczną [122, 204]. W badaniach cytochemicznych i w fenotypie immunologicznym linie ML-1, 2 i 3 są bardzo podobne do linii HL-60, w której wykryto amplifikację „myc”. W linii HL-60 występuje ponadto zwiększona ekspresja „myb” cofająca się, gdy zostanie wywołane różnicowanie do granulocytów [223]. Obserwowana przez Peliciego i wsp. [145] amplifikacja „myb” w liniach ML-1, 2 i 3 korelowała z wysokim poziomem transkrypcji tego genu i z nieprawidłowościami we fragmencie q22 → q24 chromosomu 6, gdzie znajduje się locus c-„myb”. Autorzy ci, opierając się na podobieństwach między liniami HL-60 i ML-1, 2, 3, w których występuje amplifikacja odpowiednio „myc” i „myb”, sądzą, że onkogeny te mogą być alternatywnie indukowane w leukemogenezie i reprezentują odmienne markery genetyczne tego procesu. A zatem „myc” i „myb” nie kontrolują procesu różnicowania komórek mieloidalnych, jedynie podtrzymują ich proliferację. Za powyższym poglądem przemawiają także badania Kirscha i wsp. [92], którzy w mysiej linii erytroleukemicznej obserwowali zniknięcie ekspresji „myc” i „myb” po wywołaniu różnicowania w kierunku erytrocytarnym (wytwarzanie globiny). Podobne wyniki uzyskali Gonda i Metcalf [66], wywołując różnicowanie linii komórkowej WEHI-3B, $D^{+}$ . Linia WEHI-3B została wyprowadzona z komórek ostrej białaczki mielo-monocytovej myszy, zaś w podlinii WEHI-3B, $D^{+}$  łatwo można wywołać różnicowanie do postaci monocytoidalnych [119]. Gonda i Metcalf [66] obserwowali zwiększoną ekspresję „myc” i „myb” w komórkach tej linii, gdy jednak wywołano różnicowanie monocytoidalne, ekspresja omawianych genów uległa zahamowaniu, natomiast występował znamieny wzrost ekspresji „fos”.

Obserwację dotyczącą wzrostu ekspresji c-„fos” podczas różnicowania monocytoidalnego potwierdzają także badania Müllera i wsp. [128]. Autorzy ci stwierdzili, że wywołanie różnicowania linii HL-60 do komórek przypominających makrofagi przy pomocy dwuustru forbolu (12- $\beta$ -tetradecanoylphorbol-13-acetate, w skrócie TPA) wiąże się z ekspresją c-„fos”. W całkiem zróżnicowanych makrofagach ekspresja c-„fos” może

być wywołana przez M-CSF. A zatem „fos”, jak się wydaje, odgrywa rolę w pewnych czynnościach specyficznych dla monocytów-makrofagów.

W tab. 2 streszczono dane dotyczące ekspresji „myc”, „fos” i „myb” w ustalonych liniach komórkowych wyprowadzonych z ludzkich białaczek i chłoniaków. Ekspresja „myc” poza tym, że występuje w fibroblastach stymulowanych PDGF i limfocytach stymulowanych konkanawaliną A i liposacharydem [90] (czego nie uwzględniono w tab. 2), jest obserwowana: w mieloblastach linii KG-1 (linia wyprowadzona od pacjenta z ostrą erytroleukemią), w promielocytach linii HL-60, we wczesnych postaciach erytroblastów linii K-562 (linia wyprowadzona z komórek wysięku opłucnowego pacjenta z przełomem blastycznym w przebiegu przewlekłej białaczki szpikowej), w niedojrzałych komórkach T z linii CEM i MOLT-4 oraz w dojrzałych komórkach T linii HUT-78 i HUT-102, a także w transformujących komórkach B z linii Raji i Daudi (linie wyprowadzone z chłoniaka Burkitta) [61]. W liniach mielo- i erytropoetycznych, a także w liniach niedojrzałych komórek T zwiększonej ekspresji „myc”, towarzyszy zwiększona ekspresja „myb”, chociaż poziom tej ekspresji jest różny [61, 145]. Nie obserwowano ekspresji „myb” w liniach dojrzałych komórek T i w liniach transformujących komórek B (Raji i Daudi) [61]. Ekspresja c-„myc” i c-„myb” ulegała znamienne- mu obniżeniu, gdy wywołano różnicowanie linii KG-1 i HL-60 [wg 95]. Także produkt kodowany przez c-„ras” (p21 „ras”) ulegał fosforylacji po indukcji dojrzewania komórek prekursorowych przez specyficzne czynniki pobudzające wytwarzanie kolonii (CSFs) [cyt. wg 55]. Natomiast wywołanie różnicowania linii HL-60 do komórek przypominających makrofagi zwiększa ekspresję c-„fos” [128].

Do genów wydających się odgrywać rolę większą, niż poprzednio przedstawione, w różnicowaniu komórek, należą niektóre z genów kodujących produkty o aktywności fosfokinazy tyrozynowej. Fosfokinaza tyrozynowa jest enzymem przenoszącym wysoko energetyczne grupy fosforanowe z komórkowego nośnika energii, jakim jest trójfosforan adenozyny (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 [81]. Czynność fosfokinazy tyrozynowej wykazuje m.in. uaktywniony receptor dla EGF. Jeśli więc onkogen koduje enzym o aktywności kinazy tyrozynowej, łatwy do przewidzenia będzie jego wpływ na wzrost i różnicowanie komórek. Produkty omawianych genów są rozmieszczone albo w obrębie błony komórkowej, albo w cytoplazmie, tuż przy wewnętrznej powierzchni błony komórkowej [81]. Przypuszcza się, że pełnią one czynność receptorów dla czynników wzrostu lub przynajmniej czynność cytoplazmatycznej części tych receptorów (druga grupa produktów

TABELA 2

Ekspresja niektórych proto-onkogenów w liniach wyprowadzonych z ludzkich białaczek i chłoniaków [modyfikacja wg 61]

Linia komórkowa*	Zatrzymanie w okresie różnicowania	Uzyskano różnicowanie w	Induktory różnicowania	„myc”	Ekspresja c-,onc” „fos”	„myb”
KG-1	mieloblasta	makrofagi	czynniki pobudzające wytwarzanie kolonii (CSFs) dwuestry forbolu teleocydyny	++	brak danych	++
HL-60	promielocyta	granulocyty makrofagi	CSFs różne induktory	++++	++	++
ML-1, 2, 3	mielomonoblasta	makrofagi niekiedy granulocyty	dwuestry forbolu teleocydyny	—	brak danych	++++
K-562	bardzo młodych komórek blastycznych i/lub bardzo młodych prekursorów erytroblastów	wczesne postacie erytroblastów	czynnik zbliżony do erytropoetyny hemina masłan	++	brak danych	++
CEM	niedojrzałe komórki T			++	brak danych	+++
MOLT-4	niedojrzałe komórki T			++	brak danych	+++
HUT-78	dojrzałe komórki T			++	brak danych	—
HUT-102	dojrzałe komórki T			++	brak danych	—
Raji	transformujące komórki B (linia chłoniaka Burkitta)			++	brak danych	—
Daudi	transformujące komórki B (linia chłoniaka Burkitta)			++	brak danych	—

\* W większości tych linii występują nieprawidłowości chromosomowe. Takie same nieprawidłowości stwierdzono w nie hodowanych białaczkowych komórkach pacjentów, od których wyprowadzono te linie.



proto-onkogenów, których przedstawicielem jest gen dla receptora EGF, według przedstawionej na początku klasyfikacji).

W procesach wzrostu i różnicowania komórek mieloidalnych odgrywają rolę trzy proto-onkogeny z omawianej grupy, a mianowicie „fes”, „abl” i „fms”. Proto-onkogeny te scharakteryzowano w tab. 3.

Ferrari i wsp. [53] podają, że transkrypcja c-„fes” występuje we wszystkich komórkach szpikowych człowieka, ale jest niewykrywalna w komórkach limfoidalnych. Zwiększoną ekspresję „fes”, obok znacznie zwiększonej ekspresji „myb”, Slamon i wsp. [190] stwierdzili we wszystkich badanych przypadkach ostrych i przewlekłych białaczek szpikowych i limfatycznych, chociaż nie obserwowano jej (poza kilkoma wyjątkami) w guzach litych. Natomiast Gallo i Wong-Staal [61] w żadnej z ustalonych linii komórkowych wyprowadzonych z ludzkich białaczek i chłoniaków, które przedstawiono w tab. 2, nie wykryli ekspresji „fes”.

Proto-onkogenem, który prawdopodobnie odgrywa ważną rolę w procesach wzrostu i różnicowania komórek zarówno mieloidalnych, jak i limfoidalnych, jest c-„abl”. Gallo i Wong-Staal [61] obserwowali ekspresję „abl” w liniach komórkowych wyprowadzonych od pacjentów z proliferacjami mielo- i limfopoetycznymi typu komórki T i B (linie komórkowe przedstawione w tab. 2). Ponadto ekspresja „abl” utrzymuje się na względnie stałym poziomie podczas różnicowania linii KG-1 do makrofagów i HL-60 do granulocytów lub makrofagów [95].

Proto-onkogenem związanym z różnicowaniem komórek linii monocytów-makrofagów (ale nie granulocytów) jest „fms”. Mianowicie stwierdzono, że indukcja dojrzewania linii HL-60 do monocytów-makrofagów (ale nie do granulocytów) przy pomocy TPA lub metabolitu witaminy D (1,25-dwuhydroksy-witaminy D<sub>3</sub>) wiąże się z ekspresją c-„fms”, którą wyprzedza ekspresja c-„myc” i c-„fos” [179]. Podobną ekspresję c-„fms” obserwowano, wywołując dojrzewanie linii U-937 do makrofagów [179]. Linia komórkowa U-937 jest ludzką linią monocytoidalną [200]. Ekspresję „fms” stwierdzono także w nie hodowanych białaczkowych blaszках pochodzących od czterech chorych z białaczką mielo-monocytową [179] i w jednym przypadku przewlekłej białaczki szpikowej [190]. Ponadto transkrypcja „fms” występuje w linii WEHI-3B, która, jak to powiedziano, została wyprowadzona z białaczki monocytowej myszy. Wydaje się więc, że produkt „fms” wpływa nie tylko na proliferację, ale również na różnicowanie linii jednojądrzastych komórek fagocytujujących.

Niewątpliwą rolę w różnicowaniu linii monocytów-makrofagów odgrywa gen „gm-csf” [80], który koduje GM-CSF. Gen „gm-csf” jest zlokalizowany w chromosomie 5 w prążkach q23 → q32 [80, 107], a więc w bezpośrednim sąsiedztwie c-„fms”. GM-CSF działa na komórki ukie-

TABELA 3

Niektóre proto-onkogeny kodujące tyrozynową i/lub białko o sekwencji zbliżonej do cytoplazmatycznej części receptorów dla czynników wzrostu [modyfikacja wg 45, 61, 81]

c-,onc"	Homologiczny v-,onc"	Transformujący retrovirus	Nowotwory zwierzęce wywołane przez te retrovirusy	Transformacja komórek in vitro	Lokalizacja c-,onc" w chromosomach człowieka	Produkt kodowany przez c-,onc"
„fes"	$\Delta$ „gag”-„fes”- $\Delta$ „env"	Retrovirus mięsaka Snyder-Theilina kota (Snyder-Theilin feline sarcoma virus, w skrócie ST-FeSV)	Mięsaki, raki	Fibroblasty kota, limfocyty pre-B myszy [147]	15q25→q26 [74, 76, 234]	Aktywność fosfokinazy tyrozynowej
„abl"	$\Delta$ „gag”-„abl”- $\Delta$ „env"	Retrovirus białaczki Abelsona myszy (Abelson murine leukemia virus, w skrócie A-MLV)	Ostra białaczka limfoblastyczna	Limfocyty pre-B [1, 3, 158]	9q34.1 [6, 65, 76]	Produkt prawidłowego c-,abl" posiada w cząsteczce kinazę tyrozynową, ale nie wykazuje aktywności tego enzymu (przy najmniej oceniając zdolność autofosforylacji) [97, 98]. Sugeruje się, że c-,abl" należy do genów kodujących część cytoplazmatycznej receptora dla czynników wzrostu takich jak IL-3 lub GM-CSF [89]
„fms"	$\Delta$ „gag”-„fms”- $\Delta$ „env"	Retrovirus mięsaka McDonougha kotów (McDonough feline sarcoma virus, w skrócie SM-FeSV)	Mięsaki	Fibroblasty [45]	5q32.2→q33.3 [107]	Aktywność fosfokinazy tyrozynowej [157]. Sugeruje się, że c-,fms" koduje część cytoplazmatyczną receptora M-CSF [185]

runkowane w mielopoezę, wiążąc się z ich specyficznymi receptorami. Jeden z tych receptorów (receptor dla M-CSF) jest, jak to już powiedziano, kodowany przez „fms”. Należy więc oczekiwać, że nieprawidłowości chromosomu 5 będą odgrywały niebanalną rolę w rozwoju chorób mieloproliferacyjnych. Przyjrzyjmy się zatem zaburzeniom chromosomowym, jakie występują w chorobach limfo- i mieloproliferacyjnych.

#### NIEPRAWIDŁOWOŚCI CHROMOSOMOWE A LEUKEMOGENEZA

Nieprawidłowości chromosomowe występujące w białaczkach i chłoniakach obejmują: obustronne translokacje, inwersje lub delecje. Niektóre z tych zmian są uważane za specyficzne dla proliferacji limfoidalnych, inne dla chorób mieloproliferacyjnych [166]. Mogą one pojawiać się w komórkach prekursorowych różnych linii (limfo- lub mielopoetycznych), przy czym komórki te mogą zostać zablokowane na różnych etapach różnicowania [164]. Nieprawidłowości cytogenetyczne w białaczkach i chłoniakach wiążą się ze specyficznymi złamaniami punktowymi, co sugeruje, że w miejscach tych złamań znajdują się geny c-„onc”, które zostają uaktywnione wskutek rearanżacji chromosomowych [231]. Uaktywnienie proto-onkogenu wywołuje kaskadę zmian molekularnych, a jeśli utrzymuje się przez dłuższy czas, być może inicjuje transformację nowotworową lub stan przednowotworowy.

Dysponujemy obecnie co najmniej dwoma przykładami ilustrującymi, w jaki sposób translokacja chromosomowa może uaktywniać niektóre c-„onc”. Po pierwsze: czynnikiem aktywującym c-„onc” może być przemieszczenie go w sąsiedztwo sekwencji regulacyjnych wykorzystywanych do uaktywnienia pewnych genów podczas różnicowania się komórek [25]. Po drugie: w następstwie rearanżacji może dochodzić do fuzji dwu genów, które będą kodowały nowe białka hybrydowe.

Dysponujemy obecnie kilkoma obserwacjami aktywacji genów c-„onc” przez loci immunoglobulinowe i prawdopodobnie także przez locus dla łańcucha alfa receptora komórek T. Takim najbardziej znanym przykładem jest deregulacja c-„myc” w chłoniakach Burkitta z translokacjami t (8; 14) (q24.1; q32.3) lub t (2; 8) (p11.1; q24.1) bądź t (8; 22) (q24.1; q11.2).

W następstwie translokacji c-„myc” ze swego prawidłowego położenia w prążku q24.1 chromosomu 8 zostaje przeniesiony:

- albo w locus dla części stałej łańcuchów ciężkich immunoglobulin, który znajduje się w prążku q32.3 chromosomu 14;
- albo (rzadziej) w locus dla łańcucha lekkiego kappa (chromosom 2p11.1);

— albo (również rzadko) w locus dla łańcucha lekkiego lambda (chromosom 22q11.2) (szczegółowe dane zob. [169]).

W dojrzałych prawidłowych limfocytach B i komórkach plazmatycznych c-„myc” jest nieaktywny transkrypcyjnie. Natomiast po zamknięciu w locus immunoglobulinowym, który w limfocytach B i plazmocytach jest wysoce aktywny transkrypcyjnie, c-„myc” zachowuje się, jakby był częścią tego locus i jego transkrypcja pięciokrotnie przekracza prawidłowe wartości. Należy pamiętać, że transkrypcja prawidłowego c-„myc” wiąże się z nabyciem kompetencji wzrostu [14, 90]. W wypadku bezustannej aktywacji c-„myc” komórka zostaje „unieśmiertelniona” i ciągle replikuje DNA, w przeciwieństwie do komórek prawidłowych, które cechuje ograniczona zdolność podziałów [169].

Jak to już powiedziano, samo „unieśmiertelnienie” komórki przez uaktywniony transkrypcyjnie „myc” nie wystarczy do wystąpienia pełnej transformacji nowotworowej. W rozwoju nowotworu bierze udział kilka genów, przy czym jest to proces wieloetapowy. Odkrycie, że w niektórych chłoniakach Burkitta obok „unieśmiertelniającego” „myc” występuje gen „transformujący” „Blym” [36], potwierdziło udział dwu genów w procesie onkogenezy, jaki ma miejsce w tych chłoniakach. „Blym” jest onkogenem, który został wykryty w pierwotnych, nie hodowanych komórkach chłoniaka Burkitta i w 6 liniach komórkowych wyprowadzonych z tego nowotworu, jak np. Raji i inne [cyt. wg 111]. „Blym” należy do genów takich, jak „myc”, „fos” lub „myb”, których produkty wiążą się z jądrem komórkowym [cyt. wg 81]. Wykazano częściową homologię (ok. 36%) między transformującym białkiem kodowanym przez „Blym” a końcem aminowym białek z grupy transferryn [68], przy czym transferryna wykazuje właściwości czynnika wzrostu dla limfocytów [40] i jak się wydaje, dla prekursorowych komórek hemopoetycznych. U człowieka „Blym” znajduje się w chromosomie 1, prążek p32 [126].

Natomiast w linii komórkowej Ramos, wyprowadzonej podobnie jak Raji z chłoniaka Burkitta, genem „transformującym” — onkogenem jest „N-ras” [cyt. wg 111] należący do rodziny genów „ras”, których produkty wiążą GTP [cyt. wg 81] i uczestniczą w wewnątrzkomórkowym układzie informacyjnym (trzecia grupa produktów kodowanych przez proto-onkogeny wg klasyfikacji przedstawionej na początku drugiej części artykułu. U człowieka „N-ras” został zlokalizowany w chromosomie 1 p22 [33, 57, 131]. W linii białaczkowej HL-60 występuje kooperacja między „myc” i „N-ras” [23]. A zatem w procesie transformacji uczestniczą co najmniej dwa onkogeny.

Translokacja (8; 14) poza endemicznym chłoniakiem Burkitta i nie-endemicznym chłoniakiem typu Burkitta występuje ponadto w ostrej

białaczce limfoblastycznej B komórkowej (zwłaszcza w typie L-3 „o komórce chłoniaka Burkitta”), w nie zróżnicowanym chłoniaku B komórkowym typu nie-Burkitta („small noncleaved transformed cell” wg klasyfikacji Lukesa i Collinsa) i w chłoniaku immunoblastycznym [cyt. wg 231].

Hayashi i wsp. [75] przedstawili dwa przypadki ostrej białaczki limfoblastycznej T komórkowej z translokacją (8; 14) (q24; q11). W prążku q11.2 chromosomu 14 znajduje się locus dla łańcucha alfa receptora komórek T [22, 26, 88]. Autorzy sugerują, że w locus ten zostaje przeniesiony c-„myc”, a zatem geny kodujące receptor komórek T odgrywałyby analogiczną rolę w patogenezie białaczek i chłoniaków T komórkowych jak locus immunoglobulinowy w rozwoju nowotworów B komórkowych. Należy tu dodać, że segmenty DNA kodujące receptor komórek T tworzą znacznie bardziej złożoną mozaikę niż te, które kodują immunoglobuliny. Obecnie przyjmuje się, że trzy rodziny genów ulegają rearanzacji podczas rozwoju somatycznego komórek T. Są to geny kodujące łańcuchy alfa, beta i gamma receptora komórek T, przy czym geny kodujące łańcuchy beta i gamma znajdują się w chromosomie 7 w prążkach p14 → p15 (łańcuch gamma) [132] i w prążkach q32 → q35 (łańcuch beta) [83, 125]. Loci dla łańcuchów alfa, beta i gamma są dobrymi kandydatami do złamań punktowych i translokacji chromosomowych.

Prawdopodobnie podobna do deregulacji „myc” deregulacja innych genów przez loci immunoglobulinowe występuje w przewlekłej białaczce limfatycznej B komórkowej z translokacją (11; 14) (q13.3; q32.3), a także w chłoniakach guzkowych (follicular lymphomas) z translokacją (14; 18) (q32.3; q21.3). Złamania punktowe chromosomów 11 i 18 znajdują się w obrębie krótkich segmentów (11q13.3 i 18q21.3), w których zidentyfikowano dwa nowe potencjalne onkogeny, nie wykazujące homologii z żadnym ze znanych v-„onc” retrowirusów, nazwane „bcl-1” i „bcl-2” (od „B-cell lymphoma/leukemia-1, -2”). Proto-onkogeny te znajdują się odpowiednio w prążku q13.3 chromosomu 11 („bcl-1”) i w prążku q21.3 chromosomu 18 („bcl-2”) [48, 211, 212, 213]. W następstwie translokacji zostają one połączone z locus dla części stałej łańcuchów ciężkich immunoglobulin, co prawdopodobnie wywołuje ich uaktywnienie i zapoczątkowuje proces transformacji nowotworowej (szczegółowe dane zob. [171]).

Dysponujemy przykładem wytwarzania hybrydowego białka w następstwie translokacji (9; 22) (q34.1; q11.21), która ma miejsce w przewlekłej białaczce szpikowej Ph<sup>1</sup> dodatniej (22q-), a także w Ph<sup>1</sup> dodatnich ostrych białaczkach limfoblastycznych, w ostrej białaczce bifenotypowej (gdzie obok limfoblastów występują w znamienym odsetku mieloblasty) i w ostrych białaczkach szpikowych [172]. W przewlekłej białaczce

szpikowej występuje fuzja c-„abl” z genem „bcr” (od „break-point cluster region”), który znajduje się w rejonie złamań punktowych w długich ramionach chromosomu 22 (chromosom Ph<sup>1</sup>) [70] (szczegółowe dane zob. [170]). C-„abl” należy do genów kodujących fosfokinazę tyrozynową, chociaż produkt prawidłowego c-„abl” nie wykazuje aktywności tej fosfokinazy (nieaktywny proenzym?). W przewlekłej białaczce szpikowej Ph<sup>1</sup>dodatniej c-„abl” z chromosomu 9 zawsze zostaje przemieszczony w delecyjne długie ramiona jednego z chromosomów 22 pary. Hybrydowy gen „abl”-„bcr” koduje nowy polipeptyd [97, 98], wykazujący podobnie jak produkt v-„abl” aktywność fosfokinazy tyrozynowej i prawdopodobnie indukujący transformację nowotworową. Co więcej, niedawno opisano przypadek przewlekłej białaczki szpikowej Ph<sup>1</sup>ujemnej z translokacją (9q+; 12q-) (q34; q21), w którym na chromosomie 12 doszło do fuzji genu „bcr” z chromosomu 22 i genu „abl” z chromosomu 9. A zatem w przewlekłej białaczce szpikowej Ph<sup>1</sup>ujemnej występowały takie same zmiany molekularne, jakie obserwowano w białaczce Ph<sup>1</sup>dodatniej. Powyższa publikacja wskazuje, że rearanżacja sekwencji „abl”-„bcr” ma znaczenie krytyczne w patogenezie przewlekłej białaczki szpikowej [5, 207]. Pugh i wsp. [152] wykazali, że pacjenci, u których początkowo rozpoznano przewlekłą białaczkę szpikową Ph<sup>1</sup>ujemną w istocie mieli zespół mielodysplastyczny.

Inne przykłady wskazujące na związek między leukemogenezą a zaburzeniami chromosomowymi pochodzą z obserwacji delecji pewnych chromosomów, względnie odwrotnie z podwojenia chromosomu poprzez rozdziwienie (trisomii), z czym może się wiązać podwójna dawka uaktywnionego c-„onc” [93].

Jeśli idzie o delecje, to jedną z częściej obserwowanych jest utrata albo całego chromosomu 5, albo części jego długich ramion (prążki od q13 do q33). Zaburzenie to występuje w ostrych białaczkach szpikowych rozwijających się de novo, w ostrych białaczkach szpikowych rozwijających się wtórnie w następstwie chemioterapii prowadzonej z powodu innej choroby nowotworowej oraz w niektórych zespołach mielodysplastycznych (niedokrwistość oporna na leczenie — refractory anemia, połączona z delecją długich ramion chromosomu 5) [107]. Ostatnio opisano delecję długich ramion chromosomu 5 ze złamaniem punktowym w prążku q35 w kilku przypadkach złośliwej histiocytozy [124]. W wypadku delecji 5q co najmniej dwa geny regulujące różnicowanie komórek prekursorowych w linię granulocytów-makrofagów są tracone. Są to geny „gm-csf” (5q23 → q32) i „fms” (5q33.2 → q33.3). Nie jest wykluczone, że utrata z chromosomu 5 krytycznej sekwencji DNA jest zasadnicza dla transformacji nowotworowej. Sugestia ta jest szczególnie interesująca w powiązaniu z innymi obserwacjami, w których wykazano, że zdolność

niektórych białaczek szpikowych do proliferacji istotnie łączy się ze zdolnością do wytwarzania CSF [73, 181]. U niektórych pacjentów złamanie punktowe na długich ramionach chromosomu 5 powoduje utratę wyłącznie „gm-csf”, pozostawiając locus „fms” nietknięty, co sugeruje że geny „gm-csf” i „fms” odgrywają w powyższych schorzeniach różne role. Nie można także wykluczyć udziału innych genów kodujących CSFs lub ich receptory, które mogą być zgrupowane w 5q, bądź też mogą to być geny kodujące białka o jeszcze innych czynnościach [107].

Trisomia chromosomu 8 jest jedną z najczęściej spotykanych nieprawidłowości chromosomowych, począwszy od względnie łagodnych zespołów mieloproliferacyjnych, do ostrych białaczek [163]. W chromosomie 8, poza znanym już c-„myc” (prążek q24.1), bardziej proksymalnie leży c-„mos” (prążek q22.1) [91, 134, 150]. C-„mos” jest homologiczny z v- $\Delta$  „env”-„mos” retrowirusa mięsaka Moloneya myszy (Moloney murine sarcoma virus, w skrócie M-MSV), który u zwierząt wywołuje mięsaki, a w hodowli transformuje fibroblasty [wg 46]. Onkogen „mos” koduje białko posiadające wspólne sekwencje z rodziną genów „src”, ale nie wykazujące aktywności fosfokinazy tyrozynowej [215]. Wydaje się, że współzależność między trisomią chromosomu 8 a leukemogenezą nie jest przypadkowa, zwłaszcza jeśli zostaną uwzględnione badania gryzoni. Mianowicie w nowotworach szczurów często występuje trisomia chromosomu 7 [110], a w białaczce myszy najczęstszą i niekiedy jedyną nieprawidłowością jest trisomia chromosomu 15 [93, 225, 226], przy czym c-„myc” u szczurów znajduje się w chromosomie 7 [199], a u myszy w chromosomie 15 [24].

Obok proto-onkogenów w chromosomach wykryto 17 miejsc dziedzicznie łamliwych (heritable fragile sites) [201]. Miejsca dziedzicznie łamliwe są niebarwiącymi się fragmentami chromosomów, obejmującymi zwykle obie chromatydy. Przypuszcza się, że odpowiadają one segmentom chromosomów, które nie uległy prawidłowemu zagęszczeniu (compaction) podczas mitozy [105]. Z 17 zidentyfikowanych miejsc dziedzicznie łamliwych 16 występuje w chromosomach autosomalnych, a jedno w chromosomie X. Ekspresja miejsc dziedzicznie łamliwych może mieć charakter wyrwy (gap), złamania (break) lub przemieszczenia (displacement) segmentu chromosomu. Ekspresja jest najlepiej widoczna w komórkach hodowanych w środowisku pozbawionym kwasu foliowego-tymidyny lub po ekspozycji na inhibitor syntetazy tymidylanowej, jak np. fluorodezoksyurydyna [cyt. wg 233]. Miejsca dziedzicznie łamliwe w całej populacji występują rzadziej niż w 0,2% przypadków [cyt. wg 233], przy czym najczęściej stwierdza się Xq28.1, z czym wiąże się jedna z form niedorozwoju umysłowego.

Osiem z siedemnastu znanych miejsc dziedzicznie łamliwych pozo-

staje w związku ze złamaniami punktowymi specyficznymi dla białaczek i nieziarniczych chłoniaków:

- miejsce dziedzicznie łamliwe w chromosomie 6p23 wiąże się z translokacją (6; 9) (p23; q34) spotykaną w ostrej białaczce mieloblastycznej przebiegającej z bazofilią [144];
- delecje chromosomu 7 występują we wszystkich typach ostrych białaczek szpikowych, a zwłaszcza w tzw. wtórnych ostrych białaczkach Nielimfatycznych rozwijających się w następstwie chemioterapii stosowanej z powodu innej choroby nowotworowej; w chromosomie 7 miejsce dziedzicznie łamliwe znajduje się w p11.2 [231, 233];
- miejsce dziedzicznie łamliwe w 8q22 wiąże się z t (8; 21) (q22; q22) występującą w ostrej białaczce mieloblastycznej z zachowanym dojrzewaniem [54, 162]; w 8q22 znajduje się także proto-onkogen „mos” homologiczny z v-„mos” M-MSV;
- miejsce dziedzicznie łamliwe w 9p22 wiąże się z t (9; 11) (p22; q23), która jest typowa dla ostrej białaczki mielomonocytovej (typ M-4) i monocytowej (typ M-5) [71];
- miejsca dziedzicznie łamliwe w chromosomie 11 w q13.3 i q23.3 pozostają w związku z translokacjami, jakie spotyka się w ostrych białaczkach szpikowych (typ M-4 i M-5), ostrej białaczce limfoblastycznej (typ L-2), przewlekłej białaczce limfatycznej i chłoniaku limfocytowym [71, 167, 208, 231];
- miejsce dziedzicznie łamliwe w 12q13.1 pozostaje w związku z obserwowaną przez Yunisa [231] t (12; 14) (q13; q32) u pacjenta z chłoniakiem T-komórkowym;
- miejsce dziedzicznie łamliwe w 16q22.1 łączy się zarówno z delecją 16 (q22), jak i z inwersją (jeszcze częścię) 16 (p13 i q22), która występuje w ostrej białaczce szpikowej typu M-4 [2, 104, 105, 231]. Jest interesujące, że niektórzy autorzy [105, 232] wykryli ekspresję miejsca dziedzicznie łamliwego w 16q22.1, w prawidłowych limfocytach pacjentów z ostrą białaczką szpikową typu M-4 i inwersją 16 (p13.1 i q22.1), co sugeruje, że ekspresja tego miejsca predysponuje do białaczki typu M-4.

Niezwykle istotne pozostaje pytanie, czy w miejscach dziedzicznie łamliwych znajdują się geny odgrywające istotną rolę w transformacji nowotworowej.

Inną intrygującą obserwacją jest odkrycie przez Yunisa i Sorenga [234] wielkiej rodziny, przechowywanych (conserved) podczas ewolucji, homozygotycznych miejsc konstytutywnie łamliwych (constitutive fragile sites). Miejsc takich wykryto 51. Są one precyzyjnie zlokalizowane w różnych chromosomach i znajdują się albo w złączu (junction) prążków Giemsa ujemnych i Giemsa dodatnich, albo w prążkach Giemsa



ujemnych, tuż przy złączu. Ekspresja miejsc konstytutywnie łamliwych staje się bardzo wyraźna, gdy komórki pozbawione tymidyny zostaną poddane działaniu kofeiny. Mechanizm działania kofeiny zwiększający ekspresję miejsc konstytutywnie łamliwych prawdopodobnie wiąże się z jej hamującym działaniem na naprawczy (repair) DNA w replikujących komórkach [31, 103].

Cztery z miejsc konstytutywnie łamliwych leżą w tych samych prążkach i podprążkach, co miejsca dziedzicznie łamliwe (prążki 9q32, 10q25.2, 11q23.3, i 16q22.1). Yunis i Soreng [234] sugerują, że miejsca dziedzicznie łamliwe powstają wskutek mutacji miejsc konstytutywnie łamliwych. W dwudziestu, ze znanych 51 miejsc konstytutywnie łamliwych, występują (bezpośrednio w samym miejscu lub tuż przy nim) złamania punktowe chromosomów, charakteryzujące różne białaczki, chłoniaki i kilka guzów litych.

Należy więc przyjąć, że różnorodne rearanżacje chromosomowe, jakie spotyka się w nowotworach, są spowodowane przemieszczalnymi (transposable) elementami genetycznymi. Przemieszczenia ich wywołują efekt kaskadowy i są przyczyną niestabilności genomu. Te przechowywane podczas ewolucji „słabe” punkty prawdopodobnie odpowiadają elementom regulacyjnym, które w nowotworach są masowo rozrywane [233].

W tab. 4 przedstawiono najczęściej spotykane w białaczkach zaburzenia chromosomowe i związane z nimi przemieszczenia znanych genów oraz c-„onc”, a także miejsca dziedzicznie i konstytutywnie łamliwe. Zastrzegamy jednak, że przyjęcie jedynie widocznych w tabeli współzależności byłoby zbyt dużym uproszczeniem leukemogenezy.

TABELA 4

## Charakterystyczne nieprawidłowości chromosomowe występujące

Rodzaj białaczki	Defekt chromosomowy	Złamanie punktowe lub delecja	% chorych
1	2	3	4
Przewlekła białaczka szpikowa Faza przewlekła	t (9; 22)	9q 34.1 i 22q 11.21 (Ph <sup>1</sup> 22q-)	85-100% [106]
Przełom blastyczny (Aberacje chromosomowe zwykle na 2-4 miesiący wyprzedzają objawy kliniczne przełomu blastycznego) [165]	t (9; 22) + Ph <sup>1</sup> i (17q) + 8 Aberacje chromosomowe występują wg przedstawionego porządku, ze zmniejszającą się częstotliwością [106]	9q 34.1 i 22q 11.21	20% 80% [106] Ok. 80% chorych wykazuje jedną z trzech nieprzypadkowych aberracji, które Mitelman i Levan [123] nazywają „główną drogą ewolucyjną kariotypu”
Ostra białaczka mieloblastyczna bez tendencji do dojrzewania (typ M-1)	t (9; 22)	9q 34.1 i 22q 11.21	Chromosom Ph <sup>1</sup> występuje w ok. 3% przypadków ostrych białaczek szpikowych [146]
Ostra białaczka mieloblastyczna z tendencją do dojrzewania (typ M-2)	t (8; 21) Translokacji tej często towarzyszy utrata chromosomów płciowych: - Y (85% mężczyzn) - X (73% kobiet) 7% z t (8; 21) należy do typu M-4 [56]	8q 22.1 i 21q 22.3	10% [106]
Ostra białaczka promielocytowa (typ M-3)	t (15; 17)	15q 22 i 17q 21	70% [106]

w białaczkach i związane z nimi przemieszczenia znanych genów

Geny komórkowe włączone w defekt chromosomowy

5

W miejscu punktowego złamania w chromosomie 9q34.1 leży c-,abl<sup>a</sup> [6, 65, 76].  
 W miejscu punktowego złamania w chromosomie 22q11.21 leży gen „bcr<sup>b</sup>” [70].  
 Wskutek t(9; 22) w długich ramionach chromosomu 22 dochodzi do fuzji „abl” z „bcr”.  
 Hybrydowy gen „abl”-„bcr” koduje nowy polipeptyd o właściwościach zbliżonych do produktu transformującego v-„abl” wirusa białaczki Abelsona myszy [97, 98].  
 Ponadto w chromosomie 22 bardziej dystalnie od miejsca punktowego złamania (22q12.2→q13.1) leży c-,sis<sup>c</sup> (29, 202, 234).

W chromosomie 17q11→q21 leży c-,erb-A<sup>d</sup> [184]

W chromosomie 8 znajdują się dwa c-,onc<sup>e</sup>:

- c-,mos<sup>e</sup> – 8q22 [91, 134, 150]
- c-,myc<sup>f</sup> – 8q24.1 [27, 134, 206, 234]

Jak w fazie przewlekłej białaczki szpikowej

W miejscu punktowego złamania w chromosomie 8q22.1 znajdują się:

- miejsce dziedzicznie łamliwe (dokładnie 8q22.3) [54, 162, 234]
- miejsce konstytutywnie łamliwe [234]
- c-,mos<sup>g</sup>.

Bardziej dystalnie w chromosomie 8 (prążek p24.1) leży c-,myc<sup>h</sup>.

W miejscu punktowego złamania w chromosomie 21q22.3 leży c-,ets-2<sup>g</sup> (dokładnie 21q22.1→→q22.3) [218]. Ponadto uważa się, że rejon 21q22 ma znaczenie w zespole Downa (+21) [cyt. wg 176].

Podczas t(8; 21) „mos<sup>g</sup>” pozostaje w chromosomie 8q-, zaś „myc<sup>h</sup>” zostaje przeniesiony w chromosom 21q+ [38]. Z drugiej strony w 8q- zostaje przeniesiony fragment c-,ets<sup>g</sup>-2 [176]

W miejscu punktowego złamania w chromosomie 17q21 leżą:

- gen p53<sup>h</sup> (dokładnie 17q21→22) [108]
- zaś nieco bardziej proksymalnie od miejsca punktowego złamania – c-,erb-A<sup>i</sup> (dokładnie 17q11→q21)

Podczas t(15; 17) gen p53 zostaje przeniesiony w chromosom 15 (15q+), ale „erb-A<sup>i</sup>” pozostaje w chromosomie 17q-. Badania kompleksowych translokacji ujawniły, że w chromosomie 15q+ znajduje się krytyczne złącze (critical junction), a zatem przeniesiony w chromosom 15, gen p53 będzie odgrywał istotną rolę w transformacji prawidłowych komórek szpikowych, w komórki białaczkowe zatrzymane w dojrzewaniu na etapie promielocyta [108].

1	2	3	4
Ostra białaczka mielo-monocytowa (typ M-4)	inwersja (inv), lub delecja (del) chromosomu 16 M-4 z del (16) często przebiega z eozynofilią w szpiku [2, 56, 104]	inv (16) (p 13.2 i q 22) del (16) (q 22)	25% [106]
Typ M-4 i ostra białaczka monocytowa (typ M-5)	t (9; 11)  t (11q) del (11q)	9p21, lub p22 11q23→q24 (najczęściej) 11q13→q14 (rzadziej) [56]	10% [106]
Typ M-1, M-2, M-3, M-4, M-5 i erytroleukemia (typ M-6)	del (5q)  del (7)  del (5) i del (7) są zwłaszcza charakterystyczne dla wtórnych białaczek szpikowych po chemioterapii  +8	5q13→q15 (złamania proksymalne) 5q31→q35 (złamania dystalne) [107]  7p11.2, lub p22 7q31.2, lub q36.3 [234]  2	6% [56]  12% [106]  25% [106]

tab. 4

5

W chromosomie 16 w p12.3 i q22.1 leżą dwa miejsca dziedzicznie łamliwe, które w sposób nieprzypadkowy korespondują z inv (16), lub del (16) w ostrej białaczce M-4 [2, 104]. Co więcej, miejsce dziedzicznie łamliwe w 16q22.1 pokrywa się z miejscem konstytutywnie łamliwym [234].

W pobliżu miejsca punktowego złamania w chromosomie 9 p22 znajdują się:

- miejsce dziedzicznie łamliwe (dokładnie 9p21.3) [71]
- rodzina genów interferonu<sup>1</sup> (IFN-y alfa i IFN beta-1) (dokładnie 9p 13→p24) [142, 191, 209].

W chromosomie 11 w q13.3 i q23.3 leżą dwa miejsca dziedzicznie łamliwe [71, 167, 208]. Co więcej, miejsce dziedzicznie łamliwe w 11q23.3 pokrywa się z miejscem konstytutywnie łamliwym. Nic więc dziwnego, że w 11q23.3 występują złamania punktowe w różnych typach białaczek.

- t (9; 11) (p23; q23) w białaczkach typu M-4 i M-5
- t (4; 11) (q21; q23) w białaczce typu L-2 (patrz dalej).

Ponadto w pobliżu miejsca punktowego złamania w 11q23 znajduje się c-„ets-1” (dokładnie 11q23→q24) [35].

Podczas t (9; 11) c-„ets-1” zostaje przeniesiony z chromosomu 11 w krótkie ramiona chromosomu 9 w sąsiedztwo genów interferonu [37].

W miejscu punktowego złamania w chromosomie 5q31 (spotykanego w del (5q)) znajdują się:

- miejsce konstytutywnie łamliwe [234]
- gen „gm-csf”<sup>j</sup> (dokładnie 5q23→q32), który jest zawsze tracony w del (5q) [107]
- bardziej dystalnie od 5q31, leży c-„fms”<sup>k</sup> (dokładnie 5q33.2→q33.3), który jest tracony w części przypadków del (5q) [107]

W chromosomie 7 w p11.2, a więc w miejscu punktowego złamania (spotykanego w del (7p)) leży miejsce dziedzicznie łamliwe [105]. Co więcej w chromosomie 7 znajduje się jeszcze 5 miejsc konstytutywnie łamliwych, przy czym lokalizacja dwu (7p22.2 i 7q31.2) koresponduje z miejscami złamań punktowych [234].

Ponadto w chromosomie 7 znajdują się:

- c-„erb-B” – 7p13→q22 [196]
- locus dla receptora EGF<sup>1</sup> – 7p13→q22 [96]
- locus dla łańcucha gamma receptora komórki T – 7p14→p15 [132], przy czym jego położenie pokrywa się z miejscem konstytutywnie łamliwym (7p14.2) [234]
- locus dla łańcucha beta receptora komórki T – 7q32→q35 [83, 125], ponadto w 7q32.3 znajduje się miejsce konstytutywnie łamliwe [234]

W chromosomie 8 znajdują się dwa c-„onc”:

- c-„mos” – 8q22
- c-„myc” – 8q24.1

1	2	3	4
Przewlekła białaczka limfatyczna	+12  t(11; 14)	11q13.3 i 14q32.3	
Ostra białaczka mikro-limfoblastyczna (typ L-1)	t(9; 22)	9q34.1 i 22q11.21	12% (Dane dla wszystkich typów ostrych białaczek limfoblastycznych) [106]
Ostra białaczka mikro-makro-limfoblastyczna (typ L-2)	t(9; 22)  t(4; 11) Sugeruje się, że białaczki ze złamaniem punktowym w 11q23, jakie występuje zarówno w białaczkach typu M-4 i M-5, jak i w L-2 tworzą jedną grupę, przy czym proliferuje wielopotencjalna komórka macierzysta. Proliferyjace komórki cechuje zmienność morfologiczna i immunologiczna (bądź komórki limfoidalne typu „nie-T, nie-B”, bądź pre-B, lub T, względnie typu komórek monocytoidalnych, albo komórek bifenotypowych noszących cechy linii limfoidalnej i mieloidalnej). Być może za tę zmienność morfologiczną i feno-	9q34.1 i 22q11.21  4q21 i 11q23	5% (Dane dla wszystkich typów ostrych białaczek limfoblastycznych) [106]

tab. 4

5

W chromosomie 12 znajdują się:

- c-„Ki-ras-2”<sup>1</sup> – 12p12.1 i q24.2 [86, 141, 175, 178, 234]
- IGF<sup>m</sup> – 12p22→do końca [11, 210].

W omówionym już częściowo, przy okazji białaczek typu M-4 i M-5 chromosomie 11, miejscu punktowego złamania w prążku q13.3 znajdują się:

- jedno z dwu miejsc dziedzicznie łamliwych [71, 167, 208]
- gen „bcl-1”<sup>n</sup> [211, 212, 213].

W miejscu punktowego złamania w chromosomie 14q32.3 leży locus dla części stałej łańcuchów ciężkich immunoglobulin.

Podczas t(11; 14) „bcl-1” zostaje przeniesiony z chromosomu 11 w locus immunoglobulinowy w chromosomie 14, co prawdopodobnie wywołuje aktywację „bcl-1” i zapoczątkowuje proces transformacji [171].

Jak w fazie przewlekłej białaczki szpikowej.

Jak w fazie przewlekłej białaczki szpikowej.

W chromosomie 4 w pobliżu miejsca punktowego złamania znajdują się:

- locus dla EGF<sup>o</sup> – 4p21→do końca [11]
- locus dla TCGF (IL-2)<sup>p</sup> – 4q26→q28 [183].

W omawianym już, przy okazji białaczek typu M-4 i M-5 oraz przewlekłej białaczki limfatycznej, chromosomie 11; w miejscu punktowego złamania w prążku q23 znajduje się:

- jedno z dwu miejsc dziedzicznie łamliwych,
- miejsce konstytutywnie łamliwe,
- c-„ets-1” (dokładnie 11q23→q24).

Podczas t(4; 11) c-„ets-1” (cały, lub jego fragment) zostaje przeniesiony z chromosomu 11 w 4q- [176] prawdopodobnie w sąsiedztwo genów dla EGF i TCGF.





tab. 4

5

W miejscu punktowego złamania w chromosomie 8q24.1 znajdują się:

- miejsce konstytutywnie łamliwe [234]
- c-„myc”.

W miejscu punktowego złamania w chromosomie 14q32.3 znajduje się locus dla części stałej łańcuchów ciężkich immunoglobulin.

Podczas t(8; 14) c-„myc” zostaje przeniesiony z chromosomu 8 w locus immunoglobulinowy chromosomu 14, co wywołuje aktywację transkrypcyjną tego proto-onkogenu [169].

Uważa się, że wszystkie ostre białaczki limfoblastyczne B komórkowe przebiegają z 14q+, chociaż nie zawsze musi istnieć t(8; 14) [106]. Ponadto w chromosomie 14 w prążku q11.2 znajduje się locus dla łańcucha alfa receptora komórek T [22, 26, 88]. W ostrej białaczce limfoblastycznej T komórkowej złamanie punktowe występuje w obrębie tego locus [49]

zynowej, który odpowiada okrojonej (cytoplazmatycznej) części receptora dla czynnika wzrostu naskórka [44] i jak powiedziano transformuje erytroblasty. Jednakże gdy działa tylko sam v-„erb-B”, stransformowane komórki wykazują tendencję do spontanicznego dojrzewania, co w konsekwencji opóźnia rozwój białaczki. Natomiast v-„erb-A” potęguje transformujące działanie v-„erb-B” hamując dojrzewanie erytroblastów na wczesnych etapach różnicowania [58, 112, 182, 214, 228, 229]. Nasuwa się więc pytanie, jaki jest mechanizm tego działania? Być może klucz do rozwiązania leży w badaniach nad strukturą v-„erb-A”. Produkt kodowany przez v-„erb-A” ma pewne sekwencje wspólne zarówno z ludzkimi receptorami dla glikokortykoidów [78a, 220], jak i z receptorami dla estrogenów [68a, 69a]. Zakłada się, że produkt proto-onkogenu c-„erb-A” odgrywa jakąś rolę w różnicowaniu linii erytroblastycznej, natomiast onkogen v-„erb-A” anuluje jego fizjologiczne działanie. Jak się wydaje produkt kodowany przez v-„erb-A” działa podobnie jak zmutowane receptory dla glikokortykoidów, do których zresztą jest uderzająco podobny strukturalnie.

Wyróżnia się dwa rodzaje mutantów receptorów dla glikokortykoidów. Pierwsze tzw. „mutanty zwiększające transfer jądrowy” — mutanty nt<sup>+</sup> (od „increased nuclear transfer” — nazwa odzwierciedla zwiększone powinowactwo do jądra komórkowego) wiążą się zarówno z podstawnikiem (ligand), jak i z DNA, ale nie wywołują żadnej odpowiedzi fizjologicznej. Można więc założyć, na podstawie podobieństw

strukturalnych, że białko kodowane przez v-„erb-A” zajmuje miejsce w DNA, na które w warunkach fizjologicznych działa produkt c-„erb-A” i zapobiega aktywacji genów odgrywających rolę w różnicowaniu linii erytroblastów. Natomiast drugi rodzaj zmutowanych receptorów glikokortykoidowych tzw. mutanty nt<sup>-</sup> (wiążą glikokortykoidy, lecz nie posiadają zdolności wiązania się z DNA, co w rezultacie daje taki sam efekt jak w przypadku mutantów nt<sup>+</sup>. Produkt v-„erb-A” wykazuje także podobieństwo strukturalne do mutantów nt<sup>-</sup> [9a].

e c-„mos” homologiczny z v-Δ„gag”-Δ„env”-„mos” retrowirusa mięsaka Moloneya myszy [61]. „mos” i kodowany przez niego produkt zostały omówione wcześniej.

f c-„myc” homologiczny z v-Δ„gag”-„myc”-Δ„env” retrowirusa mielocytomatozy ptaków MC 29 [61]. „myc” i kodowany przez niego produkt zostały omówione wcześniej (patrz tab. 1).

g c-„ets”. Retrowirus mieloblastozy i erytroblastozy ptaków E 26, jak to powiedziano, posiada dwa onkogeny „myb” i „ets”. Struktura genomu E 26 przedstawia się następująco: v-Δ„gag”-„myb”-„ets”-Δ„env” [61] (patrz tab. 1). Jeśli idzie o patogenność, to E 26 charakteryzują co najmniej dwie dodatkowe cechy, których nie posiada retrowirus mieloblastozy ptaków dysponujący tylko onkogenem „myb”. Po pierwsze: E 26 u ptaków wywołuje zarówno mieloblastozę, jak i erytroblastozę, a in vitro transformuje erytroblasty i mieloblasty [45]. Po drugie: mieloblasty transformowane przez E 26 mają całkowicie zablokowane dojrzewanie i nie udaje się wywołać ich dalszego różnicowania żadnym ze znanych induktorów [cyt. wg 161a]. Wirusowemu „ets” w ludzkim genomie (a także u myszy i kotów) odpowiadają dwa różne loci nazwane „ets-1” i „ets-2” [218, 219]. U człowieka c-„ets-1” i c-„ets-2” znajdują się odpowiednio w chromosomach 11q23→q24 [35] i 21q22.1→q22.3 [218]. Specyficzne chromosomowe nieprawidłowości dotyczące 11q23→24 takie jak: obustronne translokacje, delecje, wtrąceniewe odwrócenie (inverted insertions) i HSRs występują: w ostrych białaczkach szpikowych typu M-4 i M-5 [37, 96a, 122a, 161a, 166, 231], w zespołach mielodysplastycznych [52a, 155a], w ostrej białaczce limfoblastycznej typu L-2 i w chłoniaku limfocytowym [96a, 122a, 161a, 176, 231]. Dane te wskazują, że c-„ets-1” uczestniczy zarówno w proliferacjach hemo-, jak i limfopoetycznych.

h Gen p53. Białko kodowane przez komórkowy gen p53 jest fosfoproteiną o krótkim półokresie trwania (t<sub>1/2</sub>). Podwyższony poziom p53 wykryto w komórkach transformowanych przez różne czynniki, jak np. wirusy, środki chemiczne i energię jonizującą [34, 102, 113, 160, 161]. Szereg publikacji wiąże p53 z proliferacją komórek [116, 120, 121, 180], działaniem „unieśmiertelniającym” komórki w warunkach „in vitro” [85] i uwrażliwiającym je na transformację indukowaną przez onkogeny „ras” [47, 85, 143].

i Geny interferonów (IFN-ów) kodują białka o właściwościach antywirusowych, antynowotworowych i immunomodulacyjnych [41, 42, 99, 100]. Na poziomie molekularnym IFN-y hamują w komórkach docelowych ekspresję niektórych c-„onc”. I tak np. po ekspozycji na IFN-y alfa lub beta, komórek linii Daudi (wyprowadzonej z chłoniaka Burkitta) 5-7-krotnie zmniejsza się transkrypcja c-„myc” [46, 87].

j Gen „gm-csf” koduje czynnik pobudzający wytwarzanie kolonii granulocytów, granulocytów-makrofagów i makrofagów (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, w skrócie GM-CSF) [80]. Czynniki pobudzające wytwarzanie kolonii (colony-stimulating factors, w skrócie CSF-s) są konieczne dla wzrostu i dojrzewania ukierunkowanych komórek mielopoetycznych.

k c-„fms” homologiczny z v-Δ„gag”-„fms”-Δ„env” retrowirusa mięsaka McDonougha kotów [61]. „fms” i jego produkt zostały omówione wcześniej (patrz tab. 3).

<sup>l</sup> Receptor dla EGF — receptor dla czynnika wzrostu naskórka (epidermal growth factor, w skrócie EGF), składa się z trzech części: pierwszej — która wystaje poza komórkę i posiada miejsce wiążące EGF, drugiej — osadzonej w błonie komórkowej i trzeciej — znajdującej się w cytoplazmie komórki. Ta trzecia cytoplazmatyczna część receptora wykazuje aktywność fosfokinazy tyrozynowej [20] i jest homologiczna z produktem v-„erb-B” [44]. Sugeruje się [153], że prekursor dla EGF pełni podwójną rolę: prekursora EGF i prekursora receptora dla EGF.

<sup>ł</sup> c-„Ki-ras-2” homologiczny z v-„ras” retrowirusa mięsaka Kirstena szczurów. Retrowirus ten ma podobne właściwości, co wcześniej omówiony retrowirus mięsaka Harveya szczurów.

<sup>m</sup> IGF-I — I czynnik wzrostu insulino-podobny (insulin-like growth factor I, w skrócie IGF-I), wraz z insuliną i IGF-II jest członkiem białek z rodziny insulin [79], które działają jako autokrynowe regulatory proliferacji [210]. IGF-I aktywuje fosfokinazę tyrozynową w podobny sposób jak inne mitogeny [84, 168] i onkogeny z rodziny „src” [8, 151]. IGF-I jest wytwarzany przez ludzkie fibroblasty stymulowane hormonem wzrostu lub PDGF. Z drugiej strony wywołana hormonalnie sekrecja IGF przez ludzkie fibroblasty uwrażliwia je na działanie PDGF [17].

<sup>n</sup> Gen „bcl-1” od „B-cell lymphoma/leukemia-1” jest proto-onkogenem komórkowym i został omówiony wcześniej.

<sup>o</sup> EGF — czynnik wzrostu naskórka. Jego czynność fizjologiczna nie jest dokładnie poznana, wiadomo jednak, że wywołuje wzrost komórek naskórka i ich keratynizację [205].

<sup>p</sup> TCGF — czynnik wzrostu limfocytów T (human T-lymphocyte growth factor) lub interleukina-2 (IL-2) jest glikoproteiną o małej masie cząsteczkowej (15.000) uwalnianą przez komórki T typu pomocniczego, po stymulacji lektyną lub antygenem. Pod wpływem TCGF inne subpopulacje komórek T syntetyzują specyficzne receptory i proliferują [173]. Farrar i Anderson [52] wykazali, że po związaniu TCGF ze specyficznym receptorem występuje uaktywnienie fosfokinazy tyrozynowej zlokalizowanej na wewnątrzkomórkowej powierzchni błony. Sugeruje się, że zaburzona ekspresja receptora dla TCGF może przyczyniać się do leukemogenezy [cyt. wg 195].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABELSON, H. T., RABSTEIN, L. S., Lymphosarcoma: Virus-induced thymic-independent disease in mice, *Cancer Res.*, **30**: 2213 - 2222, 1970.
- [2] ARTHUR, D. C., BLOOMFIELD, C. D., Partial deletion of the long arm of chromosome 16 and bone marrow eosinophilia in acute nonlymphocytic leukemia. A new association, *Blood*, **61**: 994 - 998, 1983.
- [3] BALTIMORE, D., ROSENBERG, N., WITTE, O. N., Transformation of immature lymphoid cells by Abelson murine leukemia virus, *Immunol. Rev.*, **48**: 3 - 22, 1979.
- [4] 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.
- [5] BARTRAM, C. R., deKLEIN, A., GROSVELD, G., c-„abl” and „bcr” rearrangement in Ph<sup>1</sup>-negative CML, [w:] *Leukemia: Recent Adv. Biol. Treat.*, red. R. P. Gale, D. W. Golde. Alan R. Liss, Inc. 41 - 48, 1985.

- [6] BARTRAM, C. R., deKLEIN, A., HAGEMEIJER, A., von AGTHOVEN, T., van KESSEL, A. G., BOOTSMA, D., GROSVELD, G., FERGUSON-SMITH, A., DAVIES, T., STONE, M., HEISTERKAMP, N., STEPHENSON, J. R., GROFFEN, J., Translocation of c-,abl" oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia, *Nature*, **306**, 277 - 280, 1983.
- [7] BECKNER, S. K., HATTORI, S., SHIH, T. Y., The „ras" oncogene product p21 is not a regulatory component of adenylate cyclase, *Nature*, **317**: 71 - 72, 1985.
- [8] BISHOP, J. M., Cellular oncogenes and retroviruses, *Annu. Rev. Biochem.*, **52**: 301 - 354, 1983.
- [9] BISHOP, J. M., Viruses, genes and cancer, *The Harvey Lectures, Series 78*: 137 - 171, 1984.
- [9a] BISHOP, M., Oncogene as hormone receptors, *Nature*, **321**: 112 - 113, 1986.
- [10] BOURNE, H. R., Yeast RAS and tweedledee's logic, *Nature*, **317**: 16 - 17, 1985.
- [11] BRISSENDEN, J. E., ULLRICH, A., FRANCKE, U., Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor, *Nature*, **310**: 781 - 784, 1984.
- [12] BURGESS, A. W., CAMAKARIS, J., METCALF, D., Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung conditioned medium, *J. Biol. Chem.*, **252**: 1998 - 2003, 1977.
- [13] BURGESS, A. W., METCALF, D., Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells, *Int. J. Cancer*, **26**: 647 - 654, 1980.
- [14] CAMPISI, J., GRAY, H. E., PARDEE, A. B., DEAN, M., SONENHEIN, G. E., Cell-cycle control of c-,myc" but not c-,ras" expression is lost following chemical transformation, *Cell*, **36**: 241 - 247, 1984.
- [15] CHAMPLIN, R. E., GOLDE, D. W., Chronic myelogenous leukemia: Recent advances. *Blood*, **65**: 1039 - 1047, 1985.
- [16] CHEN, J. H., Expression of endogenous avian myeloblastosis virus information in different chicken cells, *J. Virol.*, **36**: 162 - 170, 1980.
- [17] CLEMMONS, D. R. UNDERWOOD, L. E., Van WYK, J. J., Hormonal control of immunoreactive somatomedin production by cultured human fibroblasts, *J. Clin. Invest.*, **67**: 10 - 19, 1981.
- [18] CLEMMONS, D. R., Van WYK, J. J., Somatomedin-C and platelet-derived growth factor stimulate human fibroblast replication, *J. Cell Physiol.*, **106**: 361 - 368, 1981.
- [19] 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.
- [20] COHEN, S., CARPENTER, G., KING, L. Jr., Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity, *J. Biol. Chem.*, **255**: 4834 - 4842, 1980.
- [21] COLL, J., SAULE, S., MARTIN, P., RAES, M. B., LAGROU, C., GRAF, T., BEUG, H., SIMON, I. E., STEHELIN, D., The cellular oncogenes c-,myc", c-,myb" and c-,erb" are transcribed in defined types of avian hematopoietic cells, *Exp. cell Res.*, **149**: 151 - 162, 1983.
- [22] COLLINS, M. K. L., GOODFELLOW, P. N., SPURR, N. K., SOLOMON, E.,

- TANIGAWA, G., TONEGAWA, S., OWEN, M. J., The human T-cell receptor alpha-chain gene maps to chromosome 14, *Nature*, **314**: 273 - 274, 1985.
- [23] COLLINS, S. J., GROUDINE, M., Amplification of endogenous „myc”-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line, *Nature*, **298**: 679 - 681, 1982.
- [24] CORY, S., GERONDAKIS, S., ADAMS, J. M., Interchromosomal recombination of the cellular oncogene c-„myc” with the immunoglobulin heavy chain locus in murine plasmocytomas in a reciprocal exchange, *EMBO J.*, **2**: 697 - 703, 1983.
- [25] CROCE, C. M., ERIKSON, J., AR-RUSHDI, A., ADEN, D., NISHIKURA, K., Translocated c-„myc” oncogene of Burkitt lymphoma is transcribed in plasma cells and repressed in lymphoblastoid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 3170 - 3174, 1984.
- [26] CROCE, C. M., ISOBE, M., PALUMBO, A., PUCK, J., MING, J., TWEARDY, D., ERIKSON, J., DAVIS, M., ROVERA, G., Gene for alpha-chain of human T-cell receptor: Location on chromosome 14 region involuted in T-cell neoplasms, *Science*, **227**: 1044 - 1047, 1985.
- [27] 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.
- [28] DALLA-FAVERA, R., FRANCHINI, G., MARTINOTTI, S., WONG-STAAAL, F., GALLO, R. C., CROCE, C. M., Chromosomal assignment of the human homologues of feline sarcoma virus and avian myeloblastosis virus „onc” genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 4714 - 4717, 1982.
- [29] DALLA-FAVEA, R., GALLO, R. C., GIALLONGO, A., CROCE, C. M., Chromosomal localization of the human homolog (c-„sis”) of the simian sarcoma virus „onc” gene, *Science*, **218**: 686 - 688, 1982.
- [30] DALLA-FAVERA, R., WONG-STAAAL, F., GALLO, R., „onc” gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient, *Nature*, **299**: 61 - 63, 1982.
- [31] DAS, S. K., LAU, C. C., PARDEE, A. B., Inhibition and recovery of the rate of DNA synthesis in V 79 Chinese hamster cells following ultraviolet light irradiation. Variation in the rate of movement of the replication fork (MTR 06029), *Mutat. Res.*, **131**: 71 - 81, 1984.
- [32] DEBIUIRE, B., HENRY, C., BERNISS, M., BISERTE, G., CLAVERIE, J. M., SAULE, S., MARTIN, P., STEHELIN, D., Sequencing the „erb-A” gene of avian erythroblastosis virus, reveals a new type of oncogene, *Science*, **224**: 1456 - 1459, 1984.
- [33] DeMARTINVILLE, B., CUNNINGHAM, J. M., MURRAY, M. J., FRANCKE, U., The N-„ras” oncogene assigned to the short arm of human chromosome 1, *Nucleic Acid Res.*, **11**: 5267 - 5275, 1983.
- [34] DeLEO, A. B., JAY, G., APPELLA, E., DUBOIS, G. C., LAW, L. W., OLD, L. J., Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 2420 - 2424, 1979.
- [35] DeTAISNE, C., GEGONNE, A., STEHELIN, D., BERNHEIM, A., BERGER, R., Chromosomal localization of the human proto-oncogene c-„ets”, *Nature*, **310**: 581 - 583, 1984.
- [36] DIAMOND, A., COOPER, G. M., RITZ, J., LANE, M.-A., Identification and

- molecular cloning of the human „Blym” transforming gene activated in Burkitt's lymphomas, *Nature*, **305**: 112 - 116, 1983.
- [37] DIAZ, M. O., LeBEAU, M. M., PITHA, P., ROWLEY, J. D., Interferon and c-,ets-1” genes in the translocation (9; 11) (p 22; q 23) in human acute monocytic leukemia, *Science*, **231**: 265 - 267, 1986.
- [38] DIAZ, M. O., LeBEAU, M. M., ROWLEY, J. D., DRABKIN, H. A., PATTERSON, D., The role of the c-,mos” gene in the 8; 21 translocation in human acute myeloblastic leukemia, *Science*, **229**: 767 - 769, 1985.
- [39] 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.
- [40] DILLNER-CENTERLIND, M. L., HAMMARSTROM, S., PERLMANN, P., Transferrin can replace serum for „in vitro” growth of mitogen-stimulated lymphocytes-T, *Eur. J. Immunol.*, **9**: 942 - 948, 1979.
- [41] DMOSZYŃSKA-GIANNOPOULOU, A., RUPNIEWSKA, Z. M., Interferon: Fakty i nadzieje. I. Właściwości interferonu, *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **66**: 303 - 306, 1981.
- [42] DMOSZYŃSKA-GIANNOPOULOU, A., RUPNIEWSKA, Z. M., Interferon: Fakty i nadzieje. II. Leczenie interferonem, *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **66**: 307 - 311, 1981.
- [43] DOOLITTLE, R. F., HUNKAPILLER, M. W., HOOD, L. E., DEVARE, S. G., ROBBINS, K. C., AARONSON, S. A., ANTONIADES, H. N., Simian sarcoma „onc” gene, v-,sis”, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor, *Science*, **221**: 275 - 277, 1983.
- [44] 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.
- [45] DUESBERG, P. H., Retroviral transforming genes in normal cells?, *Nature*, **304**: 219 - 225, 1983.
- [46] EINAT, M., RESNITZKY, D., KIMCHI, A., Close link between reduction of c-,myc” expression by interferon and G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest, *Nature*, **313**: 597 - 600, 1985.
- [47] ELIYAHU, D., RAZ, A., GRUSS, P., GIVOL, D., OREN, M., Participation of p 53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells, *Nature*, **312**: 646 - 649, 1984.
- [48] ERIKSON, J., FINAN, J., TSUJIMOTO, Y., NOWELL, P. C., CROCE, C. M., The chromosome 14 breakpoint in neoplastic B cells with the t (11; 14) translocation involves the immunoglobulin heavy chain locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 4144 - 4148, 1984.
- [49] ERIKSON, J., WILLIAMS, D. L., FINAN, J., NOWELL, P. C., CROCE, C. M., Locus of the alpha-chain of T-cell receptor is split by chromosome translocation in T-cell leukemias, *Science*, **229**: 784 - 786, 1985.
- [50] EVA, A., PIERCE, J., AARONSON, S. A., Interaction of oncogenes with hematopoietic cells, [w] *Leukemia: Recent Adv. Biol. Treat*, red. R. P. Gale i D. W. Golde, Alan R. Liss, Inc., 3 - 15, 1985.
- [51] EVAN, G., Growth factors, receptors and oncogenes, *Trends Genet.*, **2**: 2 - 3, 1986.
- [52] FARRAR, W. L., ANDERSON, W. B., Interleukin-2 stimulates association of protein kinase C with plasma membrane, *Nature*, **315**: 233 - 235, 1985.

- [52a] FEDER, M., FINAN, J., BESA, E., NOWELL, P., A 2p; 11q chromosome translocation in dysmyelopoietic preleukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **15**: 143 - 150, 1985.
- [53] FERRARI, S., SELLERI, L., MORETTI, L., VENTURELLI, D., DONELLI, A., NARNI, F., CECCHERELLI, G., TORELLI, G., TORELLI, U., Transcripts of c-fos oncogene are present at detectable levels in total cellular RNA of human myeloid but not lymphoid normal and neoplastic cells, [w] „Retroviruses and human pathology” *Experimental Biology and Medicine*, red. R. C. Gallo, D. Stehelin, O. E. Varnier, Humana Press Inc (Clifton), 525 - 532, 1985.
- [54] First International Workshop on Chromosomes in Leukemia: Chromosomes in acute nonlymphocytic leukaemia, *Brit. J. Haemat.*, **39**: 311 - 316, 1978.
- [55] FORCHHAMMER, J., Leukemia, growth factors and oncogenes, *Leuk. Res.*, **8**: 161 - 163, 1984.
- [56] Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia: A prospective study of acute nonlymphocytic leukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **11**: 249 - 360, 1984.
- [57] FRANCKE, U., DeMARTINVILLE, B., COUSSENS, L., ULLRICH, A., The human gene for the beta subunit of nerve growth factor is located on the proximal short arm of chromosome 1, *Science*, **222**: 1248 - 1251, 1983.
- [58] FRYKBERG, L., PALMIERI, S., BEUG, H., GRAF, T., HAYMAN, M. J., VENNSTRÖM, B., Transforming capacities of avian erythroblastosis virus mutants deleted in the „erb-A” or „erb-B” oncogenes, *Cell*, **32**: 227 - 238, 1983.
- [59] FURTH, M. E., DAVIS, L. J., FURDELYS, B. M., SCOLNICK, E. M., Monoclonal antibodies to the p21 products of the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus and of the cellular „ras” gene family, *J. Virol.*, **43**: 294 - 304, 1982.
- [60] GALLAGHER, R., COLLINS, S., TRUJILLO, J., McCredie, K., AHEARN, M., TSAI, S., METZGAR, R., AULAKH, G., TING, R., RUSCETTI, F., GALLO, R., Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia, *Blood*, **54**: 713 - 733, 1979.
- [61] GALLO, R. C., WONG-STAAAL, F., Retroviruses as etiologic agents of some animal and human leukemias and lymphomas and as tools for elucidating the molecular mechanism of leukemogenesis, *Blood*, **60**: 545 - 557, 1982.
- [62] GASSON, J. C., WEISBART, R. H., KAUFMANN, S. E., CLARK, S. H., HEWICK, R. M., WONG, G. G., GOLDE, D. W., Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Direct action of neutrophils, *Science*, **226**: 1339 - 1342, 1984.
- [63] 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.
- [64] GIBBS, J. B., SIGAL, I. S., POE, M., SCOLNICK, E. M., Intrinsic GTP-ase activity distinguishes normal and oncogenic „ras” p21 molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 5704 - 5708, 1984.
- [65] GOFF, S. P., D'EUSTACHIO, P., RUDDLE, F. H., BALTIMORE, D., Chromosomal assignment of the endogenous proto-oncogene c-„abl”, *Science*, **218**: 1317 - 1319, 1982.
- [66] 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.

- [67] GONDA, T. J., SHEINESS, D. K., BISHOP, J. M., Transcripts from the cellular homologs of retroviral oncogenes: Distribution among chicken tissues, *Molec. Cell. Biol.*, **2**: 617 - 624, 1982.
- [68] GOUBIN, G., GOLDMAN, D. S., LUCE, J., NEIMAN, P. E., COOPER, G. M., Molecular cloning and nucleotide sequence of a transforming gene detected by transfection of chicken B-cell lymphoma DNA, *Nature*, **302**: 114 - 119, 1983.
- [68a] GREEN, S., WALTER, P., KUMAR, V., KRUST, A., BORNET, J.-M., ARGOS, P., CHAMBON, P., Human oestrogen receptor cDNA: Sequence, expression and homology to v-,erb-A", *Nature*, **320**: 134 - 139, 1986.
- [69] GREENBERG, M. E., ZIFF, E. B., Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-,fos" proto-oncogene, *Nature*, **311**: 433 - 438, 1984.
- [69a] GREENE, G. L., GILNA, P., WATERFIELD, M., BAKER, A., HORT, Y., SHINE, J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA, *Science*, **231**: 1150 - 1154, 1986.
- [70] GROFFEN, J., STEPHENSON, J. R., HEISTERKAMP, N., DeKLEIN, A., BARTRAM, C. R., GROSVELD, G., Philadelphia chromosomal break points are clustered within a limited region „bcr", on chromosome 22, *Cell*, **36**: 93 - 99, 1984.
- [71] HAGEMELJER, A., HÄHLEN, K., SIZOO, W., ABELS, J., Translocation (9; 11) (p 21; q 23) in three cases of acute monoblastic leukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **5**: 95 - 106, 1982.
- [72] HAPEL, A. J., FUNG, M. C., JOHNSON, R. M., YOUNG, I. G., JOHNSON, G., METCALF, D., Megakaryocytopoiesis and granulopoiesis of W/W<sup>v</sup> mice studied in long-term bone marrow cultures, *Blood*, **65**: 1453 - 1459, 1985.
- [73] HAPEL, A. J., LEE, J. C., FARRAR, W. L., IHLE, J. N., Establishment of continuous cultures of the 1.2 +, Lyt 1 +, 2 - T cells with purified interleukin 3, *Cell*, **25**: 179 - 186, 1981.
- [74] HARPER, M. E., FRANCHINI, G., LOVE, J., SIMON, M. I., GALLO, R. C., WONG-STAAAL, F., Chromosomal sublocalization of human c-,myb" and c-,fes" cellular „onc" genes. *Nature*, **304**: 169 - 171, 1983.
- [75] HAYASHI, Y., YAMAMOTO, K., KOJIMA, S., T-cell acute lymphoblastic leukemias with a t (8; 14) possibly involving a c-,myc" locus and T-cell receptor alpha-chain genes, *N. Engl. J. Med.*, **314**: 650 - 651, 1986.
- [76] HEISTERKAMP, N., GROFFEN, J., STEPHENSON, J. R., SPURR, N. K., GOODFELLOW, P. N., SOLOMON, E., CARRITT, B., BODMER, W. F., Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes, *Nature*, **299**: 747 - 749, 1982.
- [77] HELDIN, C.-H., WESTERMARK, B., Growth factors: Mechanism of activation and relation to oncogenes, *Cell*, **37**: 9 - 20, 1984.
- [78] HENRY, C., COQUILLAUD, M., SAULE, S., STEHELIN, D., DEBUIRE, B., The four C-terminal aminoacids of the v-,erb-A" polypeptide are encoded by intronic sequence of the v-,erb-B" oncogene. *Virology*, **140**: 179 - 182, 1985.
- [78a] HOLLENBERG, S. M., WEINBERG, C., ONG, E. S., CERELLI, G., ONO, A., LEO, R., THOMPSON, E. B., ROSENFELD, M. G., EVANS, R. M., Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA, *Nature*, **318**: 635 - 642, 1986.
- [79] HUDSON, P., HALEY, J., JOHN, M., CRONK, M., CRAWFORD, R., HARALAMBIDIS, J., TREGEAR, G., SHINE, J., NIALL, H., Structure of a geno-



- mic clone encoding biologically active human relaxin, *Nature*, **301**: 628 - 631, 1983.
- [80] HUEBNER, K., ISOBE, M., CROCE, C. M., GOLDE, D. W., KAUFMAN, S. E., GASSON, J. C., The human gene encoding GM-CSF is at 5q21 → q32 the chromosome region deleted in the 5q - anomaly, *Science*, **230**: 1282 - 1285, 1985.
- [81] HUNTER, T., The proteins of oncogenes, *Scient. Amer.*, **251**: no 8, 70 - 79, 1984.
- [82] ISCOVE, N. N., ROITSCH, C., Proc. IVth Int. Lymphokine Workshop, Academic Press, New York, 1985.
- [83] ISOBE, M., ERIKSON, J., EMANUEL, B. S., NOWELL, P. C., CROCE, C. M., Location of gene for beta subunit of human T-cell receptor at band 7q35, a region prone to rearrangements in T cells, *Science*, **228**: 580 - 582, 1985.
- [84] JACOBS, S., KULL, F. C., Jr., EARP, H. S., SVOBODA, M. E., VanWYK, J. J., CUATRECASAS, P., Somatomedin-C stimulates the phosphorylation of the beta-subunit of its own receptor, *J. Biol. Chem.*, **258**: 9581 - 9584, 1983.
- [85] JENKINS, J. R., RUDGE, K., CURRIE, G. A., Cellular immortalization by cDNA clone encoding the transformation associated phosphoprotein p53, *Nature*, **312**: 651 - 654, 1984.
- [86] 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.
- [87] JONAK, G. J., KNIGHT, E. Jr., Selective reduction of c-„myc” mRNA in Daudi cells by human beta interferon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 1747 - 1750, 1984.
- [88] JONES, C., MORSE, H. G., KAO, C. T., CARBONE, A., PALMER, E., Human T-cell receptor alpha-chain genes: Location on chromosome 14, *Science*, **228**: 83 - 85, 1985.
- [89] KELLY, K., Growth factors short-circuited, *Nature*, **317**: 398, 1985.
- [90] 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.
- [91] KHAN, P. M., SMITH, M., Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 7, 8 and 9, *Cytogenet. Cell Genet.*, **37**: 71 - 102, 1984.
- [92] KIRSCH, I. R., BERTNESS, V., SILVER, J., HOLLIS, G., Oncogene regulation during erythroid differentiation, [w] „Leukemia: Recent Adv. Biol. Treat.”, red. R. P. Gale i D. W. Golde, Alan R. Liss, Inc. 91 - 98, 1985.
- [93] KLEIN, G., The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis, *Nature*, **294**: 213 - 318, 1981.
- [94] KLEIN, G., KLEIN, E., Evolution of tumors and the impact of molecular oncology, *Nature*, **315**: 190 - 195, 1985.
- [95] KOEFFLER, H. P., Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: Therapeutic implications, *Blood*, **62**: 709 - 721, 1983.
- [96] KONDO, I., SHIMIZU, N., Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13 → q22 region of chromosomes 7, *Cytogenet. Cell Genet.*, **35**: 9 - 14, 1983.
- [96a] KANETO, Y., MASEKI, N., TAKASAKI, N., SAKURAI, M., HAYASHI, Y., NAKAZAWA, S., MORI, T., SAKURAI, M., TAKEDA, T., SHIKANO, T., HIYOSHI, Y., Clinical and hematologic characteristics in acute leukemia with 11q23 translocations, *Blood*, **67**: 484 - 491, 1986.

- [97] KONOPKA, J. B., WATANABE, S. M., SINGER, J. W., COLLINS, S. J., WITTE, O. N., Cell lines and clinical isolates derived from Ph<sup>1</sup> positive chronic myelogenous leukemia patients express c-, „abl” proteins with a common structural alteration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 1810 - 1815, 1985.
- [98] KONOPKA, J. B., WATANABE, S. M., WITTE, O. N., An alteration of the human c-, „abl” protein in K 562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity, *Cell*, **37**: 1035 - 1042, 1984.
- [99] Krim, M., Towards tumor therapy with interferons. Part I. Interferons: Production and properties, *Blood*, **55**: 711 - 721, 1980.
- [100] KRIM, M., Towards tumor therapy with interferons. Part II. Interferons: „In vivo” effects, *Blood*, **55**: 875 - 884, 1980.
- [101] LAND, H., PARADA, L. F., WEINBERG, R. A., Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes, *Nature*, **304**: 569 - 602, 1983.
- [102] LANE, D. P., CRAWFORD, L. V., T antigen is bound to a host-protein in SV 40-transformed cells, *Nature*, **278**: 261 - 263, 1979.
- [103] LAU, C. C., PARDEE, A. B., Mechanism by which coffeine potentiates lethality of nitrogen mustard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 2942 - 2946, 1982.
- [104] LeBEAU, M. M., LARSON, R. A., BITTER, M. A., VARDIMAN, J. W., GOLOMB, H. M., ROWLEY, J. D., Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia: A unique cytogenetic-clinicopathological association, *N. Engl. J. Med.*, **309**: 630 - 636, 1983.
- [105] LeBEAU, M. M., ROWLEY, J. D., Heritable fragile sites in cancer, *Nature*, **308**: 607 - 608, 1984.
- [106] LeBEAU, M. M., ROWLEY, J. D., Chromosomal abnormalities in leukemia and lymphoma: Clinical and biological significance. [w] „Advances in Human Genetics” vol. 15, red. H. Harris, K. Hirschhorn, Plenum Publ. Corp. (New York), 1 - 54, 1986.
- [107] LeBEAU, M. M., WESTBROOK, C. A., DIAZ, M. O., LARSON, R. A., ROWLEY, J. D., GASSON, J. C., GOLDE, D. W., SHERR, C. J., Evidence for the involvement of „GM-CSF” and „FMS” in the deletion (5q) in myeloid disorders, *Science*, **231**: 984 - 987, 1986.
- [108] LeBEAU, M. M., WESTBROOK, C. A., DIAZ, M. O., ROWLEY, J. D., GREN M., Translocation of the p 53 gene in t (15; 17) in acute promyelocytic leukaemia, *Nature*, **316**: 826 - 828, 1985.
- [109] LEE, J. C., HAPPEL, A. J., IHLE, J. N., Constitutive production of a unique lymphokine (IL 3) by the WEHI-3 cell line, *J. Immunol.*, **128**: 2393 - 2398, 1982.
- [110] LEVAN, G., MITELMAN, F., Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms, *Hereditas*, **79**: 156 - 160, 1975.
- [111] LÉVY, J. P., Les oncogènes (1-re partie), *Nouv. Rev. Fr. Hémat.*, **26**: 1 - 11, 1984.
- [112] LIN, C. R., CHEN, W. S., KRUIGER, W., STOLARSKY, L. S., WEBER, W., EVANS' R. M., VERMA, I. M., GILL, G. N., ROSENFELD, G. M., Expression cloning of human EGF receptor complementary DNA: Gene amplification and three related messenger RNA products in A431 cells, *Science*, **224**: 843 - 848, 1984.
- [113] LINZER, D. I. H., LEVINE, A. J., Characterization of a 54 Kdalton cellular

- SV 40 tumor antigen present in SV 40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells, *Cell*, **17**: 43 - 52, 1979.
- [114] McCARTHY, D. M., RASSOOL, F. V., GOLDMAN, J. M., GRAHAM, S. V., BIRNIE, G. D., Genomic alteration involving the c-„myc” proto-oncogene locus during the evolution of a case of chronic granulocytic leukaemia, *Lancet*, **2**: 1362 - 1365, 1984.
- [115] McGRATH, J. P., CAPON, D. J., GOEDDEL, D. V., LEVINSON, A. D., Comparative biochemical properties of activated human p 21 „ras” protein, *Nature*, **310**: 644 - 649, 1984.
- [116] MERCER, W. E., NELSON, D., DeLEO, A. B., OLD, L. J., BASERGA, R., Microinjection of monoclonal antibody to protein-p53 inhibits serum-induced DNA synthesis in 3T3 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 6309 - 6312, 1982.
- [117] METCALF, D., BEGLEY, C. G., NICOLA, N. A., The proliferative effects of human GM-CSF alfa and beta and murine G-CSF in microwell cultures of fractionated human marrow cells, *Leukemia Res.*, **9**: 521 - 528, 1985.
- [118] METCALF, D., MOORE, M. A. S., WARNER, N. L., Colony formation „in vitro” by myelomonocytic leukemic cells, *J. Natl. Cancer*, **43**: 983 - 1001, 1969.
- [119] METCALF, D., NICOLA, N. A., Autoinduction of differentiation in WEHI-3B leukemia cells, *Int. J. Cancer*, **30**: 773 - 780, 1982.
- [120] MILNER, J., McCORMICK, F., Lymphocytes stimulation: Concanavalin A induces the expression of 53 K protein, *Cell Biol. Int. Rep.*, **4**: 663 - 667, 1980.
- [121] MILNER, J., MILNER, S., SV 40-53 K antigen: A possible role for 53 K in normal cells, *Virology*, **112**: 785 - 788, 1981.
- [122] MINOWADA, J., [w] „Leukemia”, red. F. Gunz i E. Henderson, Grune i Stratton, New York, 119 - 139, 1982.
- [122a] MIRRO, J., KITCHINGMAN, G., WILLIAMS, D., LAUZON, G. J., LIN C.-C., CALLIHAN, T., ZIPF, T. F., Clinical and laboratory characteristics of acute leukemia with the 4; 11 translocation, *Blood*, **67**: 689 - 697, 1986.
- [123] MITELMAN, F., LEVAN, G., Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. IV. A survey of 1,871 cases. *Hereditas*, **95**: 79 - 139, 1981.
- [124] MORGAN, R., HECHT, B. K., SANDBERG, A. A., HECHT, F., SMITH, S. D., Chromosome 5q35 breakpoint in malignant histiocytosis. *N. Engl. J. Med.* **314**: 1322, 1986.
- [125] MORTON, C. C., DUBY, A. D., EDDY, R. L., SHOWS, T. B., SEIDMAN, J. G., Genes for beta-chain of human T-cell antigen receptor map to regions of chromosomal rearrangement in T cells, *Science*, **228**: 582 - 585, 1985.
- [126] MORTON, C. C., TAUB, R., DIAMOND, A., LANE, M.-A., COOPER, G. M., LEDER, P., Mapping of the human „Blym-1” transforming gene activated in Burkitt lymphomas to chromosome 1, *Science*, **223**: 173 - 175, 1984.
- [127] MÜLLER, R., BRAVO, R., BURCKHARD, J., CURRAN, T., Induction of c-„fos” gene and protein by growth factors precedes activation of c-„myc”, *Nature*, **312**: 716 - 720, 1984.
- [128] MÜLLER, R., CURRAN, T., MÜLLER, D., GUILBERT, L., Induction of c-„fos” during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation, *Nature*, **314**: 546 - 548, 1985.
- [129] MÜLLER, R., MÜLLER, D., GUILBERT, L., Differential expression of c-„fos” in hematopoietic cells. Correlation with differentiation of monomyelocytic cells „in vitro”, *EMBO J.*, **3**: 1887 - 1890, 1984.
- [130] MÜLLER, R., SLAMON, D. J., TREMBLAY, J. M., CLINE, M. J., VERMA,

- I. M., Differential expression of cellular oncogenes during pre- and postnatal development of the mouse, *Nature*, **299**: 640 - 644, 1982.
- [131] MÜNKE, M., LINDGREN, V., de MARINVILLE, B., FRANCKE, U., Comparative analysis of mouse-human hybrids with rearranged chromosomes 1 by „in situ” hybridization and Southern blotting: High-resolution mapping of NRAS, NGFB and AMY on human chromosome 1, *Somat. Cell. Mol. Genet.*, **10**: 589 - 599, 1984.
- [132] MURRE, C., WALDMANN, R. A., MORTON, C. C., BONGIOVANNI, K. F., WALDMANN, T. A., SHOWS, T. B., SEIDMAN, J. G., Human gamma-chain genes are rearranged in leukaemic T cells and map to the short arm of chromosome 7, *Nature*, **316**: 549 - 552, 1985.
- [133] MYERS, C. D., KATZ, F. E., JOSHI, G., MILLAR, J. L., A cell line secreting stimulating factors for CFU-GEMM culture, *Blood*, **64**: 152 - 155, 1984.
- [134] 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.
- [135] NEWMARK, P., Events at the surface of the cell, *Nature*, **317**: 380, 1985.
- [136] NICOLA, N. A., BEGLEY, C. G., METCALF, D., Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells, *Nature*, **314**: 625 - 628, 1985.
- [137] NICOLA, N. A., METCALF, D., MATSUMOTO, M., JOHNSON, G. R., Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony stimulating factor, *J. Biol. Chem.*, **258**: 9017 - 9023, 1983.
- [138] NICOLA, N. A., VADAS, M., Hemopoietic colony-stimulating factors, *Immunol. Today*, **5**: 76 - 80, 1984.
- [139] NOWELL, P., FINAN, J., DALLA-FAVERA, R., GALLO R. C., ar-RUSHDI, A., ROMANCZUK, H., SELDEN, J. R., EMANUEL, B. S., ROVERA, G., CROCE, C. M., Association of amplified oncogene c-„myc” with an abnormally banded chromosome 8 in a human leukaemia cell line, *Nature*, **306**: 494 - 497, 1983.
- [140] NUNN, M. F., SEEBURG, P. H., MOSCOVICI, C., DUESBERG, P. H., Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E 26 transforming gene, *Nature*, **306**: 391 - 395, 1983.
- [141] 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.
- [142] OWERBACH, D., RUTTER, W. J., SHOWS, T. B., GRAY, P., GOEDEL, D. V., LAWN, R. M., Leukocyte and fibroblast interferon genes are located on human chromosome-9 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 3123 - 3127, 1981.
- [143] PARADA, L. F., LAND, H., WEINBERG, R. A., WOLF, D., ROTTER, V., Cooperation between gene encoding p 53 tumour antigen and „ras” in cellular transformation, *Nature*, **312**: 649 - 651, 1984.
- [144] PEARSON, M. G., VARDIMAN, J. W., LeBEAU, M. M., ROWLEY, J. D., A new cytogenetic subset in acute nonlymphocytic leukemia (ANLL) associated with bone marrow basophilia, *Blood*, **62**: Suppl., 1: 180a, 1983.
- [145] PELICCI, P.-G., LANFRANCONE, L., BRATHWAITE, M. D., WOLMAN, S. R., DALLA-FAVERA R., Amplification of the c-„myb” oncogene in a case of human acute myelogenous leukemia, *Science*, **224**: 1117 - 1121, 1984.
- [146] PETERSON, L. C., BLOOMFIELD, C. D., BRUNNING, R. D., Philadelphia

- chromosome positive (Ph<sup>+</sup>) acute leukemia Morphology, clinical features, and survival of nine patients, *Lab. Invest.*, **34**: 346 - 347, 1976.
- [147] PIERCE, J. H., AARONSON, S. A., „In vitro” transformation of murine pre-B lymphoid cells by Snyder-Theilen feline sarcoma virus, *J. Virol.*, **46**: 993 - 1002, 1983.
- [148] PLATZER, E., WELTE, K., GABRILOVE, J. L., LU, L., HARRIS, P., MERTELSMANN, R., MOORE, M. A. S., Biological activities of a human pluripotent hemopoietic colony stimulating factor on normal and leukemic cells, *J. Exp. Med.*, **162**: 1788 - 1802, 1985.
- [149] PLEDGER, W. J., STILES, C. D., ANTONIADES, H. N., SCHER, C. D., Induction of DNA synthesis in BALB/c 373 cells by serum components: Reevaluation of the commitment process, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 4481 - 4485, 1977.
- [150] PRAKASH, D., McBRIDE, O. W., SWAN, D. C., DEVARE, S. G., TRONICK, S. R., AARONSON, S. A., Molecular cloning and chromosomal mapping of a human locus related to the transforming gene of Moloney murine sarcoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 5210 - 5214, 1982.
- [151] PRIVALSKY, M. L., RALSTON, R., BISHOP, J. M., The membrane glycoprotein encoded by the retroviral oncogene c-„erb-B” is structurally related to tyrosine-specific, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 704 - 707, 1984.
- [152] PUGH, W. C., PEARSON, M. G., ROWLEY, J. D., VARDIMAN, J. W., Philadelphia-negative chronic myelogenous leukemia: A morphologic reassessment, *Brit. J. Haemat.*, **60**: 457 - 467, 1983.
- [153] RALL, L. B., SCOTT, J., BELL, G. I., CRAWFORD, R. J., PENSCHOW, J. D., NIALL, H. D., COGHLAH, J., Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues, *Nature*, **313**: 228 - 231, 1985.
- [154] RALPH, P., MOORE, M. A. S., NILSSON, K., Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines, *J. Exp. Med.*, **143**: 1528 - 1533, 1976.
- [155] RALSTON, R., BISHOP, J. M., The protein products of the „myc” and „myb” oncogenes and adenovirus E1A are structurally related, *Nature*, **306**: 803 - 806, 1983.
- [155a] RASKIND, W. H., TIRUMALI, N., JACOBSON, R., SINGER, J., FIALKOW, P. J., Evidence for a multi-step pathogenesis of a myelodysplastic syndrome, *Blood*, **63**: 1318 - 1323, 1984.
- [156] RENNICK, D. M., LEE, F. D., YOKOTA, T., ARAI, K-i, CANTOR, H., NABEL, G. J., A cloned MCGF cDNA encodes a multilineage hematopoietic growth factor: Multiple activities of interleukin 3, *J. Immunol.*, **134**: 910 - 914, 1985.
- [157] RETTENMIER, C. W., CHEN, J. H., ROUSSEL, M. F., SHERR, C. J., The product of the c-„fms” proto-oncogene: A glycoprotein with associated tyrosine kinase activity, *Science*, **228**: 320 - 323, 1985.
- [158] ROSENBERG, N., BALTIMORE, D., A quantitative assay for transformation of bone marrow cells by Abelson murine leukemia virus, *J. Exp. Med.*, **143**: 1453 - 1463, 1976.
- [159] ROTHEBERG, P. G., ERISMAN, M. D., DIEHL, R. E., ROVIGATTI, U. G., ASTRIN, S. M., Structure and expression of the oncogene c-„myc” in fresh tumor material from patients with hematopoietic malignancies, *Mol. Cell. Biol.*, **4**: 1096 - 1103, 1984.
- [160] ROTTER, V., p 53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be

- used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**: 2613 - 2617, 1983.
- [161] ROTTER, V., BOSS, M. A., BALTIMORE, D., Increased concentration of an apparently identical cellular protein in cells transformed by either Abelson murine leukemia virus or other transforming agents, J. Virol., **38**: 336 - 346, 1981.
- [161a] ROVIGATTI, U., WATSON, D. K., YUNIS, J. J., Amplification and rearrangement of Hu-,ets-1" in leukemia and lymphoma with involvement of 11q23, Science, **232**: 398 - 400, 1986.
- [162] ROWLEY, J. D., Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukaemia, Ann. Genet., **16**: 109 - 112, 1973.
- [163] ROWLEY, J. D., Nonrandom chromosomal abnormalities in hematologic disorders of man, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**: 152 - 156, 1975.
- [164] ROWLEY, J. D., Mapping of human chromosomal regions related to neoplasia: Evidence from chromosomes regions related to neoplasia: Evidence from chromosomes 1 and 17, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**: 5729 - 5733, 1980.
- [165] ROWLEY, J. D., Ph<sup>1</sup>-positive leukemia, including chronic myelogenous leukemia, Clin. Haemat., **9**: 55 - 86, 1980.
- [166] ROWLEY, J. D., Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma, Cancer Res., **44**: 3159 - 3168, 1984.
- [167] ROWLEY, J. D., FUKUHARA, S., Chromosome studies in non-Hodgkin's lymphomas, Semin. Oncol., **7**: 255 - 266, 1980.
- [168] RUBIN, J. B., SHIA, M. A., PILCH, P. F., Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation „in vitro” by insulin-like growth factor I, Nature, **305**: 438 - 440, 1983.
- [169] RUPNIEWSKA, Z. M., Przypuszczalne mechanizmy aktywacji komórkowego genu „myc” w chłoniaku. Burkitta, Postępy Hig. Med. Dośw., **40**: 96 - 110, 1986.
- [170] RUPNIEWSKA, Z. M., Niektóre dane z patogenezy przewlekłej białaczki szpikowej — czy fuzja materiału genetycznego jest przyczyną aktywacji onkogenu?, Przegl. Lek., praca wysłana do druku 1985.
- [171] RUPNIEWSKA, Z. M., ROŻYMKOWA, D., Z której komórki w linii różnicowania pochodzi przewlekła białaczka limfatyczna B komórkowa?, Postępy Hig. Med. Dośw., praca wysłana do druku, 1986.
- [172] RUPNIEWSKA, Z. M., ROŻYMKOWA, D., KOWAL, M., Czy można uznać chromosom Ph<sup>1</sup> za marker nowotworowej wieloważnej limfo-hemopoetycznej komórki pnia?, Postępy Hig. Med. Dośw., **38**: 39 - 60, 1984.
- [173] RUSCETTI, F. W., GALLO, R. C., Human T-lymphocyte growth factor: Regulation of growth and function of T lymphocytes, Blood, **57**: 379 - 394, 1981.
- [174] RUTHEFORD, 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.
- [175] 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.
- [176] SACCHI, N., WATSON, D. K., vanKESSEL, H. M., HAGEMEIJER, A., KERSEY, J., DRABKIN, H. D., PETERSON, D., PAPAS, T. S., Hu-,ets-1" and Hu-,ets-2" genes are transposed in acute leukemias with (4;11) and (8;21) translocations, Science, **231**: 379 - 382, 1986.

- [177] SACHS, L., Growth, differentiation and the reversal of malignancy, *Scient. Amer.*, **254**: no 1, 40 - 47, 1986.
- [178] SAKAGUCHI, A. Y., NAYLA, S. L., SHOWS, B. T., TOOLE, J. J., McCOY, M., WEINBERG, R. A., Human c-„Ki-ras-2” proto-oncogene on chromosome 12, *Science*, **219**: 1081 - 1082, 1983.
- [179] SARIBAN, E., MITCHELL, T., KUFEL, D., Expression of the c-„fms” proto-oncogene during human monocytic differentiation, *Nature*, **316**: 64 - 66, 1985.
- [180] SARNOW, P., HO, Y. S., WILLIAMS, J., LEVINE, A. J., Adenovirus E1b-58 kd tumor antigen and SV 40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells, *Cell*, **28**: 387 - 394, 1982.
- [181] SCHRADER, J. W., CARPPER, R. M., Autogenous production of hemopoietic growth factor, persisting-cell-stimulating factor, as a mechanism for transformation of bone marrow-derived cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 6892 - 6896, 1983.
- [182] SEALY, L., PRIVALSKY, M. L., MOSCOVICI, G., MOSCOVICI, C., BISHOP, J. M., Site-specific mutagenesis of avian erythroblastosis virus: „erb-B” is required for oncogenicity, *Virology*, **130**: 155-178, 1983.
- [183] SEIGEL, L. J., HARPER, M. E., WONG-STAAAL, F., GALLO, R. C., NASH, W. G., O'BRIEN, S. J., Gene for T-cell growth factor: Location on human chromosome 4q and feline chromosome B-1, *Science*, **223**: 175 - 178, 1984.
- [184] SHEER, D., SHEPPARD, D. M., LeBEAU, M. M., ROWLEY, J. D., SanRO-MAN, C., SOLOMON, E., Localization of the oncogene c-„erb A 1” immediately proximal to the acute promyelocytic leukemia breakpoint on chromosome 17, *Ann. Human Genet.*, **49**: 167 - 172, 1985.
- [185] SHEER, C. J., RETTENMIER, C. W., SACCA, R., ROUSSEL, M. F., LOOK, A. T., STANLEY, E. R., The c-„fms” proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1, *Cell*, **41**: 665 - 676, 1985.
- [186] SHIH, T. Y., PAPAGEORGE, A. G., STOKES, P. E., WEEKS, M. O., SCOL-NICK, 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.
- [187] SHILO, B.-Z., WEINBERG, R. A., DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 6789 - 6792, 1981.
- [188] SIMON, M., KORNBERG, T. B., BISHOP, J. M., The loci related to the „src” oncogene and tyrosine-specific protein kinase activity in *Drosophila*, *Nature*, **302**: 837 - 839, 1983.
- [189] 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.
- [190] SLAMON, D. J., deKERNION, J. B., VERMA, I. M., CLINE, M. J., Expression of cellular oncogenes in human malignancies, *Science*, **224**: 256 - 262, 1984.
- [191] SLATE, D. L., D'EUSTACHIO, P., PRAVTCHEVA, D., CUNNINGHAM, A. C., NAGATA, S., WEISSMANN, C., RUDDLE, F. H., Chromosomal location of a human alpha interferon gene family, *J. Exp. Med.*, **155**: 1019 - 1024, 1982.
- [192] SMITH, C. D., LANE, B. C., KUSAKA, I., VERGHESE, M. W., SNYDER-

- MAN, R., Chemoattractant receptor-induced hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in human polymorphonuclear leucocyte membranes. Requirement for a guanine nucleotide regulatory protein, *J. Biol. Chem.*, **260**: 5875 - 5878, 1985.
- [193] 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.
- [194] SOUZA, L. M., BOONE, T. C., GABRILOVE, J., LAI, P. H., ZSEBO, K. M., MURDOCK, D. C., CHAZIN, V. R., BRUSZEWSKI, J., LU, H., CHEN, K. K., BARENDT, J., PLATZER, E., MOORE, M. A. S., MERTELSMANN, R., WELTE, K., Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Effects on normal and leukemic myeloid cells, *Science*, **232**: 61 - 65, 1986.
- [195] SPORN, M. B., ROBERTS, A. B., Autocrine growth factors and cancer, *Nature*, **313**: 745 - 747, 1985.
- [196] SPURR, N. K., SOLOMON, E., JANSSON, M., SHEER, D., GOODFELLOW, P. N., BODMER, W. F., VENSTROM, M., Chromosomal localisation of the human homologues to the oncogenes „erb-A” and „erb-B”, *EMBO J.*, **3**: 159 - 163, 1984.
- [197] STANLEY, E. R., Colony-stimulating factor (CSF) radioimmunoassay: Detection of CSF-subclass stimulating macrophage production, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 2969 - 2973, 1979.
- [198] STILES, C. D., CAPONE, G. T., SCHER, C. D., ANTONIADES, H. N., VANWYK, J. J., PLEDGER, W. J., Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 1279 - 1283, 1979.
- [199] SÜMEGI, J., SPIRA, J., BAZIN, H., SZPIRER, J., LEVAN, G., KLEIN, G., Rat c-„myc” oncogene is located on chromosome 7 and rearranges in immunocytomas with t(6;7) chromosomal translocation, *Nature*, **306**: 497 - 498, 1983.
- [200] SUNDSTRÖM, C., NILSSON, K., Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937), *Inst. J. Cancer*, **17**: 565 - 577, 1976.
- [201] SUTHERLAND, G. R., JACKY, P. B., BAKER, E., MANUEL, A., Heritable fragile sites on human chromosomes. X. New folate-sensitive fragile sites: 6p23, 9p21, 9q32, and 11q23, *Am. J. Hum. Genet.*, **35**: 432 - 438, 1983.
- [202] 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.
- [203] SWEET, R. W., YOKOYAMA, S., KAMATA, T., FERAMISCO, J. R., ROSENBERG, M., GROSS, M., The product of „ras” is a GTPase and T 24 oncogenic mutant is deficient in this activity, *Nature*, **311**: 273 - 275, 1984.
- [204] TAKEDA, K., MINOWADA, J., BLOCH, A., Kinetics of appearance of differentiation-associated characteristics in ML-1, a line of human myeloblastic leukemia cells, after treatment with 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate, dimethylsulfoxide or 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine, *Cancer Res.*, **42**: 5152 - 5158, 1982.
- [205] TAKETANI, Y., OKA, T., Biological action of epidermal growth factor and its functional receptors in normal mammary epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 2647 - 2650, 1983.
- [206] 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 plasmocytoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7837 - 7841, 1982.
- [207] TEYSSIER, J. R., BARTRAM, C. R., DEVILLE, J., POTRON, G., PIGEON, F., c-,abl" oncogene and chromosome 22 „bcr" juxtaposition in chronic myelogenous leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **312**: 1393 - 1394, 1985.
- [208] Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **4**: 95 - 142, 1981.
- [209] TRENT, J. M., OLSON, S., LAWN, R. M., Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast and immune interferon genes by means of „in situ" hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7809 - 7813, 1982.
- [210] TRICOLI, J. V., RALL, L. B., SCOTT, J., BELL, G. I., SHOWS, T. B., Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12, *Nature*, **310**: 784 - 786, 1984.
- [211] TSUJIMOTO, Y., FINGER, L. R., YUNIS, J., NOWELL, P. C., CROCE, C. M., Molecular genetics of follicular lymphoma: Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B-cells with the t(14;18) chromosome translocation, *Science*, **226**: 1097 - 1099, 1984.
- [212] TSUJIMOTO, Y., JAFFE, E., COSSMAN, J., GORHAM, J., NOWELL, P. C., CROCE, C. M., Clustering of break-points on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11; 14) chromosome translocation, *Nature*, **315**: 340 - 343, 1985.
- [213] TSUJIMOTO, Y., YUNIS, J., ONORATO-SHOWE, L., ERIKSON, J., NOWELL, P. C., CROCE, C. M., Molecular cloning of the chromosomal break-point of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11; 14) chromosome translocation, *Science*, **224**: 1403 - 1406, 1984.
- [214] ULLRICH, A., COUSSENS, L., HAYFLICK, J. S., DULL, T. J., GRAY, A., TAM A. W., LEE, J., YARDEN, Y., LIBERMANN, T. A., SCHLESSINGER, J., DOWNWARD, J., MAYES, E. L. V., WHITTLE, N., WATERFIELD, M. D., SEEBURG, P. H., Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells, *Nature*, **309**: 418 - 425, 1984.
- [215] VanBEVEREN, C., GALLESCHAW, J. A., JONAS, V., BERNS, A. J. M., DOOLITTLE, R. F., DONOGHUE, D. J., VERMA, I. M., Nucleotide sequence and formation of the transforming gene of mouse sarcoma virus, *Nature*, **289**: 258, 1981.
- [216] WARNER, N. L., MOORE, M. A. S., METCALF, D., A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB/c mice: Cytology, karyotype and muramidase content, *J. Natl. Cancer Inst.*, **43**: 963 - 968, 1969.
- [217] 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.
- [218] WATSON, D. K., McWILLIAMS-SMITH, M. J., KOZAK, C., REEVES, R., GEARHART, J., NUNN, M. F., NASH, W., FOWLE, III J. R., DUESBERG, P. H., PAPAS, T. S., O'BRIEN, S. J., Conserved chromosomal positions of dual domains of the „ets" protooncogene in cats, mice and humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 1807 - 1811, 1986.
- [219] WATSON, D. K., McWILLIAMS-SMITH, M. J., NUNN, M. F., DUESBERG,

- P. H., O'BRIEN, S. J., PAPAS, T. S., The „ets” sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E 26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: Both loci are transcriptionally active, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 7294 - 7298, 1985.
- [220] WEINBERG, C., HOLLENBERG, S. M., ROSENFELD, M. G., EVANS, R. M., Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-„erb-A” oncogene product, *Nature*, **318**: 670 - 672, 1985.
- [221] WEISS, R. A., MARSHALL, C. J., *Oncogenes*, *Lancet*, **2**: 1138 - 1142, 1984.
- [222] WELTE, K., PLATZER, E., LU, L., GABRILOVE, J. L., LEVI, E., MERTELSMANN, R., MOORE, M. A. S., Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor, *Prac. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 1526 - 1530, 1985.
- [223] WESTIN, E. H., GALLO, R. C., ARYA, S. K., EVA, A., SOUZA, L. M., BALUDA, M. A., AARONSON, S. A., WONG-STAAAL, F., Differential expression of the AMV gene in human hematopoietic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 2194 - 2198, 1982.
- [224] WESTIN, E. H., WONG-STAAAL, F., GELMANN, E. P., DALLA-FAVERA, R., PAPAS, T. S., LAUTENBERGER, J. A., EVA, A., REDDY, P., TRONICK, S. R., AARONSON, S. A., GALLO, R. C., Expression of cellular homologs of retroviral „onc” genes in human hematopoietic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 2490 - 2494, 1982.
- [225] WIENER, F., OHNO, S., SPIRA, J., HARAN-GHERA, N., KLEIN, G., Chromosome changes (trisomies 15 and 17) associated with tumor progression in leukemias induced by radiation leukemia virus, *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**: 227 - 238, 1978.
- [226] WIENER, F., SPIRA, J., OHNO, S., HARAN-GHERA, N., KLEIN, G., Chromosome changes (trisomy 15) in murine T-cell leukemia induced by 7, 12-dimethylbenz(alpha)anthracene (DMBA), *Int. J. Cancer*, **22**: 447 - 453, 1978.
- [227] WILLINGHAM, M. C., PASTAN, I., SHIN, T. Y., SCOLNICK, E. M., Localization of the „src” gene product of Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry, *Cell*, **19**: 1005 - 1014, 1980.
- [228] XU, Y-h., ISHII, S., CLARK, A. J. L., SULLIVAN, M., WILSON, R. K., MA, D. P., ROE, B. A., MERLINO, G. T., PASTAN, L., Human epidermal growth factor receptor cDNA is homologous to a variety of RNAs overproduced in A431 carcinoma cells, *Nature*, **309**: 806 - 810, 1984.
- [229] YAMAMOTO, T., NISHIDA, T., MIYAJIMA, N., KAWAI, S., OOI, T., TOYOSHIMA, K., The „erb B” gene of avian erythroblastosis virus is a member of the „src” gene family, *Cell*, **36**: 71 - 78, 1983.
- [230] YOKOTA, J., TSUNETSUGU-YOKOTA, Y., BATTIFORA, H., LeFEVRE, C., CLINE, M. J., Alterations of „myc”, „myb”, and „ras-Ha” protooncogenes in cancers are frequent and show clinical correlation, *Science*, **231**: 261 - 265, 1986.
- [231] YUNIS, J. J., The chromosomal basis of human neoplasia, *Science*, **221**: 227 - 236, 1983.
- [232] YUNIS, J. J., Recurrent chromosomal defects are found in most patients with acute nonlymphocytic leukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **11**: 125 - 137, 1984.
- [233] YUNIS, J. J., Genomic rearrangements in human cancer, [w] *Leukemia*:

Recent Adv. Biol. Treat., red. R. P. Gale, D. W. Golde, Alan R. Liss., Inc.,  
99 - 105, 1985.

- [234] YUNIS, J. J., SORENG, A. L., Constitutive fragile sites and cancer, Science,  
226: 1199 - 1204, 1984.

*Otrzymano: 10 października 1986*

*Przyjęto: 16 lutego 1987*

*Adres autorów: ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin*



## GENETYCZNA KONTROLA GAMETOGENEZY U SSAKÓW \*

## GENETIC CONTROL OF GAMETOGENESIS IN MAMMALS

Halina KRZANOWSKA

Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego

*Streszczenie.* Płeć męską u ssaków determinuje czynnik zawarty w chromosomie Y, jednak o kierunku różnicowania się komórek linii płciowej decyduje nie tyle ich własny skład chromosomowy, co środowisko wytworzone przez komórki somatyczne gonady. W krytycznym stadium prenatalnym komórki rozrodcze znajdujące się w jajniku wchodzi w profazę mejozy i stają się oocytami, podczas gdy komórki znajdujące się w jądrze nie podejmują mejozy w okresie prenatalnym i zostają skierowane na drogę spermatogenezy. Jednak dalsze etapy gametogenezy są już uzależnione od aktywności chromosomów występujących w samych komórkach rozrodczych. Obecność dwu chromosomów X sprzyja przeżywaniu oocytów, natomiast powoduje obumieranie spermatogoniów, przy czym dla prawidłowego przebiegu spermatogenezy konieczna jest inaktywacja chromosomu X oraz obecność chromosomu Y. Ekspresja genów kontrolujących spermiogenezę może zachodzić jeszcze w komórkach diploidalnych lub już w haploidalnych spermatydach, zanim ich genom nie ulegnie całkowitej inaktywacji w wyniku kondensacji chromatyny. Nie mamy przekonujących dowodów, aby fenotyp gamet był modyfikowany przez komórki somatyczne. Wprawdzie kontrola genetyczna gametogenezy jest jeszcze bardzo słabo poznana, jednak wydaje się nie ulegać wątpliwości, że jest ona znacznie bardziej skomplikowana u samców niż u samic, gdyż wiele czynników zaburzących spermatogenezę nie wywiera żadnego wpływu na oogenezę.

*Summary.* The male sex in mammals is determined by factors located in the Y chromosome, but the direction of germ cells differentiation does not seem to depend on their own chromosome constitution, rather on the environment created by somatic cells of the gonad. At the critical prenatal stage, germ cells which are situated in the ovary enter meiotic prophase and become oocytes, while those situated in the testis are prevented from entering meiosis prenatally and thus embark on spermatogenesis. However, further steps of gametogenesis depend largely on

\* Referat wygłoszony na XVI konferencji szkoleniowej z zakresu biologii komórki w dniu 20 listopada 1986 r. w Warszawie, „Wczesne stadia rozwoju zarodków ssaków”.

the activity of chromosomes present in germ cells themselves. The presence of two active X chromosomes favours survival of oocytes but is lethal to spermatogonia. Vital for the normal course of spermatogenesis is inactivation of the X chromosome and the presence of the Y chromosome. Expression of genes controlling spermiogenesis takes place either in diploid cells or in haploid spermatids, until their genome undergoes inactivation due to chromatin condensation. There is no convincing evidence of modification of gamete phenotype by somatic cells. Although our knowledge of genes controlling mammalian gametogenesis is still very poor, there seems to be no doubt that this control is much more complicated in males than in females, because many factors affecting spermatogenesis do not exert any effects on oogenesis.

Produkcja funkcjonalnych gamet zależy od tak wielu różnych czynników, że liczba genów kontrolujących ten proces pośrednio lub bezpośrednio powinna być ogromna [61]. W jaki sposób można je identyfikować? Klasyczna metoda genetyczna polega na analizie mutacji, które powodują odchylenia od normy. Jednakże wykazanie, że jakiś defekt ma podłoże genetyczne, i ewentualne zlokalizowanie odpowiedzialnego za to genu wymaga analizy potomstwa, co w przypadku zaburzeń płodności bywa utrudnione lub niemożliwe, toteż wiele potencjalnie interesujących mutacji wymyka się naszej uwadze. Tym należy tłumaczyć zaskakujący fakt, że nawet u myszy (w której chromosomach zlokalizowano aż 60 genów wpływających na barwę sierści) udało się zidentyfikować zaledwie 25 loci genowych, których mutacje powodują poważne defekty płodności, a z nich tylko 10 upośledza bezpośrednio gametogenezę [61]. Wykryto je dzięki temu, że przeważnie oprócz zaburzeń płodności wywołują też inne wyraźnie widoczne efekty plejotropowe.

Znacznie więcej wiemy o zaburzeniach wynikających ze zmiany liczby lub struktury chromosomów (zwłaszcza chromosomów płci), ponieważ są one bezpośrednio wykrywalne. Bardzo cennych informacji dostarcza też embriologia eksperymentalna, a zwłaszcza badania nad chimerami, zapoczątkowane i rozwinięte przez Tarkowskiego [52, 69, 70]. I wreszcie w ostatnich latach otworzyły się nowe możliwości badawcze poprzez izolowanie i klonowanie określonych sekwencji DNA, a następnie lokalizowanie ich w chromosomach czy też wykrywanie ich produktów. Wszystkie te metody nawzajem się uzupełniają i rokują szybki postęp badań. Na razie jednak, mimo zgromadzenia już ogromnego piśmiennictwa wiadomości o genetycznej kontroli produkcji gamet u ssaków są fragmentaryczne i wciąż nie mamy odpowiedzi na szereg podstawowych pytań.

Celem niniejszego artykułu jest rozważenie czynników, które decydują o podjęciu kolejnych etapów w procesie gametogenezy i kształtowania się fenotypu gamet. Zagadnienie to zostanie omówione na wybranych przykładach odnoszących się głównie do myszy, jako do najlepiej

pod względem genetycznym poznanego gatunku ssaka. Rozważania trzeba jednak zacząć od poziomu podstawowego dotyczącego determinacji płci i różnicowania się gonady w kierunku żeńskim lub męskim, gdyż od tego zależy dalszy przebieg gametogenezy.

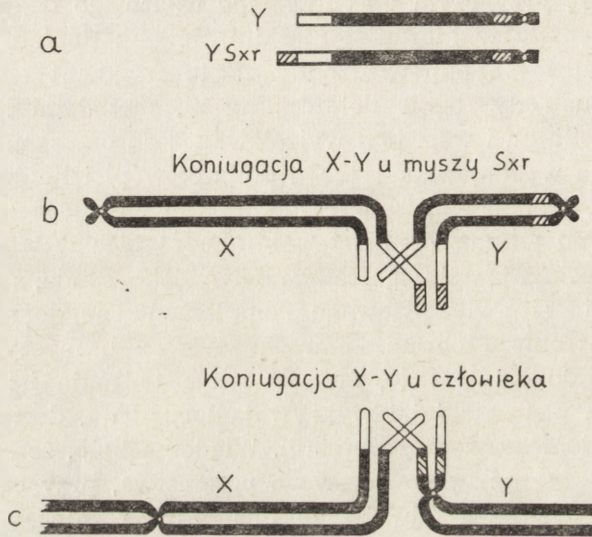
#### GENETYCZNA KONTROLA DETERMINACJI PŁCI

Od dawna wiadomo, że u ssaków występuje chromosomowa determinacja płci: normalne samice mają dwa chromosomy X, a samce chromosomy X i Y, przy czym obecność tego ostatniego decyduje o różnicowaniu się gonady w kierunku męskim. Jednak dopiero od kilku lat udaje się lokalizować odpowiedzialny za to fragment chromosomu Y, czyli tzw. locus Tdy (testis determining-Y), metodami bezpośrednimi.

W 1980 r. Singh i wsp. [65] wyizolowali z chromosomów węży frakcję DNA, która występowała tylko u osobników płci heterogametycznej, a zawierała sekwencje bardzo konserwatywne ewolucyjnie, hybrydujące z odcinkami chromosomu determinującego płeć w różnych grupach kręgowców. Posługując się tą frakcją DNA jako sondą, metodą hybrydyzacji DNA in situ zlokalizowano komplementarne do niej sekwencje w okolicy centromeru chromosomu Y, zarówno u myszy, jak u człowieka [30], a dowodu na to, że sekwencje te mają istotnie związek z determinacją płci męskiej i wykrywają locus Tdy, dostarczyły myszy z tzw. czynnikiem Sxr (sex reversing). Wiadomo było, że samce XY Sxr przekazują ten czynnik połowie swego potomstwa, przy czym u osobników XX Sxr następuje odwrócenie płci, gdyż różnicują się one jako samee [11]. Ponieważ czynnik Sxr dziedziczy się jak dominujący gen autosomalny, podejrzewano, że może to być fragment chromosomu Y przeniesiony do któregoś z autosomów, jednak poszukiwania tego fragmentu nie dawały rezultatów.

Sprawa się wyjaśniła dopiero wtedy, gdy Singh i Jones [64] zastosowali do hybrydyzacji in situ ową sondę DNA wykrywającą konserwatywne ewolucyjnie sekwencje chromosomu determinującego płeć. Zlokalizowanie komplementarnych do nich sekwencji u myszy Sxr, a w ślad za tym analiza kariologiczna chromosomów barwionych na prążki G [18], wykazały, że samce XY Sxr mają nietypowy chromosom Y z dwoma kopiami odcinka zawierającego locus Tdy: jedna z nich mieści się w normalnej pozycji w rejonie centromeru, a druga (powstała przypuszczalnie przez duplikację) na końcu dystalnym, który koniuguje z chromosomem X. W czasie koniugacji w wyniku crossing over kopia dystalna (czyli czynnik Sxr) zostaje przeniesiona z jednej chromatydy chromosomu Y na chromatydę chromosomu X (ryc. 1). Fakt, że osobniki potomne XX

Sxr są samcami, dowodzi, iż przeniesiony fragment zawiera locus Tdy kontrolujący determinację płci w kierunku męskim, zaś występowanie procesu crossing over świadczy o tym, że chromosomy X i Y są na pewnym niewielkim odcinku homologiczne. Odcinek ten został nazwany segmentem pseudoautosomalnym [8], gdyż zawarte w nim loci dziedziczą się pozornie jak autosomalne. U normalnych myszy (bez czynnika Sxr) crossing over między chromosomami X i Y nie powoduje zakłóceń determinacji płci, gdyż locus Tdy mieści się w pobliżu centromeru, a segment pseudoautosomalny na przeciwnym, dystalnym końcu chromosomu Y (ryc. 1).

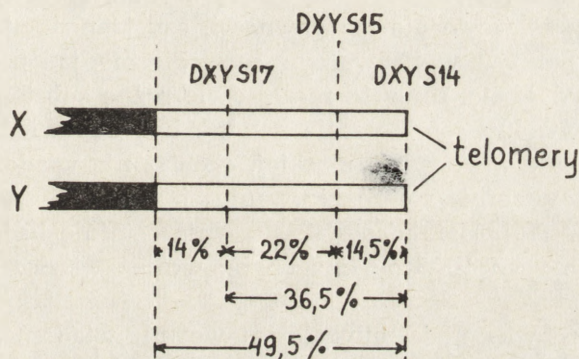


Ryc. 1. a — chromosom Y u normalnego samca myszy oraz u samca z czynnikiem Sxr; b — koniugacja i crossing over u samca myszy XY Sxr; c — u człowieka (częściowo wg [53], zmodyfikowane). Odcinki jasne oznaczają segmenty homologiczne (w wielkości znacznie przesadzonej w stosunku do rzeczywistych proporcji), odcinki czarne — segmenty niehomologiczne w chromosomach X i Y; fragmenty zawierające locus Tdy zakreskowane

Ostatnio udowodniono występowanie crossing over między chromosomami płci także u normalnych mężczyzn. Rouyer i wsp. [59] wyizolowali trzy różne sondy DNA wykrywające 3 polimorficzne loci w krótkim homologicznym segmencie pseudoautosomalnym chromosomów X i Y człowieka, a następnie, stosując endonukleazy restrykcyjne, przeanalizowali dziedziczenie tego polimorfizmu w 8 wielodzietnych rodzinach. Wykazali regularną rekombinację między badanymi loci, przy czym locus położony najbliżej telomeru ulegał wymianie z częstością 50%, co świadczy o występowaniu obligatoryjnego crossing over w regionie homologicz-



nym (ryc. 1,2). Rekombinacje między badanymi loci zachodziły około 10 razy częściej w mejozie u mężczyzn niż u kobiet, przypuszczalnie dlatego, że u mężczyzn chromosomy XY mają możliwość wymiany tylko w tym właśnie krótkim segmencie homologicznym, natomiast u kobiet para XX jest homologiczna na całej długości, toteż obligatoryjny crossing over może występować w dowolnym miejscu. Jak zauważa Ohno [53], u człowieka (w przeciwieństwie do normalnych samców myszy) lokalizacja determinującego płeć męską locus Tdy jest bardzo niefortunna, gdyż mieści się on tak blisko podlegającego wymianie segmentu pseudoautosomalnego (ryc. 1), że może zostać przeniesiony w wyniku nietypowego crossing over na chromosom X, prowadząc do powstania niepłodnych mężczyzn XX.



Ryc. 2. Mapa genetyczna segmentu pseudoautosomalnego chromosomów X i Y człowieka (na podstawie [59] uproszczone). Odcinki jasne oznaczają segmenty homologiczne, odcinki czarne — początek segmentów niehomologicznych w chromosomach X i Y; procenty pokazują otrzymane doświadczalnie częstości rekombinacji między loci wykrywanych przez 3 sondy DNA: DXYS17, DXYS15 i DXYS14

Wciąż jeszcze nie wiadomo, co jest produktem locus Tdy, a poszukiwanie odpowiedzi na to pytanie ma długą historię, której początek sięga 1955 r., kiedy Eichwald i Silmsler [14] odkryli, że w obrębie szczepu wsobnego myszy samice odrzucają przeszczepy skóry samców. Efekt ten przypisano obecności na komórkach samców antygeny powierzchniowego, produkowanego pod kontrolą genu w chromosomie Y. Gen został nazwany H-Y, zaś sam antygen — antygenem transplantacyjnym H-Y. Testami serologicznymi wykryto później specyficznie męski antygen rozpuszczalny [25], uważając, że jest to również produkt genu H-Y. Wkrótce potem Wachtel i wsp. [74] wysunęli hipotezę, że właśnie antygen H-Y jest tym poszukiwanym produktem genu determinującego rozwój gonady w kierunku męskim. Zgodnie z tą hipotezą, antygen H-Y wydzielany przez komórki Sertoliego ma być wiązany przez specyficzne receptory komórek pierwotnej gonady, co powoduje jej różnicowanie się w jądro.

Locus H-Y byłby więc równoznaczny z locus Tdy. Hipotezę tę popierały m.in. wyniki doświadczeń nad rozwojem niezróżnicowanej gonady płodowej cielecia *in vitro*. Dodanie do środowiska hodowlanego wyciągu tkankowego z rozpuszczalnym antygenem H-Y powodowało przekształcenie się gonady XX w strukturę męską. Natomiast zdysocjowane komórki jądrowe XY pod wpływem przeciwciał przeciw H-Y nie agregowały, jak normalnie, w kanaliki, lecz organizowały się w pęcherzyki (przegląd piśmiennictwa [26]).

Jednakże w konfrontacji z wynikami badań nad poziomem antygeny H-Y u osobników z zaburzeniami determinacji płci u różnych gatunków ssaków, ta atrakcyjna hipoteza zaczęła budzić wątpliwości, chociaż niektórzy, np. Ohno [53], zdecydowanie jej bronią. Trudności metodyczne [77] powodują, że wcale nie ma pewności, czy transplantacyjny antygen H-Y jest identyczny z wykrywalnym serologicznie, jak początkowo przypuszczano. Wydaje się, że są to raczej dwie różne substancje, przy czym antygen wykrywalny serologicznie mógłby być odpowiedzialny za organizację kanalików w gonadzie męskiej, chociaż nie wiadomo, czy ma jakiś wpływ na wcześniejsze różnicowanie się komórek Sertoliego w związku gonady [76]. Natomiast jak sugerują ostatnie badania [9], transplantacyjny antygen H-Y nie ma chyba wcale związku z determinacją płci.

Sprawa jest więc nadal otwarta i nawet nie wiadomo, czy locus Tdy jest genem strukturalnym, kodującym jakieś białko odpowiedzialne za różnicowanie się gonady w jądro, czy też jest tylko genem regulatorowym. Co więcej, w doświadczeniach nad mieszańcami między wsobnymi szczepami myszy laboratoryjnych a osobnikami z populacji dziko żyjących zidentyfikowano także locus autosomalny, którego prawidłowe współdziałanie z genem Tdy decyduje o determinacji płci męskiej, a w przypadku niezgodności między tymi dwoma genami powstają osobniki XY o fenotypie żeńskim [13]. Można przypuszczać, że odnosi się to także do innych gatunków ssaków.

#### CHROMOSOMY PŁCI A FENOTYPOWA PŁEĆ GONADY

Nasuwa się pytanie, czy o determinacji rozwoju w kierunku męskim decyduje skład chromosomowy komórek całego organizmu, czy raczej samej gonady. Informacji na ten temat dostarczyły badania nad chimerami powstałymi przez złączenie zarodków o różnej płci genetycznej. Podsumowanie wyników doświadczeń wykonanych w różnych pracowniach [49] wskazuje, że chimery powstałe ze złączenia zarodków XX i XY (chimery XX  $\longleftrightarrow$  XY) różnicują się przeważnie jako samce; samice zaś

zdarzają się głównie przy niewielkim udziale komórek XY (15 - 20%). Wyniki te sugerują, że po przekroczeniu pewnego krytycznego poziomu komórek XY, determinacja postępuje w kierunku męskim. O tym, że ta kontrola ma charakter raczej lokalny niż systemowy, świadczą zdarzające się sporadycznie osobniki interseksualne, które mają po jednej stronie jajnik, a po drugiej jądro, albo też po jednej stronie ovotestis, a po drugiej wyglądający normalnie jajnik lub jądro [49].

Co więcej, nie zróżnicowane jeszcze płciowo gonady, izolowane z 11,5-dniowego zarodka myszy rozwijają się *in vitro* zgodnie ze swą płcią chromosomową [68]. A więc przynajmniej od pewnego stadium kierunku różnicowania się płciowego zależy od komórek samej gonady. Ale jakie komórki odgrywają w tym procesie decydującą rolę?

Wiadomo, że w utworzeniu gonady biorą udział dwie populacje komórek: somatyczne, pochodzenia mezodermalnego (które tworzą listwę płciową i z których różnicują się potem komponenty somatyczne gonady) oraz komórki prapłciowe, które różnicują się wcześniej w innej okolicy zarodka i potem migrują do zawiązka gonady. Tylko komórki prapłciowe dają początek linii płciowej, która wytworzy komórki rozrodcze: jaja lub plemniki. Ponieważ u normalnych osobników komórki zarówno somatyczne, jak i prapłciowe, mają ten sam skład chromosomowy, nie wiadomo, które z nich wywierają decydujący wpływ na kierunek rozwoju gonady. Do zbadania tego problemu posłużyły chimery powstałe przez złączenie zarodków o genotypie normalnym z homozygotycznymi nosicielami mutacji W (white spotting). Mutacja ta powoduje [63], że komórki prapłciowe zamierają przed osiągnięciem zawiązka gonady, trafiają tam więc tylko bardzo nieliczne. W takim układzie, kiedy komórki XY pochodziły od mutantu, a komórki XX od zarodka normalnego, w pewnych przypadkach chimery miały normalnie zróżnicowane jądro. Musiały o tym zadecydować komórki somatyczne XY mutantu, mimo że przeważająca większość komórek prapłciowych pochodziła z komponentu XX [49].

Te wyniki wskazywałyby, że same komórki prapłciowe nie decydują o fenotypowej płci gonady. Wydaje się, że jest odwrotnie: środowisko gonady wywiera wpływ na kierunek determinacji rozwojowej komórek linii płciowej.

#### ROZNICOWANIE SIĘ KOMÓREK LINII PŁCIOWEJ W KIERUNKU ŻEŃSKIM LUB MĘSKIM

W okresie migracji komórki prapłciowe męskie i żeńskie zachowują się jednakowo, ale po zasiedleniu zawiązka gonady (ok. 11 dnia życia płodowego u myszy) i odbyciu kilku mitoz, ich drogi rozwojowe się rozcho-

dzą. Po ostatniej rundzie replikacji (ok. 14 dnia życia płodowego) komórki żeńskie wchodzą już w profazę mejotyczną stając się oocytami, natomiast w tym samym czasie komórki męskie zatrzymują się w fazie  $G_1$  cyklu mitotycznego jako prospermatogonia, a ich dalsze podziały i różnicowanie się zachodzą dopiero w okresie postnatalnym.

Kierunek różnicowania się komórek linii płciowej zależy właśnie od tego, czy podejmą one mejozę w tym wczesnym, charakterystycznym dla danego gatunku stadium krytycznym. Te, które mejozę podejmą, podlegają oogenezie, pozostałe zaś albo degenerują albo podlegają spermatogenezie [48]. Nie wiadomo na pewno, czy o rozpoczęciu mejozy decyduje specyficzna substancja (MIS — meiosis inducing substance), postulowana przez Byskov [10], czy też proces ten przebiega autonomicznie, jeżeli nie zostanie zablokowany przez inhibitor wydzielany przez gonadę męską [50]. W każdym razie nie wydaje się, żeby ten etap — decydujący dla kierunku różnicowania się komórek linii płciowej — zależał od ich własnej konstytucji genetycznej.

W jajniku myszy mejozę w okresie zarodkowym podejmują komórki zarówno XX, jak XO, a co więcej, nawet komórki XY mogą w różnych sytuacjach podlegać oogenezie, np. w jajnikach samic chimer  $XX \longleftrightarrow XY$  [19, 23], we fragmentach embrionalnych jąder przeszczepionych pod kapsułę nerkową [54, 55], czy w nadnerczach zarodków męskich [29, 71], jakkolwiek później degenerują.

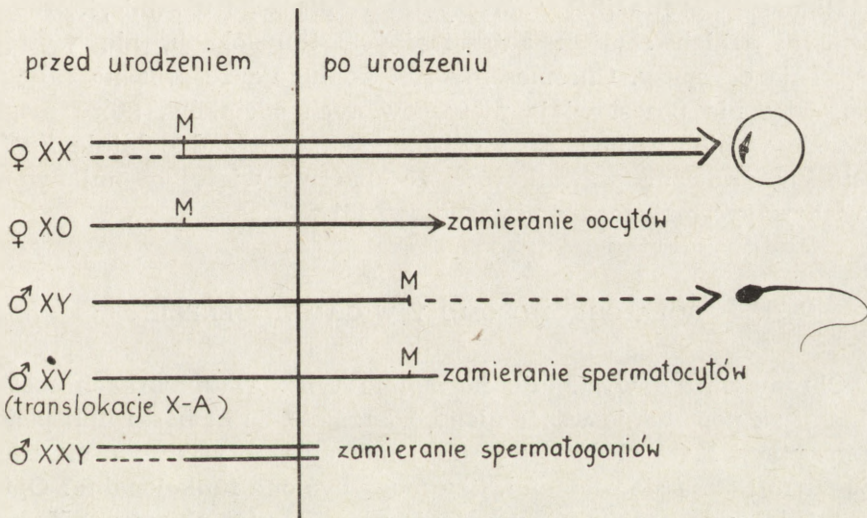
Natomiast komórki linii płciowej (XY, XO, a nawet większość XX), które znalazły się w środowisku jądra, nie rozpoczynają mejozy w okresie krytycznym i zostają zdeterminowane w kierunku męskim [50]. Tak więc do tego momentu włącznie losy komórek linii płciowej zależą w znacznym stopniu od środowiska, do jakiego trafiają. Ale na ich dalszy rozwój wywierają już decydujący wpływ zawarte w nich chromosomy płci, a zwłaszcza chromosomy X.

#### AKTYWNOŚĆ CHROMOSOMÓW X W GAMETOGENEZIE

Zgodnie z teorią Lyon [44] w komórkach somatycznych samic ssaków tylko jeden chromosom X jest aktywny metabolicznie, podczas gdy drugi silnie zespiralizowany, heteropiknotyczny i widoczny jako ciało Barra jest nieaktywny. Inaktywacja ta zachodzi we wszystkich komórkach w stadium blastocysty. Jednakże później w oocytach, w okresie wchodzenia ich w profazę mejozy, następuje reaktywacja nieczynnego dotąd chromosomu X (ryc. 3) i w dojrzałym oocyty oba chromosomy X są aktywne [75]. Brak drugiego chromosomu X u samic XO powoduje obumieranie oocytów, które rozpoczyna się wkrótce po urodzeniu i za-

leżnie od gatunku może prowadzić do całkowitej sterylności (np. u ludzi) lub też tylko do skrócenia okresu aktywności rozrodczej, np. u myszy [46]. Prawdopodobnie więc chromosom X koduje jakieś białka, których podwójny poziom sprzyja przeżywaniu oocytów.

Diametralnie odmienna sytuacja występuje u samców (ryc. 3). Mają one normalnie tylko jeden chromosom X, a obecność drugiego (który, jak wykazano u zarodków męskich XX Sxr, ulega reaktywacji w tym samym okresie co u samic [51]) powoduje zamieranie spermatogoniów już zaraz po urodzeniu i całkowitą sterylność u wszystkich gatunków ssaków, u których samce XXY zidentyfikowano [61]. Tak więc podwójna dawka produktów chromosomu X, tak korzystna dla przeżywania oocytów, jest letalna dla spermatogoniów, choć oczywiście nie wiadomo, czy w obu przypadkach chodzi o te same produkty [48].



Ryc. 3. Aktywność chromosomów X w komórkach linii płciowej u myszy — chromosom X aktywny, --- nieaktywny, M — początek profazy mejotycznej

Co więcej, i ten jedyny chromosom X u normalnych samców ulega inaktywacji i staje się heteropiknotyczny w spermatocytach od początku profazy mejotycznej (ryc. 3). Lifschytz i Lindsley [43] zgromadzili dowody na poparcie hipotezy, że dla dalszego przebiegu spermatogenezy inaktywacja ta jest niezbędna, a każdy proces, który ją zakłóca, prowadzi do sterylności samców. Tym można tłumaczyć bezpłodność towarzyszącą np. translokacjom między chromosomem X a autosomem, kiedy to zamieranie spermatocytów następuje już w pachytenie.

Z kolei Forejt [24] wykazał, że analogicznie da się wytłumaczyć także przyczynę sterylności samców z wzajemnymi, zrównoważonymi

translokacjami pomiędzy różnymi autosomami. Autor ten wykazał na preparatach cytologicznych, że w pachytenie niesparowane odcinki kwadriwalentów z translokacjami wchodzą w niehomologiczne asocjacje z długimi niesparowanymi odcinkami chromosomów X i Y (które koniugują ze sobą tylko terminalnie), co prawdopodobnie zaburza inaktywację chromosomu X. W rezultacie następuje zahamowanie spermatogenezy: niektóre komórki zamierają już w trakcie mejozy, inne dochodzą do stadium spermatyd, ale też degenerują. Ta zmienność, występująca nawet między komórkami tego samego osobnika, jest uwarunkowana przypuszczalnie przebiegiem koniugacji, gdyż asocjacje występują nieregularnie i w różnym nasileniu. Wydaje się więc, że losy spermatocytów zależą od tego, jak zachowują się ich własne chromosomy w mejozie, a komórki sąsiadujące nie mają na to wpływu.

Hipoteza Forejta [24] tłumaczy także, dlaczego u samic, które są nosicielkami takich samych autosomalnych translokacji, nie występują zaburzenia oogenezy. Chromosomy XX koniugują ze sobą na całej długości, więc nie pozostawiają niesparowanych odcinków, które mogłyby wchodzić w niehomologiczne asocjacje. Ten przykład dobitnie ilustruje często obserwowaną prawidłowość, że znacznie więcej czynników może upośledzać spermatogenezę niż oogenezę [61].

#### ROLA CHROMOSOMU Y W GAMETOGENEZIE

Chromosom Y występuje normalnie tylko w komórkach męskich. Jednak, jak poprzednio wspomniano, zdarza się, że komórki linii płciowej o konstytucji XY wchodzą w profazę mejozy w krytycznym okresie zarodkowym i stają się oocytami. Czy mogą być one funkcjonalne? Opisano dotąd jeden przypadek [23] urodzenia przez samicę chimerę  $XX \leftrightarrow XY$  osobnika pochodzącego z komponentu XY matki (o czym świadczyły markery genetyczne), od której otrzymał swój chromosom Y. Interpretację tego wyniku komplikuje fakt, że samiec ten miał nietypowy skład chromosomowy XXY, powstały przypuszczalnie w wyniku nondysjunkcji, jaka zaszła w oocyocie lub jeszcze w czasie podziału mitotycznego oogonium, i być może obecność dwu chromosomów X zdecydowała o żywotności tego oocytu. Niemniej jednak przypadek ten zdaje się świadczyć, że obecność chromosomu Y nie wyklucza możliwości normalnej oogenezy. To samo dotyczy fragmentu Sxr, co wykazała analiza wyjątkowych osobników  $XX Sxr$ , które (z powodu preferencyjnej inaktywacji chromosomu X z czynnikiem Sxr w komórkach somatycznych gonady) stają się samicami i przekazują czynnik Sxr potomstwu [48].

Oczywiście jednak znacznie ważniejsze jest pytanie, jaką rolę speł-

nia chromosom Y w spermatogenezie. Już dawno Darlington [35] postulował, że dla zapewnienia prawidłowej segregacji chromosomów w I podziale mejozy, w każdym biwalencie musi wystąpić przynajmniej jedna chiazma i crossing over. Przez długi czas nie było dowodu, aby miało się to też odnosić do pary chromosomów XY, które koniugują ze sobą tylko na bardzo małym końcowym odcinku. Niektórzy autorzy jeszcze do niedawna utrzymywali, że synapsa między chromosomami X i Y dotyczy regionów niehomologicznych i że w pachytenie, kiedy mógłby ewentualnie zajść crossing over, występuje tylko achiazmatyczna asocjacja telomerów [2,3]. Obecnie, kiedy mamy przekonujące dowody świadczące o wymianie materiału genetycznego w regionie homologicznym chromosomów X i Y zarówno u myszy, jak u człowieka (por. rozdział o determinacji płci), można przypuszczać, że odnosi się to także do innych gatunków ssaków. Co więcej, wydaje się, że utworzenie chiazmy i crossing over między chromosomami X i Y jest niezbędne nie tylko do prawidłowej segregacji chromosomów w mejozie, ale i do normalnego różnicowania się spermatyd [8].

Wyrażano opinię [48], że rola chromosomu Y w spermatocytach polega właśnie tylko na dostarczeniu chromosomowi X partnera do utworzenia chiazmy, zwłaszcza że chromosom Y, podobnie jak X, staje się nieaktywny począwszy od profazy mejozy. Z drugiej strony badania przeprowadzone w naszym zakładzie na szczepach wsobnych myszy różniących się efektywnością zapłodnienia i poziomem nienormalności morfologicznych plemników wykazały, że chromosom Y odgrywa ważną rolę w dziedziczeniu tych cech [37, 40, 41], a wyniki te wskazywałyby na istnienie w chromosomie Y genu kontrolującego prawidłowy przebieg spermatogenezy. Ostatnio ukazała się praca o wykryciu takiego genu, który zdaje się działać bezpośrednio w spermatocytach.

Burgoynne i wsp. [9] testowali myszy z czynnikiem Sxr w celu sprawdzenia omówionej tu już hipotezy [74], że czynnikiem determinującym płęć męską u ssaków jest antygen transplantacyjny H-Y, kodowany przez locus H-Y równoważny z Tdy. Zgodnie z hipotezą antygeny tego nie produkowały normalne samice, natomiast występował on zarówno u normalnych samców, jak i samców XX Sxr, które — jak wiemy — zawierają odcinek determinujący płęć męską, przeniesiony w czasie mejozy z chromosomu Y na chromosom X. Przypadkowo znaleziono mutanty, oznaczone jako XX Sxr', które nie produkowały antygeny H-Y, co jednak nie spowodowało zaburzeń determinacji płci męskiej. Zarówno samce XX Sxr, jak XX Sxr' były oczywiście sterylne z powodu obecności dwu chromosomów X.

Aby się pozbyć niekorzystnego wpływu drugiego chromosomu X, autorzy [9] wyprodukowali przez odpowiednie krzyżowanie osobniki XO

Sxr i XO Sxr'. Samce XO Sxr były pozytywne pod względem antygeny H-Y, wykazywały wszystkie stadia spermatogenezy, tworzyły nawet nieliczne i bardzo zniekształcone plemniki — prawdopodobnie defekt był spowodowany brakiem chromosomu Y jako partnera do koniugacji z chromosomem X. Natomiast samce XO Sxr' były negatywne pod względem antygeny H-Y, a spermatogeneza zatrzymywała się u nich bardzo wcześnie, już na etapie spermatocytów, z których tylko nieliczne dochodziły do stadium pachytenu. Wyniki te wskazują, że zmutowany czynnik Sxr' zachował gen determinujący płęć męską, ale utracił jakiś gen wpływający na normalny przebieg spermatogenezy. Ponieważ osobniki te były negatywne pod względem antygeny H-Y, więc kodujący go locus H-Y może być właśnie „genem spermatogenezy” albo jest z nim bardzo blisko sprzężony. Skoro czynnik Sxr pochodzi z chromosomu Y, to wariant Sxr' można traktować jako mutację (albo może delecję) genu w chromosomie Y. Zbadano także samca mozaikowego XO/XY, którego gonady zawierały strefy normalnych kanalików nasiennych oraz strefy ze spermatogenezą zatrzymaną na tym samym stadium co u samców XO Sxr'. Autorzy wnioskujeją, że skoro spermatocyty XO nie mogą zostać „uratowane” przez występujące w gonadzie somatyczne komórki XY, to widocznie postulowany gen spermatogenezy może wywierać efekt tylko wtedy, gdy znajduje się w samym spermatocycie. Nie wiadomo jednak, kiedy dochodzi do jego ekspresji.

#### PROBLEM HAPLOIDALNEJ EKSPRESJI GENÓW

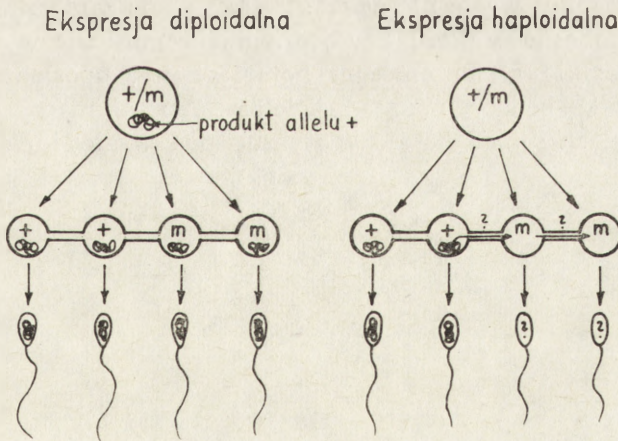
Oocyty, które weszły w profazę mejozy pod koniec życia płodowego, zatrzymują się w stadium diplotenu i formują aktywne metabolicznie jądro (tzw. pęcherzyk zarodkowy). Dopiero w okresie aktywności rozrodczej, na kilka godzin przed owulacją danego oocytu, następuje w nim wznowienie mejozy i wydzielenie I ciała kierunkowego. Nie ulega więc wątpliwości, że wzrost oocytu i synteza składników decydujących o fenotypie komórki jajowej odbywa się pod kontrolą genomu diploidalnego.

Natomiast w procesie spermatogenezy, dopiero po ukończeniu mejozy, haploidalne już spermatydy podlegają skomplikowanym procesom różnicowania, doprowadzającym do wykształcenia bardzo wyspecjalizowanej, charakterystycznej postaci plemnika. Czy odbywa się to pod kontrolą haploidalnego genomu? Wprawdzie pod koniec spermiogenezy zachodzi w spermatydzie kondensacja chromatyny prowadząca do inaktywacji całego genomu i utraty aparatu transkrypcji, ale dopóki to nie nastąpi, ekspresja własnych genów spermatydy jest teoretycznie możliwa. Wiadomo, że synteza białek zachodzi aż do późnej spermiogenezy



[36], a pytanie, czy odbywa się to poprzez ekspresję haploidalnego genomu, było przedmiotem niezwykle ożywionej dyskusji (przegląd piśmiennictwa [17]).

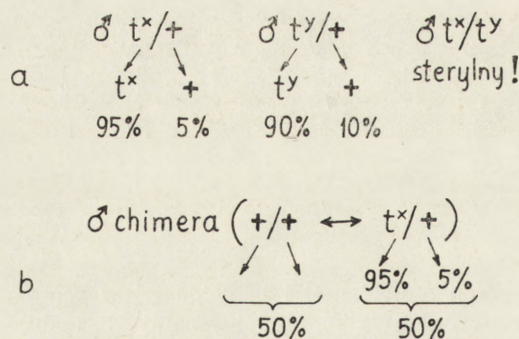
Zdawać by się mogło, że problem ten powinien dać się łatwo rozstrzygnąć na podstawie analizy gamet produkowanych przez heterozygotyczne samce odpowiednio dobranych genotypów. Wiadomo np., że szczepy wsobne myszy różnią się bardzo wyraźnie pod względem łatwo mierzalnych wskaźników, jak wymiary i proporcje główki plemnika, przy czym cechy te są w bardzo wysokim stopniu odziedziczalne [5]. W przypadku haploidalnej ekspresji genu heterozygotyczny samiec powinien by więc produkować dwie populacje plemników, charakterystyczne dla obu form wyjściowych. Ponieważ żadnej segregacji nie stwierdzono [5], panuje przekonanie, że fenotyp plemnika nie kształtuje się pod kontrolą haploidalnego genomu zawartego w spermatydzie, lecz pod kontrolą genów diploidalnych, których ekspresja następuje jeszcze przed mejozą, a ich produkty zostają przekazane do wszystkich spermatyd powstałych po podziale. Taką interpretację komplikuje jednak fakt, że spermatydy są ze sobą połączone mostkami cytoplazmatycznymi [21], które mogą umożliwiać wymianę ewentualnych produktów haploidalnych genów między sąsiadującymi komórkami i zapobiegać powstawaniu różnic między plemnikami (por. ryc. 4).



Ryc. 4. Schemat ekspresji diploidalnej i haploidalnej w spermatogenezie heterozygotycznego samca  $+/m$ . Jeżeli tylko allel normalny  $+$  koduje białko ważne dla procesu spermiogenezy, wówczas w przypadku ekspresji haploidalnej będzie ono syntetyzowane tylko przez 2 z czterech spermatyd. Oczekiwany efekt segregacji dwu fenotypów plemników może jednak nie wystąpić, jeżeli produkt allelu  $+$  przedostanie się do spermatyd ze zmutowanym allelem  $m$

Przez długi czas uważano [5], że jedyny dobrze udokumentowany przykład haploidalnej ekspresji genów w spermatogenezie ssaków dotyczy kompleksu T/t zlokalizowanego w 17 chromosomie myszy. W jego skład wchodzi m.in. seria recesywnych alleli t, które utrzymują się w wysokich frekwencjach w populacjach dzikich myszy, mimo że w układzie homozygotycznym prowadzą do letalności zygot. Ten zadziwiający polimorfizm wynika stąd, że heterozygotyczne samce t/+ przekazują potomstwu znacznie częściej zmutowany allel t niż normalny +. Efekt ten tłumaczono większą zdolnością zapładniającą plemników wyposażonych w allel t, a więc jego haploidalną ekspresją. Bliższe szczegóły odnoszące się do analizy genetycznej kompleksu T/t można znaleźć w artykule Styry [67].

Ostatnio Seitz i Bennett [62] przeanalizowali potomstwo samców chimer  $+/+ \leftrightarrow t/+$ , uzyskanych przez złączenie normalnych zarodków męskich  $+/+$  z również męskimi zarodkami heterozygotycznymi t/+. Odpowiednio dobrane markery genetyczne zwierząt użytych do produkcji chimer oraz samic, z którymi te chimery potem kojarzono, pozwalały zidentyfikować pochodzenie potomstwa. Okazało się, że w tym układzie plemniki z allelem t utrzymały swą przewagę nad plemnikami z allelem +, ale tylko swojego „partnera w mejozie”, czyli pochodzącymi od komponentu t/+ chimery, natomiast nie wykazały żadnej przewagi nad plemnikami z allelem + pochodzącymi z komponentu  $+/+$  chimery (ryc. 5). Wynik ten prowadzi do wniosku, że sam fakt występowania allelu t w plemniku wcale nie zwiększa jego szans zapłodnienia. Wydaje się raczej, że obecność allelu t w jednym chromosom wywiera jakieś szkodliwe działanie na chromosom homologiczny, upośledzając później funkcję plemnika będącego jego nosicielem. Tym tłumaczy się paradoksalna sytuacja, że samce heterozygotyczne pod względem dwu różnych



Ryc. 5. a — nielosowe przekazywanie potomstwu alleli t przez heterozygotyczne samce; b — wyniki doświadczenia [62] nad przekazywaniem allelu t przez samca chimere  $+/+ \leftrightarrow t/+$

allele  $t$  (samce  $t^x/t^y$ ) są całkowicie sterylne, gdyż w tym przypadku oba chromosomy nawzajem się uszkadzają [62]. Nie wiadomo, czy uszkodzenie to następuje jeszcze w komórce diploidalnej, np. w czasie synapsy, czy też już później poprzez przeniesienie jakiegoś produktu allelu  $t$  przez mostki cytoplazmatyczne między spermatydami [62].

Omawiając ten niezwykle interesujący efekt allelu  $t$  w spermatogenezie, trzeba znowu podkreślić, iż nie wywiera on żadnego wpływu na oogenezę, gdyż samice  $t/+$  przekazują potomstwu oba allele w równych proporcjach.

Problem haploidalnej ekspresji genów decydujących o fenotypie plemnika powinien zostać wkrótce wyjaśniony dzięki zastosowaniu bezpośrednich metod, jakimi dysponuje obecnie genetyka molekularna. Niedawno Distel i wsp. [12] zidentyfikowali w komórkach pomejotycznych u samców myszy, w stadium okrągłych i wydłużających się spermatyd, transkrypty RNA komplementarne do pewnych sekwencji DNA genu kodującego  $\alpha$ -tubulinę; transkrypty te nie występowały ani w spermatocytach mejotycznych w pachytenie, ani w żadnych innych badanych tkankach. Autorzy interpretują ten wynik jako dowód na haploidalną ekspresję strukturalnego genu u ssaków i przypuszczają, że zsyntetyzowana na matrycy tego genu  $\alpha$ -tubulina wchodzi w skład mikrotubul tworzących manszet główki i aksonemę wici spermatydy, a więc struktur odgrywających zasadniczą rolę w kształtowaniu się postaci plemnika.

Można oczekiwać, że najbliższe lata przyniosą więcej takich przykładów. O tym jednak, że w haploidalną ekspresję nie jest chyba zaangażowana wielka liczba genów, zdają się świadczyć badania aneuploidalności gamet (określanej na podstawie liczby ramion chromosomowych lub zawartości DNA) produkowanych przez nosicieli heterozygotycznych translokacji Robertsona, powodujących nieprawidłową segregację chromosomów w mejozie [22, 66]. Wprawdzie samce takie mają podwyższony poziom nienormalności plemników, a wśród form zniekształconych występują największe wahania zawartości DNA, jednak znaczną aneuploidalność stwierdzono także wśród normalnych fenotypowo i funkcjonalnych plemników. Oczywiście są one niepełnowartościowe pod względem genetycznym, gdyż po zapłodnieniu powstają aneuploidalne zygoty, których rozwój najczęściej kończy się śmiercią już we wczesnym okresie zarodkowym. Skoro jednak spermatydy o niekompletnych genomach mogą się różnicować w funkcjonalne plemniki, to widocznie geny zawarte w brakujących odcinkach chromosomów (stanowiących około 1/15 haploidalnego genomu [22]), nie są normalnie czynne w haploidalnej spermatydzie. Ocenę znaczenia tych wyników dla wyjaśnienia problemu haploidalnej ekspresji utrudnia fakt, że nie znamy ani lokalizacji, ani ogólnej liczby genów, których produkty biorą udział w spermiogenezie.

## CZY KOMÓRKI SOMATYCZNE MOGĄ MODYFIKOWAĆ FENOTYP GAMET?

Jak już podkreślano, w przeciwieństwie do początkowych etapów, kiedy kierunek różnicowania się komórek linii płciowej zależy w znacznej mierze od otaczającego je środowiska, dalszy przebieg gametogenezy wydaje się kontrolowany przez geny zawarte w samych gametocytach. Ponieważ jednak zarówno oocyty, jak spermatoocyty różnicują się w bezpośrednim kontakcie z komórkami somatycznymi, trzeba rozważyć pytanie, czy komórki te mogą wywierać modyfikujący wpływ na fenotyp dojrzącej gamety.

## GAMETY ŻEŃSKIE

W rosnącym pęcherzyku jajnikowym komórki folikularne wysyłają wypustki, które przebijają osłonę przejrzystą i bezpośrednio komunikują się z oocytami poprzez połączenia szczelinowe [1]. Połączenia te utrzymują się do czasu przedowulacyjnego wznowienia mejozy i umożliwiają bezpośrednio przechodzenie różnych jonów oraz drobnocząsteczkowych związków między komórkami folikularnymi a oocytom [15]. Przypuszczalnie drogą pinocytozy przenoszone są także liczne makrocząsteczki, gdyż jak wyliczono na podstawie tempa syntezy białek w rosnącym oocyście, zdążyłby on wytworzyć zaledwie połowę całkowitej zawartości białek obecnych w komórce jajowej w czasie owulacji [60].

Odpowiedzi na pytanie, czy komórki folikularne mogą modyfikować fenotyp oocytu, powinny dostarczyć samice chimery powstałe przez złączenie zarodków o odpowiednio dobranych genotypach. Badania takie podjęto w naszym zakładzie, wykorzystując dwa szczepy wsobne myszy, KE i CBA, które różnią się pod względem cech morfologicznych, jak rozmieszczenie inkluzji lipidowych [73] i liczba ziarn korowych [72] oraz cech fizjologicznych, jak rozpuszczalność osłony przejrzystej [33, 39] oraz efektywność zapłodnienia *in vivo* [38] i *in vitro* [31]. Różnice te są w prosty sposób uwarunkowane genetycznie, co wykazano na podstawie segregacji cech oocytów produkowanych przez mieszańce pokolenia F<sub>2</sub> [32, 73]. Ponieważ szczepy KE i CBA mają odmienne warianty elektroforetyczne izomerazy glukozy-fosforanowej [58], przy pomocy tego markera u chimer KE ↔ CBA daje się identyfikować pochodzenie zarówno pojedynczych oocytów, jak i otaczającego je wieńca komórek folikularnych.

Dotychczasowa analiza nie wykazała, aby cechy morfologiczne oocytów i rozpuszczalność osłony przejrzystej były modyfikowane przez komórki somatyczne odmiennego genotypu. U chimer KE ↔ CBA, produkujących potomstwo pochodzące wyłącznie z komponentu KE,

ocyty miały bowiem właściwości charakterystyczne dla tego szczepu, mimo iż otaczające je komórki folikularne pochodziły zarówno z komponentu KE, jak i CBA (Wabik-Śliz, dane nie publikowane).

Według dostępnych danych z piśmiennictwa, jedyny opisany dotąd przykład wpływu komórek somatycznych na genetycznie uwarunkowane właściwości oocytów dotyczy przebiegu mejozy. W szczepie myszy NMRI/Han, u samic stymulowanych egzogennymi gonadotropinami, około 10% oocytów jest trwale zablokowanych w metafazie I [27, 28], a na podstawie analizy chimer autorzy uważają, że cecha ta może być modyfikowana przez komórki somatyczne odmiennego genotypu [4]. Taki efekt wydawałby się teoretycznie prawdopodobny, ponieważ w kontroli przedowulacyjnego wznowienia mejozy pośredniczą komponenty somatyczne pęcherzyka jajnikowego [16]. Jednak wyniki przytoczonego doświadczenia [4] nie są przekonujące ze względu na bardzo małą liczebność zwierząt i dużą zmienność cechy.

Badane przez nas szczepy KE i CBA różnią się również bardzo istotnie pod względem tempa dojrzewania mejozy przedowulacyjnych oocytów [42], a cecha ta dziedziczy się jednogenowo [73]. Wydaje się, że jest ona jednak determinowana przez sam oocyt, gdyż charakterystyczny dla danego szczepu przebieg mejozy utrzymywał się także w warunkach *in vitro*, w hodowli oocytów bez komórek folikularnych [57]. Ponadto u chimer KE  $\longleftrightarrow$  CBA tempo mejozy oocytów KE nie ulegało modyfikacji, mimo że otaczające je komórki folikularne pochodziły zarówno z komponentu KE, jak CBA (Wabik-Śliz, dane nie publikowane). Nie mamy więc, jak dotąd, przekonujących dowodów modyfikacji fenotypu oocytów przez komórki folikularne.

#### GAMETY MĘSKIE

Również w czasie spermiogenezy istnieje bezpośredni i bardzo ścisły kontakt między komórkami somatycznymi a rozrodczymi. Różnicująca się spermatyda jest głęboko pogrążona w komórce podporowej (Sertoliego), a poprzez połączenia między nimi zachodzi wymiana metabolitów i odbywa się transport substancji niezbędnych dla dojrzewania komórki rozrodczej (przegląd literatury [6]). Postulowano nawet, że kształt spermatydy może być modelowany przez mechaniczny nacisk wywierany ze strony komórki Sertoliego [56]. Jednakże Fawcett i wsp. [20], na podstawie ultrastrukturalnych badań porównawczych nad przebiegiem spermiogenezy w różnych grupach zwierząt, doszli do wniosku, że kształt główki plemnika zależy od genetycznie uwarunkowanego wzoru agregacji DNA i białek w czasie kondensacji chromatyny, a więc jest zdeterminowany przez samą komórkę rozrodczą.

Pogląd taki zdają się popierać doświadczenia przeprowadzone przez Burgoyne'a [7] nad chimerami powstałymi przez złączenie zarodków ze szczepów wsobnych myszy, różniących się wskaźnikami rozmiarów i proporcji plemników. Wskaźniki te utrzymywały się u chimer niezmienione, nie wykazując żadnego modyfikującego wpływu komórek somatycznych.

Analogiczne badania podjęto również w naszym zakładzie na samcach ze szczepów wsobnych myszy KE i CBA, których plemniki są odróżnialne pod mikroskopem na podstawie charakterystycznego kształtu główki, a ponadto różnią się także cechami związanymi z płodnością, jak częstość występowania nienormalności morfologicznych [37] i efektywność zapłodnienia [38], zwłaszcza w warunkach konkurencji, w wyniku heterospermicznego unasienienia [41]. Również i w tym przypadku analiza chimer KE  $\longleftrightarrow$  CBA wykazała, że charakterystyczny dla danego szczepu kształt główki plemnika utrzymuje się mimo obecności komórek obu szczepów w jądrze chimery. Natomiast poziom plemników nienormalnych i wskaźniki zapłodnienia podlegały u niektórych samców pewnym modyfikacjom, jednakże z wyciąganiem definitywnych wniosków trzeba poczekać na zgromadzenie większego materiału (Krzanowska, Wabik-Śliz i Rafiński, dane nie publikowane).

Teoretycznie można by oczekiwać wpływu komórek Sertoliego na komponenty plemnika ważne dla procesu zapłodnienia. Ostatnio np. Kallajoki i wsp. [34], stosując monoklonalne przeciwciała wykrywające akrozynę, wykazali metodami biochemicznymi i immunocytochemicznymi, że enzym ten ulega po raz pierwszy ekspresji w spermatydach już po ustaniu transkrypcji RNA, przy czym zmiany zachodzące we wzorze rozmieszczenia akrozyny sugerują, że może być ona modyfikowana przez komórki Sertoliego. W ten sposób komórki te mogłyby wywierać wpływ na zdolność zapładniającą plemników, gdyż akrozyna odgrywa ważną rolę w procesie wnikania plemnika do komórki jajowej.

Jedyny opisany dotąd przypadek wpływu komórek somatycznych na przebieg spermatogenezy dotyczy sprzężonej z chromosomem X mutacji feminizujących jąder (Tfm — testicular feminization), powodującej brak receptorów dla androgenów. U osobników XY będących nosicielami tej mutacji rozwija się aktywne hormonalnie jądro, ale z powodu braku receptorów dla androgenów osobniki te są fenotypowo żeńskie, a spermatogeneza zatrzymuje się na pierwszym podziale mejozy. Jednakże samce powstałe ze złączenia zarodków męskich normalnych ze zmutowanymi produkowały potomstwo z obu komponentów chimery [45], co świadczy o tym, że zmutowane komórki rozrodcze podlegały prawidłowej spermatogenezie pod wpływem androgenów wiązanych przez receptory nie zmutowanych komórek somatycznych. Ponieważ jednak i u normalnych samców receptory dla androgenów występują przypuszczalnie tylko

w komórkach Sertoliego, a nie w komórkach rozrodczych [6], wynik tego doświadczenia nie ma bezpośredniego związku z omawianym tu zagadnieniem wpływu komórek somatycznych na genetycznie uwarunkowany fenotyp gamety.

#### UWAGI KOŃCOWE

Z przedstawionych w tym artykule danych widać, jak skąpe są jeszcze nasze wiadomości o kontroli genetycznej kolejnych etapów gametogenezy, nawet u tak dobrze poznanego pod względem genetycznym gatunku ssaka, jakim jest mysz. Na zakończenie trzeba jeszcze raz podkreślić, że kontrola ta jest znacznie bardziej skomplikowana u samców niż u samic, gdyż wiele czynników upośledzających spermatogenezę nie wywiera żadnego wpływu na oogenezę. Wydaje się to zrozumiałe, jeżeli porówna się budowę i funkcję gamet żeńskich i męskich. Plemniki opuszczający kanaliki nasienne w jądrze samca musi być doskonale wyposażony w szereg przystosowań morfologicznych i fizjologicznych, aby mógł skutecznie odbyć drogę, która go doprowadzi na miejsce zapłodnienia, oraz aby pokonać wszystkie bariery utrudniające wniknięcie do komórki jajowej i utworzenie przedjądrza. Jest to proces znacznie bardziej skomplikowany niż w przypadku oocyta „owulacja i zejście w dół jajowodu” — jak to żartobliwie określił Searle [61].

Co więcej, wydaje się, że proces spermatogenezy w szczególności sposób modyfikuje genom gamety męskiej ssaków, wyciska na nim piętno (imprinting), które utrzymuje się nawet po wniknięciu plemnika do jaja i utworzeniu zygoty. Do takiego wniosku skłaniają dwie przesłanki. Pierwszą stanowi obserwacja, że u osobnika żeńskiego w komórkach blastocysty, z których utworzą się struktury pozazarodkowe (trofoektoderma i prymitywna endoderma) inaktywacja chromosomu X nie zachodzi w sposób losowy, lecz z reguły inaktywuje się chromosom X pochodzący od ojca, tak jakby był w jakiś sposób naznaczony. Być może, że piętno to potem się zaciera, gdyż w komórkach właściwego zarodka, w których inaktywacja chromosomu X odbywa się o 3 dni później, ma ona już charakter losowy [75].

Drugiej przesłanki dostarczyła embriologia eksperymentalna, a w szczególności badania nad skutkami wymiany przedjądrzy w zygocie, kiedy wykazano, że zastąpienie przedjądrza męskiego przez drugie przedjądrze żeńskie uniemożliwia normalny rozwój zarodka. Nie wiadomo, jaka jest tego przyczyna. Może to być związane np. z przemianami materiału jądrowego, zachodzącymi w spermatydzie, polegającymi na zastąpieniu normalnych białek histonowych chromatyny przez bardziej zasadowe protaminy, albo też z jakąś modyfikacją samego DNA, np. jego

metylacją w plemniku [47]. Genomu ojcowskiego nie udaje się więc u ssaków zastąpić genomem pochodzącym od matki, gdyż nie podlegał on takim modyfikacjom w czasie oogenezy.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ANDERSON, E., ALBERTINI, D. F., Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary, *J. Cell Biol.*, **71**: 680 - 686, 1976.
- [2] ASHLEY, T., A re-examination of the case for homology between the X and Y chromosomes of mouse and man, *Hum. Genet.*, **67**: 372 - 377, 1984.
- [3] ASHLEY, T., Is crossover between the X and Y a regular feature of meiosis in mouse and man?, *Genetica*, **66**: 161 - 167, 1985.
- [4] BARTELS, I., JENDERNY, J., HANSMANN, I., Control of meiosis by somatic cells in mice: inheritance of the meiosis I error „diploidy” and nonexpression in sensitive NMRI/Han oocytes ovulated from chimeras, *Cell Differentiation*, **15**: 189 - 194, 1984.
- [5] BEATTY, R. A., The genetics of the mammalian gamete, *Biol. Rev.*, **45**: 73 - 119, 1970.
- [6] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA, Z., SYSA, P. S., Komórki podporowe (Sertoliego) kanalików nasiennych jąder ssaków, *Post. Biol. Kom.*, **7**: 305 - 332, 1980.
- [7] BURGOYNE, P. S., Sperm phenotype and its relationship to somatic and germ line genotype: A study using mouse aggregation chimeras, *Dev. Biol.*, **44**: 63 - 76, 1975.
- [8] BURGOYNE, P. S., Genetic homology and crossing over in the X<sub>1</sub> and Y chromosomes of mammals, *Hum. Genet.*, **61**: 85 - 90, 1982.
- [9] BURGOYNE, P. S., LEVY, E. R., McLAREN, A., Spermatogenic failure in male mice lacking H-Y antigen, *Nature*, **320**: 170 - 172, 1986.
- [10] BYSKOV, A. G., Regulation of initiation of meiosis in fetal gonads, *Intern. J. Androl., Suppl.* **2**: 29 - 38, 1978.
- [11] CATTANACH, B. M., POLLARD, C. E., HAWKES, S. G., Sex-reversed mice XX and XO males, *Cytogenetics*, **10**: 318 - 337, 1971.
- [12] DISTEL, R. J., KLEENE, K. C., HECHT, N. B., Haploid expression of a mouse testis  $\alpha$ -tubulin gene, *Science*, **224**: 68 - 70, 1984.
- [13] EICHER, E. M., WASHBURN, L. L., WHITNEY, T. B., MORROW, K. W., *Mus poschiavinus* Y chromosome in the C57BL/6 murine genome causes sex reversal, *Science*, **217**: 535 - 537, 1982.
- [14] EICHWALD, E. J., SILMSER, C. R., (komunikat bez tytułu), *Transplant. Bull.*, **2**: 148 - 149, 1955.
- [15] EPPIG, J. J., The relationship between cumulus cell—oocyte coupling, oocyte meiotic maturation and cumulus expansion, *Dev. Biol.*, **89**: 268 - 272, 1982.
- [16] EPPIG, J. J., FRETER, R. R., WARD-BAILEY, P. F., SCHULTZ, R. M., Inhibition of oocyte maturation in the mouse: participation of cAMP, steroid hormones, and a putative maturation-inhibitory factor, *Dev. Biol.*, **100**: 39 - 49, 1983.
- [17] ERICKSON, R. P., LEWIS, S. E., BUTLEY, M., Is haploid gene expression possible for sperm antigens?, *J. Reprod. Immunol.*, **3**: 195 - 217, 1981.
- [18] EVANS, E. P., BURTENSHAW, M. D., Meiotic crossing-over between the



- X and Y chromosomes of male mice carrying the sex-reversing (Sxr) factor, *Nature*, **300**: 443 - 445, 1982.
- [19] EVANS, E. P., FORD, C. E., LYON, M. F., Direct evidence of the capacity of the XY germ cell in the mouse to become an oocyte, *Nature*, **267**: 430 - 431, 1977.
- [20] FAWCETT, D. W., ANDERSON, W. A., PHILLIPS, D. M., Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head, *Dev. Biol.*, **26**: 220 - 251, 1971.
- [21] FAWCETT, D. W., ITO, S., SLAUTTERBACK, D., The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5**: 453 - 460, 1959.
- [22] FORD, C. E., Gross genome unbalance in mouse spermatozoa: does it influence the capacity to fertilize?, *Proc. Int. Symp. The Genetics of the Spermatozoon*, red. Beatty R. A., Gluecksohn-Waelsch S., Edinburgh, New York, 359 - 369, 1972.
- [23] FORD, C. E., EVANS, E. P., BURTENSHAW, M. D., CLEGG, H. M., TUFFREY, M., BARNES, R. D., A functional „sex-reversed” oocyte in the mouse, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **190**: 187 - 197, 1975.
- [24] FOREJT, J., X-Y involvement in male sterility caused by autosome translocations — a hypothesis, [w] *Genetic Control of Gamete Production and Function*, red. Crosignani P. G., Rubin B. L., Acad. Press, New York, 135 - 151, 1982.
- [25] GOLDBERG, E. H., BOYSE, E. A., BENNETT, D., SCHEID, M., CARSWELL, E. A., Serological demonstration of X-Y (male) antigen on mouse sperm, *Nature*, **232**: 478 - 480, 1971.
- [26] HALL, J. L., WACHTEL, S. S., Primary sex determination: genetics and biochemistry, *Molec. Cell Biochem.*, **33**: 49 - 66, 1980.
- [27] HANSMANN, I., EL-NAHASS, E., Incidence of nondisjunction in mouse oocytes, *Cytogenet. Cell Genet.*, **24**: 115 - 121, 1979.
- [28] HANSMANN, I., JENDERNY, J., PROBECK, H. D., Low doses of X-rays decrease the risk of diploidy in mouse oocytes, *Mutat. Res.*, **109**: 99 - 110, 1983.
- [29] HOGG, H., McLAREN, A., Absence of a sex vesicle in meiotic foetal germ cells is consistent with an XY sex chromosome constitution, *J. Embryol. exp. Morph.*, **88**: 327 - 332, 1985.
- [30] JONES, K. W., SINGH, L., Conserved repeated DNA sequences in vertebrate sex chromosomes, *Hum. Genet.*, **58**: 46 - 53, 1981.
- [31] KALETA, E., Influence of genetic factors on the fertilization of mouse ova in vitro, *J. Reprod. Fertil.*, **51**: 375 - 381, 1977.
- [32] KALETA, E., MAJEWSKA, I., Inheritance of solubility properties of the zona pellucida of mouse oocytes. *Genet. Polon.*, **20**: 257 - 264, 1979.
- [33] KALETA, E., POLAK, Z., Solubility properties of the *zona pellucida* of mouse oocytes from inbred strains differing in the number of cortical granules, *Zwierzęta Lab.*, **15**: 53 - 61, 1978.
- [34] KALLAJOKI, M., PARVINEN, M., SUOMINEN, J. J. O., Expression of acrosin during mouse spermatogenesis: a biochemical and immunocytochemical analysis by a monoclonal antibody C 11 H, *Biol. Reprod.*, **35**: 157 - 165, 1986.
- [35] KOLLER, P. C., DARLINGTON, C. D., The genetical and mechanical properties of the sex chromosomes, 1. *Rattus norvegicus* ♂, *J. Genet.*, **29**: 159 - 173, 1934.

- [36] KRAMER, J. M., ERICKSON, R. P., Analysis of stage-specific protein synthesis during spermatogenesis by two-dimensional gel electrophoresis, *J. Reprod. Fertil.*, **64**: 139 - 144, 1982.
- [37] KRZANOWSKA, H., Factor responsible for spermatozoan abnormality located on the Y chromosome in mice, *Genet. Res.*, **13**: 17 - 24, 1969.
- [38] KRZANOWSKA, H., Relation between fertilization rate and penetration of eggs by supplementary spermatozoa in different mouse strains and crosses, *J. Reprod. Fertil.*, **22**: 199 - 204, 1970.
- [39] KRZANOWSKA, H., Rapidity of removal in vitro of the cumulus oophorus and the *zona pellucida* in different strains of mice, *J. Reprod. Fertil.*, **31**: 7 - 14, 1972.
- [40] KRZANOWSKA, H., Inheritance of sperm head abnormality types in mice — the role of the Y chromosome, *Genet. Res.*, **28**: 189 - 198, 1976.
- [41] KRZANOWSKA, H., Interstrain competition amongst mouse spermatozoa inseminated in various proportions, as affected by the genotype of the Y chromosome, *J. Reprod. Fertil.*, **77**: 265 - 270, 1986.
- [42] KRZANOWSKA, H., LORENC, E., KONCEWICZ, A., LIPINA, B., The rate of maturation and fertilizability of oocytes in KE and CBA/Kw female mice with induced superovulation, *Zwierzęta Lab.*, **21**: 3 - 13, 1984.
- [43] LIFTSCHYTZ, E., LINDSLEY, D. L., The role of X chromosome inactivation during spermatogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 182 - 186, 1972.
- [44] LYON, M. F., Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.), *Nature*, **190**: 372 - 373, 1961.
- [45] LYON, M. F., GLENISTER, P. H., LAMOREUX, M. L., Normal spermatozoa from androgen-resistant germ cells of chimaeric mice and the role of androgen in spermatogenesis, *Nature*, **258**: 620 - 622, 1975.
- [46] LYON, M. F., HAWKER, S. G., Reproductive lifespan in irradiated and unirradiated XO mice, *Genet. Res.*, **21**: 185 - 194, 1973.
- [47] MANN, J. R., LOVELL-BADGE, R. H., Inviability of parthenogenones is determined by pronuclei, not egg cytoplasm, *Nature*, **310**: 66 - 67, 1984.
- [48] McLAREN, A., Does the chromosomal sex of a mouse germ cell affect its development? [w] *Current Problems in Germ Cell Differentiation*, red. McLaren A., Wylie C. C., Cambridge University Press, 225 - 240, 1983.
- [49] McLAREN, A., Chimeras and sexual differentiation, [w] *Chimeras in Developmental Biology*, red. Le Douarin N., McLaren A., Academic Press, London, 381 - 399, 1984.
- [50] McLAREN, A., Relation of germ cell sex to gonadal differentiation, [w] *The Origin and Evolution of Sex*, Alan R. Liss, Inc., 289 - 300, 1985.
- [51] MONK, M., McLAREN, A., X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse, *J. Embryol. exp. Morph.*, **63**: 75 - 84, 1981.
- [52] MYSTKOWSKA, E. T., TARKOWSKI, A. K., Behaviour of germ cells and sexual differentiation in late embryonic and early postnatal mouse chimaeras, *J. Embryol. exp. Morph.*, **23**: 395 - 405, 1970.
- [53] OHNO, S., The Y-linked testis determining gene and H-Y plasma membrane antigen: are they one and the same?, *Endocr. Rev.*, **6**: 421 - 431, 1985.
- [54] OZDZEŃSKI, W., Differentiation of the genital ridges of mouse embryos in the kidneys of adult mice, *Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp.*, **61**: 267 - 278, 1972.
- [55] OZDZEŃSKI, W., PRESZ, M., Precocious initiation of meiosis by male germ cells of the mouse, *Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp.*, **73**: 1 - 7, 1984.

- [56] PHILLIPS, D. M., Development of spermatozoa in the woolly opossum with special reference to the shaping of the sperm head, *J. Ultrastruct. Res.*, **33**: 369 - 380, 1970.
- [57] POLAŃSKI, Z., In vivo and in vitro maturation rate of oocytes from two strains of mice, *J. Reprod. Fertil.*, **78**: 103 - 109, 1986.
- [58] RAFIŃSKI, J., KRZANOWSKA, H., Electrophoretic variants of GPI and ICD in inbred strains of mice, *Zwierzęta Lab.*, **22**: 59 - 64, 1985.
- [59] ROUYER, F., SIMMLER, M.-C., JOHNSON, C., VERGNAUD, G., COOKE, H. J., WEISSENBACH, J., A gradient of sex linkage in the pseudoautosomal region of the human sex chromosomes, *Nature*, **319**: 291 - 295, 1986.
- [60] SCHULTZ, R. M., LETOURNEAU, G. E., WASSARMAN, P. M., Program of early development in the mammal: Changes in the pattern and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oocyte growth in the mouse, *Dev. Biol.*, **73**: 120 - 133, 1979.
- [61] SEARLE, A. G., The genetics of sterility in the mouse, [w] *Genetic Control of Gamete Production and Function*, red. Crosignani P. G., Rubin B. L., Academic Press, New York, 93 - 114, 1982.
- [62] SEITZ, A., BENNETT, D., Transmission distortion of t-haplotypes is due to interactions between meiotic partners, *Nature*, **313**: 143 - 144, 1985.
- [63] SILVERS, W. K., *The Coat Colors of Mice*, Springer Verlag, New York, 1979.
- [64] SINGH, L., JONES, K. W., Sex reversal in the mouse (*Mus musculus*) is caused by a recurrent nonreciprocal crossover involving the X and aberrant Y chromosome, *Cell*, **28**: 205 - 216, 1982.
- [65] SINGH, L., PURDOM, I. F., JONES, K. W., Sex chromosome associated satellite DNA: evolution and conservation, *Chromosoma*, **79**: 137 - 157, 1980.
- [66] STOLLA, R., GROPP, A., Variation of the DNA content of morphologically normal and abnormal spermatozoa in mice susceptible to irregular meiotic segregation, *J. Reprod. Fertil.*, **38**: 335 - 346, 1974.
- [67] STYRNA, J., *Geny T-t u myszy*, *Kosmos*, **182**: 57 - 64, 1984.
- [68] TAKETO, T., KOIDE, S. S., In vitro development of testis and ovary from indifferent fetal mouse gonads, *Dev. Biol.*, **84**: 61 - 66, 1981.
- [69] TARKOWSKI, A. K., Mouse chimaeras developed from fused eggs, *Nature*, **190**: 857 - 860, 1961.
- [70] TARKOWSKI, A. K., Consequences of sex chromosome chimerism for sexual differentiation in mammals., *Annal. d'Embryol. Morphogen.*, *Suppl. 1*: 211 - 222, 1969.
- [71] UPADHYAY, S., ZAMBONI, L., Ectopic germ cells. A natural model for the study of germ cell sexual differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 6584 - 6588, 1982.
- [72] WABIK-SŁIZ, B., Number of cortical granules in mouse oocytes from inbred strains differing in efficiency of fertilization, *Biol. Reprod.*, **21**: 89 - 97, 1979.
- [73] WABIK-SŁIZ, B., Comparison of some properties of oocytes segregating in F<sub>2</sub> hybrids between KE and CBA/Kw inbred strains of mice, *Gamete Res.*, **15**: 87 - 94, 1986.
- [74] WACHTEL, S., OHNO, S., KOO, G. C., BOYSE, E. A., Possible role of H-Y Antigen in primary sex determination, *Nature*, **257**: 235 - 236, 1975.
- [75] WEST, J. D., X chromosome expression during mouse embryogenesis, [w] *Genetic Control of Gamete Production and Function*, red. Crosignani P. G., Rubin B. L., Acad. Press, New York, 49 - 91, 1982.

- [76] WOLF, U., Sex determination, gonad differentiation and the H-Y antigen, [w] Genetic Control of Gamete Production and Function, red. Crosignani P. G., Rubin B. L., Acad. Press, New York, 15 - 19, 1982.
- [77] ZENZES, M. T., REED, T. E., Variability in serologically detected male antigen titer and some resulting problems: A critical review, Hum. Genet., 66: 103 - 109, 1984.

*Otrzymano: grudzień 1986.*

*Przyjęto: 12 stycznia 1987.*

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

## UKŁAD CHROMOSOMÓW W JĄDRZE INTERFAZOWYM CHROMOSOME ARRANGEMENT IN INTERPHASE NUCLEUS

Andrzej JOACHIMIAK

Zakład Cytologii i Embriologii Roślin  
Uniwersytetu Jagiellońskiego

*Streszczenie.* W artykule przedstawiono argumenty przemawiające za przyjęciem poglądu, iż układ chromosomów podczas interfazy jest nieprzypadkowy. Przedstawiono przegląd współczesnego piśmiennictwa na ten temat oraz omówiono kilka ostatnio zaproponowanych modeli przestrzennego uporządkowania chromosomów w jądrze interfazowym. Dotyczy ono zarówno polaryzacji chromosomów (układ rablowski), jak i ich relatywnej pozycji w obrębie formowanej w jądrze superstruktury (łańcucha lub pierścienia).

Proponowane modele stanowią jednocześnie próbę wyjaśnienia reguł rządzących koniugacją chromosomów w mejozie, ułożeniem chromosomów podczas mitozy oraz dystrybucją heterochromatyny w obrębie genomu. Podkreślają także fakt, iż genom jest silnie zintegrowaną strukturą, w której każdy chromosom zajmuje określone miejsce. Zmiany strukturalne w obrębie chromosomów pociągają za sobą reorganizację genomu i mogą mieć duże znaczenie w ewolucji.

*Summary.* In the article the arguments are introduced that promote the acquisition of the view that chromosome distribution at interphase is not random. A review of contemporary literature in this field is given and a few recently proposed models of spatial ordering of chromosomes in interphase nucleus are discussed. It concerns both chromosome polarization (Rabl's model) and their relative position within the superstructure (chain or ring) formed in the nucleus.

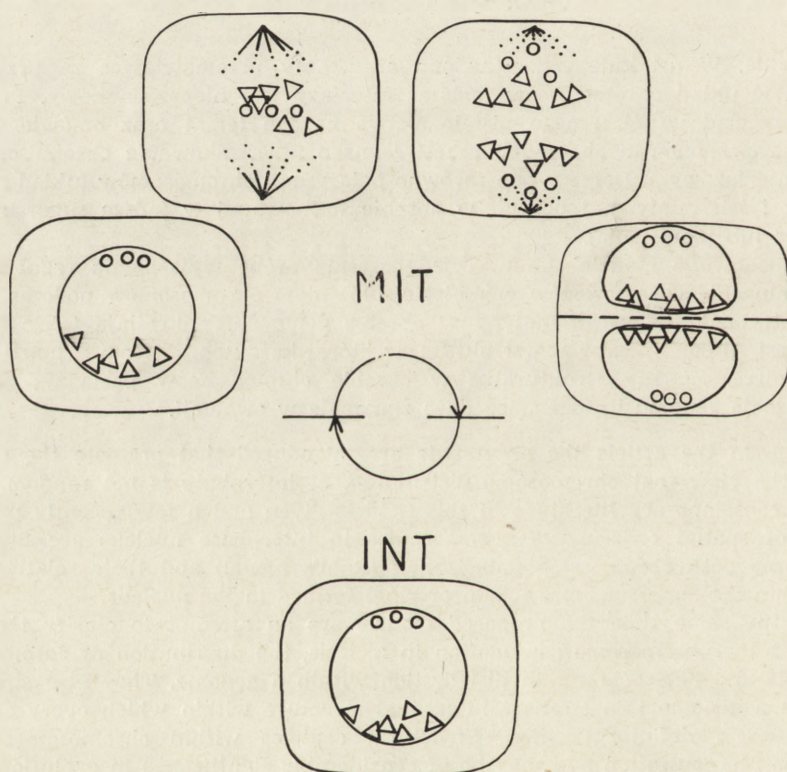
At the same time the proposed models are an attempt to clarify the rules governing the chromosome conjugation in meiosis, the distribution of chromosomes in mitosis and heterochromatin distribution within a genome. They also stress the fact that a genome is a strongly integrated structure within which every chromosome takes a definite position. Structural changes within chromosomes cause a genome reorganization and may be of considerable significance in evolution.

### WSTĘP

Do niedawna uważano, iż układ chromosomów w jądrach interfazowych jest przypadkowy i nie ma większego wpływu na funkcjonowanie komórki. Pogląd ten nigdy nie był dobrze udokumentowany, zawsze jed-

nak cieszył się dobrą opinią wśród cytologów. Wiąże się to niewątpliwie z wielkimi trudnościami metodycznymi i interpretacyjnymi, jakich narażać badanie silnie zdekondensowanych chromosomów w jądrze.

W 1885 r. Rabl [49] wysunął hipotezę, że chromosomy zachowują w czasie interfazy taką pozycję, jaką miały podczas poprzedzającej ją telofazy. Układ ten nie podlega zmianie przez cały czas trwania interfazy i może być obserwowany, gdy chromosomy wchodzi w profazę następnego podziału (ryc. 1). Teza Rabla znajdowała w ciągu następnych lat potwierdzenie w nielicznych badaniach szczegółowych dotyczących komórek zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych [8, 11, 39, 55, 58]. Na szczególną uwagę zasługuje wśród nich praca Heitza nad lokalizacją chromocentromów i jąder [33].



Ryc. 1. Układ telomerów i centromerów w różnych fazach cyklu komórkowego.  
 $\triangle$  — telomery,  $\circ$  — centromery

Wraz z pojawieniem się nowoczesnych technik badania chromatyny zaistniały warunki po temu, by dążyć do wyznaczenia ścisłej lokalizacji, jeśli nie całych chromosomów, to przynajmniej różnych ich segmentów

w obrębie jądra interfazowego. Zmienił się także sposób oceniania wagi tego zagadnienia. Obecnie wielu badaczy sądzi, że problem pozycji chromosomów w jądrach wymaga szczegółowego opracowania, i to z wielu względów. Przypuszcza się, że od ułożenia chromosomów podczas interfazy zależy może przebieg mejozy [3, 42], struktura i ewolucja kariotypu [29, 30, 52] oraz procesy różnicowania komórek i tkanek [26, 27, 54].

Szczegółowe badania lat siedemdziesiątych, przede wszystkim z zastosowaniem technik prążkowych i autoradiografii, dowiodły wielokrotnie istnienia rablowskiego układu chromosomów w jądrach komórek zwierząt i roślin. Szczególne znaczenie mają tu badania segmentów telomerowych i centromerowych chromosomów, ponieważ zgodnie z tezą Rabla powinny one leżeć po przeciwnych stronach jądra. Dobrą ilustracją tej tezy stanowią wyniki badań Fussell [23] nad *Allium cepa*, wykonanych metodą autoradiograficzną. Autorka wykorzystała w nich fakt występowania u tego gatunku późno replikujących telomerów i centromerów. Rablowskie ułożenie chromosomów w jądrach *A. cepa* zostało później potwierdzone metodą prążków C [24, 28, 37, 50].

Ostatnio hipoteza Rabla znalazła potwierdzenie w badaniach przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC) u mundzaka [53] oraz chomika [15], w obserwacjach podziałów ziarn pyłku u *Uvularia* [57] oraz w badaniach nad hybrydyzacją klonowanych sekwencji satelitarnych in situ u *Allium* [7].

W toku badań nad ułożeniem chromosomów w jądrach interfazowych poczyniono wiele dodatkowych, niezwykle interesujących obserwacji. Sugerują one, że uporządkowanie chromosomów w interfazie nie jest tylko prostą konsekwencją anafazowego ruchu chromosomów, ale ma charakter o wiele bardziej trwały i skomplikowany, niż do tej pory przypuszczano.

Niniejsze omówienie dotyczyć będzie prawie wyłącznie relatywnej pozycji określonych odcinków chromosomowych lub chromosomów w jądrze, i nie uwzględnia skomplikowanej roli matriks jądrowej w tworzeniu interfazowej struktury chromatyny.

#### MODELE UŁOŻENIA CHROMOSOMÓW W JĄDRZE

Już w 1970 r. DuPraw [19] sugerował, iż chromosomy mogą tworzyć uporządkowaną superstrukturę, w obrębie której istniałaby łączność pomiędzy poszczególnymi chromosomami kompleksu. Pierwszą próbą zebrania danych z piśmiennictwa na ten temat i opracowania bardziej szczegółowej hipotezy dotyczącej organizacji genomu w jądrach interfazowych była praca Chiarellego i Brøggera [13] z 1978 r. Podstawowe jej założenia to istnienie kolistej cząsteczki DNA odpowiadającej haplo-

idalnemu genomowi u *Eukaryota* oraz połączenie specyficznych segmentów takiego genomu ze specyficznymi rejonami otoczki jądrowej porządkujące precyzyjnie strukturę jąder interfazowych. Autorzy przytoczyli dużą liczbę szczegółowych danych na potwierdzenie swych przypuszczeń, jednak dobór argumentów wzbudził wiele kontrowersji i praca była ostro krytykowana [48].

Z początkiem lat osiemdziesiątych zaczęły się pojawiać następne, opatrzone starannie dobranymi argumentami hipotezy na temat uporządkowania chromosomów w jądrze. Wszystkie one powołują się na hipotezę Rabla [49], różnią się jednak od niej wieloma szczegółami. Żaden z autorów nie nawiązuje w sposób bezpośredni do propozycji Chiarellego i Brøggera, chociaż wszyscy dochodzą do zbliżonych wniosków. Przyczyną jest zapewne ostra krytyka tej pracy [48].

O ile hipoteza Rabla znalazła potwierdzenie w szczegółowych badaniach ostatnich lat i nikt nie podważa jej słuszności, o tyle pogląd, iż chromosomy w jądrze interfazowym tworzą ściśle określoną, uporządkowaną strukturę, jest jeszcze przez wielu badaczy kwestionowany [20, 53, 57]. Wynika to m.in. z faktu, że większość danych na ten temat ma charakter pośredni i mogą być one interpretowane w różny sposób. Ponadto istnieje wiele wątpliwości o charakterze metodycznym, np. czy obserwacje chromosomów mitotycznych mogą dostarczyć pewnych informacji na temat ich ułożenia podczas poprzedzającej interfazy. Także wśród zwolenników poglądu, iż chromosomy tworzą podczas interfazy uporządkowaną strukturę, nie ma jednomyślności co do kilku podstawowych kwestii. Wątpliwości dotyczą zakresu uporządkowania chromosomów, jego trwałości, sposobu, w jaki powstaje oraz ewentualnego wpływu takiego uporządkowania na funkcjonowanie komórki.

Spośród wielu hipotez dotyczących tego zagadnienia najbardziej spójne i operujące dużym wyborem starannie dobranych argumentów są propozycje Ashleya i Pococka [3], Fussell [27] oraz Lavanii i Sharmy [41, 42]. Szereg ciekawych argumentów przemawiających za precyzyjnym uporządkowaniem chromosomów w interfazie przyniosły prace Greilhubera [29], Loidla [43], Greilhubera i Loidla [30] oraz Schweizera i Ehrendorfera [52] oparte na analizie ilości i lokalizacji heterochromatyny w kariotypie roślin. Przynoszą one niezwykle ciekawe propozycje dotyczące przypuszczalnych reguł rządzących ewolucją kariotypu i rozmieszczeniem heterochromatyny w jego obrębie.

#### MODEL ASHLEYA I POCOCKA

Autorzy postulują, że istnieje jednoznacznie określone uporządkowanie chromosomów w interfazie. Dotyczy ono relatywnej pozycji chromosomów w obrębie formowanej przez nie struktury (łańcucha lub pier-



ścienia). Samo uporządkowanie jest kontrolowane przez specyficzne białka telomerów i istnieją mechanizmy umożliwiające jego zachowanie we wszystkich komórkach danego organizmu.

Założenia modelu:

1) rablowskie ułożenie chromosomów w jądrze z telomerami i centromerami po przeciwnych stronach jądra;

2) zakotwiczenie telomerów w wewnętrznej błonie otoczki jądrowej;

3) występowanie w kompleksie haploidalnym odmiennych dla każdego telomeru monomerów białkowych; z wyjątkiem dwóch telomerów, wszystkie pozostałe posiadają swego komplementarnego „partnera” w kompleksie;

4) połączenie haploidalnego kompleksu chromosomów w gametach w łańcuch poprzez fuzję niehomologicznych telomerów (hetero-concatenation); dzięki komplementarności odpowiednich monomerów białkowych kolejność chromosomów w łańcuchu jest ściśle określona; wolne końce łańcucha tworzą dwa telomery nie posiadające „partnerów” w kompleksie haploidalnym;

5) połączenie dwóch haploidalnych łańcuchów w procesie kariogamii w pierścień w ten sposób, że jego zamknięcie warunkowane jest połączeniem telomerów chromosomów homologicznych (homo-concatenation), których telomery posiadają „pasujące” do siebie białkowe monomery.

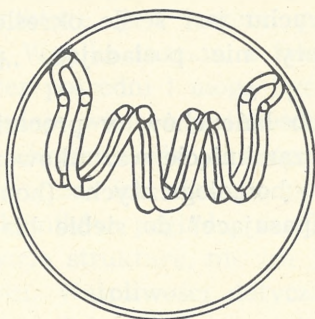
Dodatkowe uwagi dotyczące modelu

Podstawowym warunkiem zajścia fuzji telomerów jest możliwość fizycznego kontaktu między nimi. Posiadają ją telomery zbliżonych długością ramion chromosomowych. Leżą one w jądrach interfazowych w tej samej odległości od bieguna, w którym skupiają się centromery. Tak więc można przewidzieć, iż w różnych kariotypach chromosomy akrocentryczne będą się łączyły według zasady: krótsze ramię z krótszym ramieniem, dłuższe ramię z dłuższym.

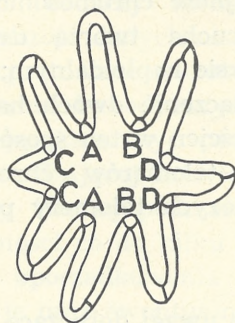
Fuzja jąder gametycznych, a nie stadium leptotenu—zygotenu jest krytycznym momentem, który decyduje o późniejszym przebiegu procesu mejozy. W czasie kariogamii dochodzi do łączenia się homologów leżących na końcach dwóch haploidalnych łańcuchów, które stanowi przygotowanie do późniejszego łączenia się reszty homologów w mejozie. Ponieważ moment „rozpoznawania się” pierwszych dwóch par chromosomów homologicznych ma miejsce tuż po zapłodnieniu, należy wnioskować, iż układ, który w tym czasie powstaje, jest zachowywany przez

cały cykl życiowy organizmu, a więc również w jego komórkach somatycznych.

Ponieważ w rezultacie formowania pierścienia w komórkach somatycznych diploidalnego organizmu dwa kompleksy haploidalne leżą naprzeciwko siebie (z wyjątkiem homologów na końcach łańcuchów, które uległy połączeniu) (ryc. 2), przed zajściem mejozy musi dojść do połączenia pozostałych homologów. Zaczyna się ono od fuzji telomerów homologicznych chromosomów i ma miejsce na otoczce jądrowej, w której są one zakotwiczone. Aby do tego doszło, telomery chromosomów homologicznych muszą się do siebie zbliżyć. Zjawisko to nazwano „homo-attraction”. Może ono zachodzić dzięki temu, że — jak postulują autorzy modelu — białka telomerów są białkami integralnymi wewnętrznej błony otoczki jądrowej, sama zaś błona ma charakter płynnej mozaiki, co umożliwia przemieszczanie się zanurzonym w niej białkom. Ponieważ telomery homologicznych ramion chromosomowych leżą w tej samej



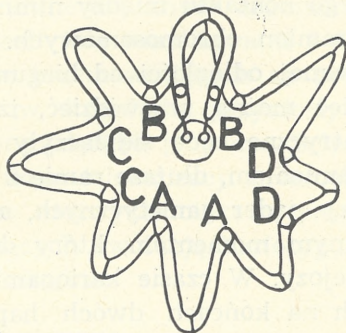
2a



2b



3a



3b

Ryc. 2, 3. Interfazowy układ chromosomów w jądrach diploidalnych  
Ryc. 2. Model Ashleya i Poccocka [3], Ryc. 3. Model Lavanii i Sharmy ([42], nieco zmienione)

odległości od bieguna zawierającego centromery, proces ich „odszukiwania się” jest znacznie ułatwiony.

Połączenia między chromosomami rzadko obserwowane są w czasie meta- i anafazy, należy więc przyjąć, że ulegają one zerwaniu w późnej profazie, w momencie gdy rozpada się otoczka jądrowa. Gdyby podział komórkowy wprowadzał znaczne zaburzenia w układzie chromosomów, to chromosomy, które powinny leżeć blisko siebie, mogłyby oddalić się na tyle, że fizyczny kontakt między ich telomerami byłby nie do odtworzenia w jądrach potomnych. Nie dzieje się tak, ponieważ rozpadowi otoczki jądrowej towarzyszy formowanie wrzeczona kariokinetycznego, którego włókienka przyczepiają się do chromosomów i stabilizują układ, łatwo więc dochodzi do jego odtworzenia w telofazie.

#### MODEL LAVANII I SHARMY

Jest to model bardzo zbliżony do poprzedniego. Chromosomy diploidalnego kompleksu tworzą w interfazie pierścien. Relatywna pozycja chromosomów w jego obrębie jest ściśle określona. Główna różnica w stosunku do poprzedniego modelu polega na odmiennym ułożeniu chromosomów homologicznych względem siebie (ryc. 3).

Założenia modelu:

- 1) rabłowska orientacja chromosomów w jądrze;
- 2) zakotwiczenie telomerów, a także centromerów w otoczce jądrowej, przypuszczalnie w okolicy porów;
- 3) chromosomy haploidalnego kompleksu połączone telomerami tworzą uporządkowaną strukturę, a pozycja każdego chromosomu w jej obrębie zdeterminowana jest m.in. długością jego ramion;
- 4) podczas pierwszego podziału jądra zygotycznego kontakt między chromosomami w obydwu haploidalnych genomach ulega zerwaniu, później zaś zostaje odtworzony w tej samej sekwencji, jaka występowała w haploidalnym genomie. W odróżnieniu jednak od jąder haploidalnych, w jądrach diploidalnych chromosomy homologiczne układają się obok siebie;
- 5) chromosomy z organizatorami jąderek zajmują w jądrze specjalną pozycję. Tworzą odrębną strukturę, która jednym końcem przyczepiona jest do pierścienia pozostałych chromosomów, drugim zaś do jąderka (ryc. 3).

Dodatkowe uwagi dotyczące modelu

Hipoteza opiera się na wielu wcześniejszych obserwacjach, sugerujących, iż chromosomy homologiczne leżą blisko siebie w czasie inter-

fazy [6]. Szczególnie liczne były tego rodzaju obserwacje w czasie, gdy nie stosowano dzisiejszych metod przygotowywania materiału do badań, tzn. traktowania inhibitorami wrzeczona mitotycznego, szoków hypotonicznych i rozgniatań komórek. Wszystkie te czynniki niszczą naturalny układ chromosomów, zarówno w interfazie, jak i podczas mitozy. Nie czyniła tego klasyczna metoda parafinowa. Szereg współczesnych badań omijających podstawowe źródła zaburzeń w układzie chromosomów potwierdza wcześniejsze obserwacje dokonane za pomocą metod klasycznych. Dość wyczerpujący zestaw danych z piśmiennictwa przynoszą obydwie prace Lavanii i Sharmy [41, 42].

Proponowany model wyjaśnia koniugację mejoetyczną chromosomów jako prostą konsekwencję ich ułożenia w jądrze interfazowym. Pod tym względem jest on bardziej klarowny niż model proponowany przez Ashleya i Poccocka [3]. Ponieważ w obrębie pierścienia chromosomów liczba leżących obok siebie homologów nie jest ściśle właściwościami modelu ograniczona do dwóch, nadaje się on także do wyjaśnienia koniugacji u poliploidów, w szczególności autopoliploidów. Wyjaśnienie tego zagadnienia na podstawie poprzedniego modelu nastęrczałoby wiele trudności.

#### MODEL FUSSELL

Dwa poprzednie modele stanowią próbę wyjaśnienia koniugacji chromosomów w mejozie poprzez specyficzny układ chromosomów w interfazie. Tak więc główny nacisk położono w nich na to, aby w sposób możliwie przekonywający wyjaśniały, jak to się dzieje, że chromosomy homologiczne „układają” się obok siebie w czasie mejozy.

Model proponowany przez Fussell nie precyzuje, w jaki sposób dochodzi do koniugacji chromosomów homologicznych. Różni się od poprzednich modeli także i tym, że zakładając istnienie pewnego uporządkowania chromosomów w jądrze, dopuszcza istnienie ograniczonej liczby równoważnych układów dla konkretnego kariotypu. Nie wymaga to istnienia mechanizmów zapewniających ściśle zachowanie układu chromosomów podczas podziału, a więc wtedy, gdy stabilizująca go otoczka jądrowa ulega rozpadowi. Autorka nie rozstrzyga też, czy chromosomy asccjują, tworząc jeden lub więcej łańcuchów czy pierścieni, chociaż sugeruje, iż pojedynczy pierścień połączonych końcami chromosomów jest uprzywilejowany ze względów mechanicznych. W obrębie tworzonej przez chromosomy superstruktury możliwe jest łączenie się poprzez telomery chromosomów zarówno homologicznych, jak i niehomologicznych.

#### Założenia modelu

- 1) rabłowska orientacja chromosomów w jądrze;
- 2) zakotwiczenie telomerów w otoczce jądrowej;

3) chromosomy łączą się telomerami, tworząc uporządkowaną strukturę. O relatywnej pozycji chromosomów w jej obrębie decyduje długość ramion chromosomowych, ponieważ fuzji ulegają jedynie telomery leżące w podobnej odległości od skupionych na jednym z biegunów jądra centromerów;

4) ze względu na to, że w obrębie konkretnego kariotypu najczęściej występuje większa liczba ramion chromosomowych o zbliżonej długości, chromosomy danego gatunku tworzyć mogą kilka równoważnych układów w interfazie;

5) fuzja telomerów, a także ich zakotwiczenie w otoczce jądrowej, uwarunkowane są obecnością specyficznych sekwencji repetytywnego DNA.

Dodatkowe uwagi dotyczące modelu

Połączenia chromosomów z wewnętrzną błoną jądrową powstają w momencie, gdy otoczka jądrowa formuje się wokół grupy chromosomów ana-telofazowych. W stadium tym telomery ramion o zbliżonej długości leżą w podobnym oddaleniu od bieguna, co ułatwia im fizyczny kontakt konieczny do wytworzenia połączeń utrwalających superstrukturę. Zasada ta dopuszcza pewną liczbę kombinacji możliwych w obrębie jednego kariotypu. Przyczyn takiego stanu rzeczy jest kilka:

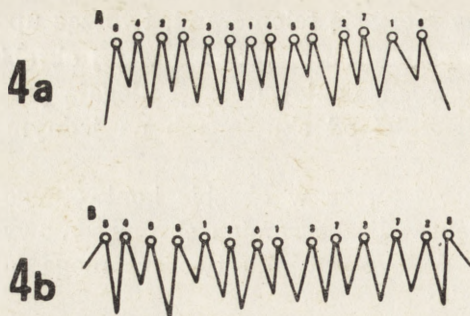
— centromery chromosomów nie leżą w jednej płaszczyźnie, a ich pozycja nie jest ustalona poprzez połączenie z otoczką jądrową;

— długość ramion chromosomowych waha się zależnie od stopnia kondensacji; dużą rolę odgrywać mogą tu obszary heterochromatynowe chromosomów, ich wielkość i liczba;

— kąt, jaki tworzą ramiona chromosomowe, może być różny i może ulegać zmianom; jego wartość wpływa na odległość telomerów od centromeru;

— zwykle w kariotypie występuje większa liczba ramion chromosomowych o zbliżonej długości.

Wszystkie wymienione czynniki wpływają na uporządkowanie chromosomów w obrębie łańcucha czy pierścienia i powodują, że nie jest ono jednoznacznie określone. Ryc. 4 przedstawia dwa spośród kilku możliwych układów chromosomów diploidalnego kompleksu żyta. Mimo pewnej dowolności w tworzeniu różnych kombinacji, ich liczba jest znacznie ograniczona. Nie istnieje możliwość zupełnie dowolnego łączenia ramion chromosomowych między sobą, w tym sensie układ chromosomów w interfazie nie jest przypadkowy.



Ryc. 4. *Secale cereale*, interfazowy układ chromosomów; model Fussell, a, b — dwa z kilku możliwych układów [27]

#### ARGUMENTY I WĄTPLIWOŚCI

Omówione wyżej hipotezy opierają się na szeregu szczegółowych obserwacji dokonywanych w różnym czasie przez cytologów i sugerujących, że układ chromosomów w interfazie nie jest przypadkowy.

Istnieją przekonujące dowody, iż jądro interfazowe wykazuje polarność pod względem ułożenia chromosomów, tak więc stara hipoteza Rabla znalazła potwierdzenie we współczesnych obserwacjach. Pozostaje jednak kwestią nie do końca rozstrzygniętą, czy rablowski układ chromosomów w jądrze wyczerpuje możliwości uporządkowania chromosomów w interfazie, czy też istnieją wyższe poziomy organizacji genomu w tej fazie cyklu komórkowego, oraz, jeżeli istnieją, czym są uwarunkowane i jaki jest ich zakres i konsekwencje. Wszystkie omówione hipotezy opierają się po części na wielokrotnie stwierdzanych i znanych cytologom faktach, po części zaś na słabo udokumentowanych założeniach, których słuszności nie udało się dzisiaj jeszcze nikomu dowieść.

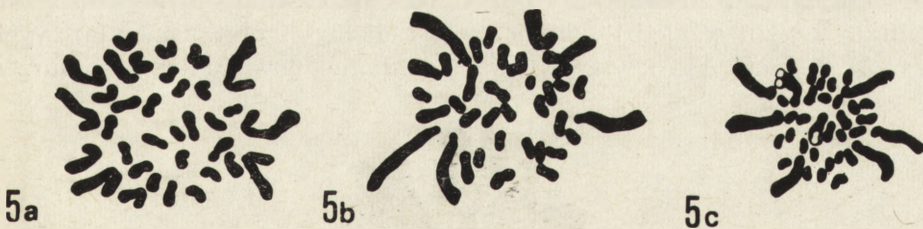
#### ZAKOTWICZENIE CHROMOSOMÓW W OTOCZCE JĄDROWEJ

Istnieją przekonujące dowody, że chromosomy zakotwiczone są w otoczkę jądrową [22, 56], co sprawia, iż układ ich jest stosunkowo trwały. Dowodzą tego obserwacje nie tylko komórek często dzielących się, gdzie układ ten mógłby być tylko i wyłącznie prostą konsekwencją anafazowego ruchu chromosomów, ale także obserwacja jąder komórek zróżnicowanych, starszych, nawet poliploidalnych [17, 26, 34, 37]. Fussell [25] wykazała, że nawet wirowanie stożków wzrostu *Allium cepa* w 100 000 g przez 15 minut nie zmienia normalnego ułożenia telomerów w interfazie. O połączeniu telomerów z otoczką świadczy także obecność jej fragmentów przy telomerach chromosomów mitotycznych. Za-

kotwiczenie innych partii chromosomów, w tym centromerów w otoczce jest kwestią mniej zbadaną, chociaż postulowaną przez wielu autorów [13, 14, 22, 29, 42]. Za tym, że centromery nie mają trwałego połączenia z otoczką, przemawiają jednak pewne obserwacje. Hsu i wsp. [34] stwierdzili nieznaczne zmiany pozycji centromerów w wyróżnicowanych liniach komórkowych myszy, Moens i Church [46] obserwowali w mikroskopie elektronowym sekwencję zmian w położeniu centromerów związanych z różnicowaniem się ziarn pyłku u *Allium fistulosum*. Zmiany położenia centromerów obserwowane były także u *A. porrum* przez Lafontaine'a i Lucka [40]. Jeszcze mniej pewne są przypuszczenia dotyczące stałego przyczepienia innych segmentów chromosomowych do otoczki jądrowej. Kwestia ta wymaga dopiero wyjaśnienia.

## FUZJA TELOMERÓW

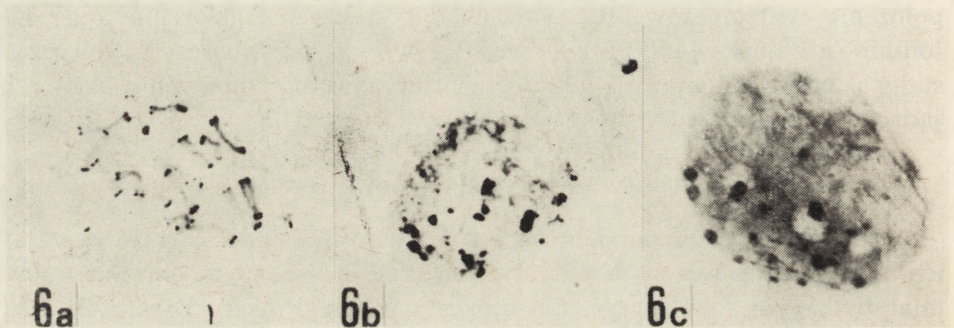
Naczelną zasadą porządkującą chromosomy podczas interfazy jest ich połączenie poprzez telomery. O tym, które ramiona chromosomowe miałyby się ze sobą łączyć, decydować ma ich długość. Zasada, iż fuzji ulegają telomery ramion o zbliżonej długości, przytaczana jest przez większość autorów za Bennettem [9], chociaż sugerowana była — obok pokrewieństwa białek telomerów — wcześniej przez Ashleya i Pockocka [3]. Dobrą ilustracją działania tej zasady jest zachowanie się chromosomów w czasie metafazy; np. jeśli w kariotypie danego gatunku występuje pewna liczba drobnych chromosomów, znacznie krótszych od pozostałych, to w metafazie obserwuje się je zazwyczaj obok siebie, najczęściej w centrum płytki (ryc. 5).



Ryc. 5. Płytki metafazowe storczyków; metoda skrawków parafinowych. a — *Listera ovata*, b — *Cephalanthera alba*, c — *Epipactis latifolia* [Skalińska i wsp., Acta Soc. Bot. Pol., 26: 215 - 246, 1957]

Najwięcej dowodów na fuzję telomerów w czasie interfazy dostarczają badania nad *Allium cepa* [7, 23, 24, 26, 37]. Gatunek ten posiada duże bloki heterochromatyny telomerowej we wszystkich 32 ramionach chromosomów kompleksu (ryc. 6a). W jądrach interfazowych obserwuje się zwykle około 16 segmentów heterochromatyny telomerowej, co prze-

mawiałyby za tym, że wszystkie lub prawie wszystkie chromosomy łączą się poprzez telomery, tworząc łańcuch lub pierścień (ryc. 6b, c). Również obserwacje haploidalnych i diploidalnych jąder u *Ornithogalum* [2, 4, 5] dowodzą, iż chromosomy obecne w jądrze interfazowym łączą się poprzez telomery, tworząc strukturę wyższego rzędu. W związku z tymi obserwacjami można przypuszczać, iż podobnie zachowują się chromosomy innych gatunków, chociaż nie posiadamy przekonujących dowo-



Ryc. 6. *Allium cepa* L.: metoda prążków C. a — metafaza w merystemie wierzchołkowym korzenia, b — jądro interfazowe w merystemie wierzchołkowym korzenia, c — jądro interfazowe w łusce spichrzowej [37]

dów. Otwarta pozostaje kwestia, czy wszystkie chromosomy kompleksu łączą się w obrębie jednej superstruktury, czy tworzona jest ona we wszystkich komórkach i tkankach, oraz jakie położenie zajmują względem siebie chromosomy homologiczne. Każde z tych zagadnień inaczej rozwiązują różni autorzy, gdyż brak danych pozwala na dość dużą dowolność w tym względzie. Obserwacje radialnych płytek metafazowych (ryc. 7) w materiale uzyskanym metodami nie powodującymi zaburzeń



Ryc. 7. *Viscum album*; metafaza w komórce somatycznej, metoda skrawków parafinowych [Skalińska i wsp., Acta Biol. Cracov. Ser. Bot., 17: 133 - 163, 1974]



w naturalnym układzie chromosomów przemawiałyby jednak za tym, iż chromosomy kompleksu formują pierścień w interfazie.

Wydaje się, że chromosomy z organizatorami jąderki mogą znajdować się poza superstrukturą formowaną przez resztę chromosomów. Sprawa ta została przedyskutowana w jednej z omawianych prac [42] i tam też jest cytowana literatura na ten temat. Ostatnio badania Loiero i wsp. [44] oraz Barnes a i wsp. [7] nad *Allium cepa* wykazały, że w obrębie chromosomów tego gatunku jedynie dwa telomery posiadają odrębną budowę molekularną. Są to telomery krótszych ramion chromosomów z organizatorami jąderka. Stanowi to dobre poparcie dla tezy Lavanii i Sharmy [42].

#### MECHANIZM FUZJI TELOMERÓW

Chociaż można uznać, że o fuzji telomerów decyduje w znacznym stopniu zbliżona długość ramion chromosomowych, nie wyjaśnia to wszakże mechanizmów molekularnych, które za tym stoją. Możliwe są tu dwa rozwiązania — albo za fuzję odpowiadają specyficzne białka zasocjowane z telomerami [3], albo specyficzne powtarzalne sekwencje DNA [27]. Na potwierdzenie pierwszej koncepcji nie można przytoczyć żadnych badań doświadczalnych, druga zaś znajduje potwierdzenie w pewnych obserwacjach. Generalnie rzecz biorąc, obserwuje się występowanie odrębnych typów powtarzalnego DNA charakterystycznych dla odrębnych rejonów chromosomowych. Inną klasę reprezentuje DNA telomerów, inną — centromerów, itp. [1, 21]. Potwierdzenie znajdujemy w szeregu badań szczegółowych. Dowodzą one, że podobne typy heterochromatyny zajmują podobną pozycję w chromosomach *Scilla* [16, 29], *Allium* [7], *Drosophila* [47]. Rejony chromosomów zawierające taki sam satelitarny DNA wytwarzają preferencyjnie somatyczne asocjacje („ectopic pairing”) [45]. Obserwacje te nie wykluczają jednak obecności specyficznych zasocjowanych z danym rodzajem satelitarnego DNA białek [12], które mogłyby odgrywać rolę w łączeniu się podobnych sekwencji między sobą. Obecność takich białek postulowana była przez Mayfield i Ellison [45] oraz Greilhubera [29].

W wielu chromosomach brak heterochromatyny telomerowej, wykrywalnej standardowymi metodami cytologicznymi. Mechanizm fuzji telomerów wymaga więc dalszych badań.

#### KONIUGACJA CHROMOSOMÓW

Chociaż omawiane wcześniej koncepcje przynoszą argumenty przemawiające za tym, że koniugacja chromosomów w mejozie zależy od ich ułożenia podczas poprzedzającej mejozę interfazy, nadal brak rozstrzy-

gających danych na ten temat. O tym, że w linii generatywnej interfazowy układ chromosomów decyduje o przebiegu mejozy świadczyć mogą obserwacje mejozy po uprzednim traktowaniu komórek premejotycznych kolchicyną, która zaburza warunkowany zajęciem anafazy rablowski układ chromosomów. W komórkach takich podczas mejozy formowane są uniwalenty zamiast bivalentów [10, 18].

Nieliczne obserwacje dowodzą, że koniugacja chromosomów zależy w znacznym stopniu od ich długości, oraz że długość chromosomów może być nie mniej ważna jak homologia [31, 32]. Wykazano, że koniugacja rozpoczyna się w telomerowych regionach chromosomów, przy wewnętrznej błonie otoczki [58].

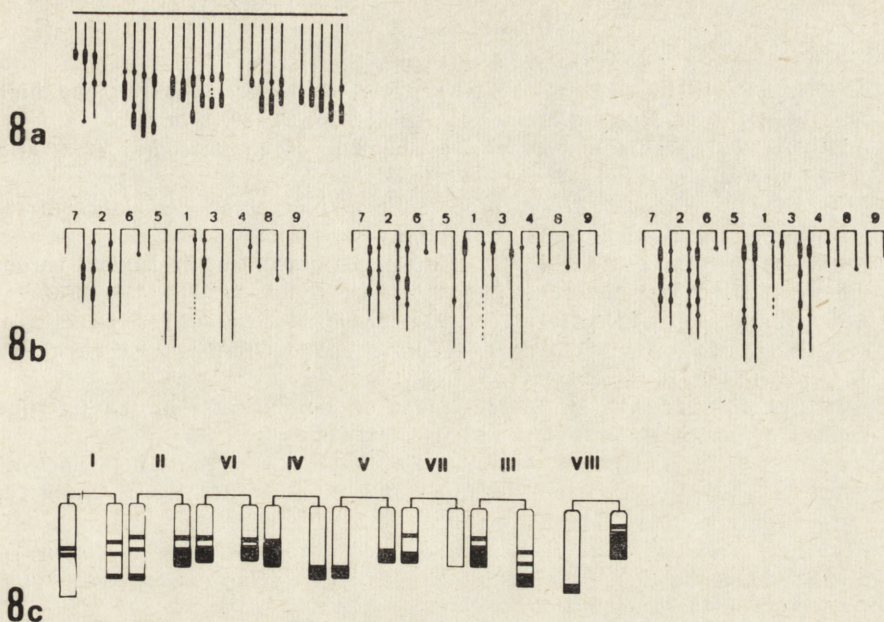
Yacobi i wsp. [59] sugerują, że przypadkowy układ chromosomów w jądrze pociągałby za sobą występowanie splecionych ze sobą bivalentów (interlocking bivalents). W rzeczywistości obserwowane są one bardzo rzadko, co przemawia za uporządkowaniem chromosomów w jądrze interfazowym.

Jeśli chodzi o położenie homologów w jądrze, to obszerny przegląd dotychczasowych obserwacji [6] skłania raczej do przyjęcia założenia, iż chromosomy homologiczne sąsiadują ze sobą podczas interfazy, i to zarówno w tkankach generatywnych, jak i somatycznych, także u autopoliploidów.

#### ZWIĄZEK UPORZĄDKOWANIA CHROMOSOMÓW W JĄDRZE INTERFAZOWYM ZE STRUKTURĄ I EWOLUCJĄ KARIOTYPU

Analiza bogatych w heterochromatynę kariotypów sugeruje, że zarówno liczba, jak i położenie segmentów heterochromatynowych w ich obrębie nie są przypadkowe [29, 30, 38, 43, 52]. Po raz pierwszy zwrócił na to uwagę Heitz w 1932 r. [33]. Chromosomy poszczególnych gatunków ujawniają po zastosowaniu metody prążków C określony wzór prążkowania (banding pattern), który może być różny dla różnych gatunków roślin [52]. Jego istotę stanowi pewne ogólne podobieństwo chromosomów danego kompleksu pod względem liczby i położenia segmentów heterochromatyny. Szczególnie uderzające może być ono w przypadku zbliżonych długością niehomologicznych ramion chromosomowych (ryc. 8).

Ponieważ według omówionych wcześniej modeli właśnie fuzja zbliżonych pod względem długości ramion chromosomów stanowi podstawę ich uporządkowania w interfazie, nasuwa się przypuszczenie, że sekwencje heterochromatyny mogą się przenosić z jednego chromosomu na drugi na drodze fizycznego kontaktu. Taki mechanicystyczny model rozprzestrzeniania się heterochromatyny w obrębie genomu został ostatnio zaproponowany przez kilku badaczy [29, 30, 43, 52]. Sugeruje on, że sekwencje o podobnej budowie molekularnej zajmują podobne pozycje



Ryc. 8. Haploidalne kompleksy chromosomów. a — *Allium flavum*, b — *Scilla vindobonensis*, *S. voethorum* i *S. resslii*, c — *Allium montanum*. Chromosomy ułożone zgodnie z hipotezą Bennetta (a, b — Greilhuber i Loidl [30], c — Joachimiak i wsp. [38])

w obrębie chromosomów. Tak pojęta specyficzność budowy i lokalizacji heterochromatyny znajduje potwierdzenie w licznych badaniach na poziomie molekularnym [1, 7, 21, 47], co stanowi poparcie dla hipotezy, iż heterochromatyna stanowi ruchomy element genomu. Wyjaśniałoby to przyczynę tak często obserwowanej [35, 36] heterozygotyczności strukturalnej dotyczącej heterochromatyny zwierząt i roślin.

Niektórzy autorzy [51, 52] podkreślają odrębność wzoru prążkowania chromosomów z organizatorami jąder. Wynika ona, być może, z ich położenia poza superstrukturą formowaną przez resztę chromosomów podczas interfazy (model Lavanii i Sharmy). Nie można wykluczyć, że także inne wyróżniające się typy chromosomów, jak chromosomy płci lub B-chromosomy zawdzięczają swą odrębność brakowi integracji z resztą genomu podczas interfazy.

Jeśli chromosomy tworzą w interfazie precyzyjnie uporządkowaną strukturę, której funkcjonowanie zależy przede wszystkim od warunkowanej długością ramion kolejności chromosomów, to przypuszczać można, że mutacje chromosomowe, zmieniające długość lub liczbę ramion chromosomowych w obrębie kariotypu, mogą wprowadzać znaczne zaburzenia w funkcjonowaniu eukariotycznego genomu. W odróżnieniu od nich, mutacje typu robertsonianowskiego powinny być dobrze tolerowane.

## PISMIENNIC TWO

- [1] APPELS, R., DRISCOLL, C., PEACOCK, W. J., Heterochromatin and highly repeated DNA sequences, *Chromosoma (Berl.)*, **70**: 67 - 89, 1978.
- [2] ASHLEY, T., Specific end to end attachment of chromosomes of *Ornithogalum virens*, *J. Cell Sci.*, **38**: 357 - 367, 1979.
- [3] ASHLEY, T., POCOCK, N., A proposed model of chromosomal organization in nuclei at fertilization, *Genetica*, **55**: 161 - 169, 1981.
- [4] ASHLEY, T., WAGENAAR, E. B., End-to-end attachment of haploid chromosomes of *Ornithogalum virens*, *Can. J. Genet. Cytol.*, **14**: 716 - 717, 1972.
- [5] ASHLEY, T., WAGENAAR, E. B., Telomeric associations of gametic and somatic chromosomes in diploid and autotetraploid *Ornithogalum virens*, *Can. J. Genet. Cytol.*, **16**: 61 - 76, 1974.
- [6] AVIVI, L., FELDMAN, M., Arrangement of chromosomes in the interphase nucleus of plants, *Hum. Genetics* **55**: 195 - 281, 1980.
- [7] BARNES, S. R., JAMES, A. M., JAMIESON, G., The organisation, nucleotide sequence, and chromosomal distribution of a satellite DNA from *Allium cepa*, *Chromosoma (Berl.)*, **92**: 185 - 192, 1985.
- [8] BELAR, K., Beiträge zur Kasualanalyse der Mitose. III. Untersuchungen an den Staubfedenhaarzellen und Blattmeristemzellen von *Tradescantia virginica*, *Z. Zellforsch.* **10**: 73 - 134, 1929.
- [9] BENNETT, M. D., Nucleotypic basis of the spatial ordering of chromosomes in eukaryotes and the implications of the order for genome evolution and phenotypic variation, [w] *Genome evolution*, red. G. A. Dover i R. B. Flavell, Academic Press, 1982.
- [10] BENNETT, M. D., TOLEDO, L. A., STERN, H., The effect of colchicine on meiosis in *Lilium speciosum* cv. „Rosemede”, *Chromosoma (Berl.)*, **72**: 175 - 189, 1979.
- [11] BOVERI, T., Die Blastomerkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität, *Arch. Zellforsch.*, **3**: 181 - 268, 1909.
- [12] BRUTLAG, D. L., Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA, *Ann. Rev. Genet.*, **14**: 121 - 144, 1980.
- [13] CHIARELLI, B., BRØGGER, A., Superchromosomal organization and its cytogenetic consequences in the Eukaryota, *Genetica*, **49**: 109 - 126, 1978.
- [14] COMINGS, D. E., The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus, *Amer. J. Human Genet.*, **20**: 440 - 460, 1968.
- [15] CREMER, T., CREMER, C., BAUMANN, H., LÜDTKE, E.-K., SPERLING, K., TEUBER, V., ZORN, C., Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments, *Hum. Genet.*, **60**: 46 - 56, 1982.
- [16] DEUMLING, B., GREILHUBER, J., Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (*Liliaceae*) by in situ hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding, *Chromosoma (Berl.)*, **84**: 535 - 555, 1982.
- [17] DIAZ, G., LEWIS, K. R., Interphase chromosome arrangement in *Anopheles atroparvus*, *Chromosoma (Berl.)*, **52**: 27 - 35, 1975.
- [18] DOVER, G. A., RILEY, R., The effect of spindle inhibitors applied before meiosis on meiotic chromosome pairing, *J. Cell Sci.*, **12**: 143 - 161, 1973.
- [19] DuPRAW, E. J., DNA and chromosomes, Holt Rinehart and Winston, New York, 1970.

- [20] DUTRILLAUX, B., AURIAS, A., COUTURIER, M. F., CROQUETTE, M. F., VIEGAS-PEQUINOT, E., Multiple telomeric fusions and chain configurations in human somatic chromosomes, *Chromosomes Today*, **6**: 37 - 44, 1977.
- [21] FLAVELL, R. B., Sequence amplification, deletion and rearrangement: Major sources of variation during species divergence, [w] *Genome evolution*, red. G. A. Dover i R. B. Flavell, Academic Press, 1982.
- [22] FRANKE, W. W., SCHREER, U., The structures and functions of the nuclear envelope, [w] *The cell nucleus*, red. H. Bush, Academic Press, 1974.
- [23] FUSSELL, C. P., The position of interphase chromosomes and late replicating DNA in centromere and telomere regions of *Allium cepa* L., *Chromosoma* (Berl.), **50**: 201 - 210, 1975.
- [24] FUSSELL, C. P., Telomere associations in interphase nuclei of *Allium cepa* demonstrated by C-banding, *Exp. Cell Res.*, **110**: 111.
- [25] FUSSELL, C. P., Maintenance of interphase chromosome position following colchicine treatment and ultracentrifugation of *Allium cepa* root tips, *J. Cell Biol.*, **87**: 50, 1980.
- [26] FUSSELL, C. P., Telomere arrangement in differentiated interphase cells of *Allium cepa*: a function of chromosome arm lengths at anaphase-telophase, *Can. J. Genet. Cytol.*, **25**: 478 - 486, 1983.
- [27] FUSSELL, C. P., Interphase chromosome order: A proposal, *Genetica*, **62**: 193 - 201, 1984.
- [28] GHOSH, S., ROY, S., Orientation of interphase chromosomes as detected by Giemsa C-bands, *Chromosoma* (Berl.), **61**: 49 - 55, 1977.
- [29] GREILHUBER, J., Trends in der Chromosomenevolution von *Scilla* (*Lilia-ceae*), *Stapfia* **10**: 11 - 51, 1982.
- [30] GREILHUBER, J., LOIDL, J., On regularities of C-banding patterns, and their possible cause, Kew Chromosome Conference II., G. Allen and Unwin, 1983.
- [31] GRELL, R. F., Chromosome size at distributive pairing in *Drosophila melanogaster* females, *Genetics*, **50**: 151 - 166, 1964.
- [32] GRELL, R. F., DAY, J. W., Chromosome pairing in the oogonial cells of *Drosophila melanogaster*, *Chromosoma* (Berl.), **31**: 434 - 445, 1970.
- [33] HEITZ, E., Die Herkunft der Chromozentren. Dritter Beitrag zur Kenntnis der Beziehung zwischen Kernstruktur und qualitativer Verschiedenheit der Chromosomen in ihrer Längsrichtung, *Planta*, **18**: 571 - 636, 1932.
- [34] HSU, T. C., COOPER, J. E. K., MACE, J. L., jr, BRINKLEY, B. R., Arrangement of centromeres in mouse cells, *Chromosoma* (Berl.), **34**: 73 - 87, 1971.
- [35] JOACHIMIAK, A., Metody różnicowego barwienia chromosomów, *Wiad. Bot.*, **27**: 11 - 30, 1983.
- [36] JOACHIMIAK, A., Heterochromatyna. Budowa i funkcje w obrębie genomu, *Post. Biol. Kom.*, **10**: 317 - 338, 1983.
- [37] JOACHIMIAK, A., Telomere arrangement in interphase nuclei of *Allium cepa* L., *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.*, w druku.
- [38] JOACHIMIAK, A., KRAWCZYK, J., KORNAŚ, A., Giemsa C-banding karyotype analysis of wild *Allium* species from Poland. I. Karyotype structure and equilocal heterochromatin distribution in *Allium montanum*, *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.*, w druku.
- [39] KITANI, Y., Orientation, arrangement and association of somatic chromosomes, *Jap. J. Genet.*, **38**: 244 - 256, 1963.
- [40] LAFONTAINE, J. G., LUCK, B. T., An ultrastructural study of plant cell (*Allium porrum*) centromeres, *J. Ultrastruct. Res.*, **70**: 298 - 307, 1980.

- [41] LAVANIA, U. C., SHARMA, A. K., An interphase model for mitotic chromosome organization in Eukaryota, *Biosystems*, **14**: 171 - 178, 1981.
- [42] LAVANIA, U. C., SHARMA, A. K., Mitotic spatial model: Arrangement of homologous chromosomes, *Genetica*, **62**: 203 - 208, 1984.
- [43] LOIDL, J., Some features of heterochromatin in wild *Allium* species, *Pl. Sys. Evol.*, **143**: 117 - 131, 1983.
- [44] LOIERO, M., DURANTE, M., TAGLIASACCHI, A. M., AVANZI, S., Two patterns of labelling by tritiated highly repetitive DNA in metaphase chromosomes of *Allium cepa*, *Cytobios*, **34**: 15 - 24, 1982.
- [45] MAYFIELD, J. E., ELLISON, J. R., The organization of interphase chromatin in *Drosophilidae*. The self adhesion of chromatin containing the same DNA sequence, *Chromosoma (Berl.)*, **52**: 37 - 48, 1975.
- [46] MOENS, P. B., CHURCH, K., Centromere sizes, positions, and movements in the interphase nucleus, *Chromosoma (Berl.)*, **61**: 41 - 48, 1977.
- [47] PEACOCK, W. J., LOHE, A. R., GERLACH, W. L., DUNSMUIR, P., DENNIS, E. S., APPELS, R., Fine structure and evolution of DNA in heterochromatin, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* **42**: 1121 - 1135, 1978.
- [48] PEARSON, P. L., NATARAJAN, A. T., Some annotations on the article by B. Chiarelli and A. Brøgger on super chromosomal organisation, *Genetica*, **49**: 199 - 203, 1978.
- [49] RABL, C., Über Zellteilung, *Morph. Jb.*, **10**: 214 - 330, 1885.
- [50] ROY, S., GHOSH, S., Orientation of Giemsa C-bands in interphase cells in *Allium cepa*, *Experientia*, **33**: 432 - 433, 1977.
- [51] SCHWEIZER, D., EHRENDORFER, F., Giemsa banded karyotypes, systematics, and evolution in *Anacyclus (Asteraceae-Anthemideae)*, *Pl. Syst. Evol.*, **126**: 107 - 148, 1976.
- [52] SCHWEIZER, D., EHRENDORFER, F., Evolution of C-band patterns in *Asteraceae-Anthemideae*, *Biol. Zbl.*, **102**: 637 - 655, 1983.
- [53] SPERLING, K., LÜDTKE, E.-K., Arrangement of prematurely condensed chromosomes in cultured cells and lymphocytes of the Indian muntjac, *Chromosoma (Berl.)*, **83**: 541 - 553, 1981.
- [54] STEFFENSON, D. M., Chromosome architecture and the interphase nucleus: data and theory on the mechanisms of differentiation and determination, *Chromosomes Today*, **6**: 247 - 253, 1977.
- [55] SUTTON, W. S., On the morphology of the chromosome group in *Brachystola magna*, *Biol. Bull.*, **4**: 24 - 39, 1902.
- [56] SVED, J. A., Telomere attachment of chromosomes. Some genetical and cytogenetical consequences, *Genetics*, **53**: 747 - 756, 1966.
- [57] THERMAN, E., DENNISTON, C., Random arrangement of chromosomes in *Uvularia (Liliaceae)*, *Pl. Syst. Evol.*, **147**: 289 - 297, 1984.
- [58] VANDERLYN, L., Somatic mitosis in the root tip of *Allium cepa*. A review and reorientation, *Bot. Rev.*, **14**: 270 - 318, 1948.
- [59] YACOBI, Y. Z., MALLO-SYMPAYO, T., FELDMAN, M., Genetic induction of bivalent interlocking in common wheat, *Chromosoma (Berl.)*, **87**: 165 - 175, 1982.

Otrzymano: 9 lutego 1987.

Przyjęto: 16 lutego 1987.

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

## 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 półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do 1 czerwca na II półrocze 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 bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

## TREŚĆ

K. ŁAZOWSKI, Reakcje wielkich ameb na światło . . .	131
P. STROJNY, K. OSTROWSKI, A. DZIEDZIC-GO- CŁAWSKA, Zastosowanie analizy fourierowskiej do badania kształtów obrazów komórek i innych obiektów biologicznych . . . . .	149
Z. M. RUPNIEWSKA, M. KUROWSKA, Geny, niepra- widłości chromosomowe i białaczki . . . . .	165
H. KRZANOWSKA, Genetyczna kontrola gametogenezy u ssaków . . . . .	213
A. JOACHIMIAK, Układ chromosomów w jądrze in- terfazowym . . . . .	237