

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postępy Biologii Komórki

TOM 16-NR 1

1989 (1-124)

PWN WARSZAWA-WROCŁAW

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,
Maciej KAWALEC, Szczepan BILIŃSKI, Maciej ZABEL

Rada Redakcyjna

Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ,
Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ,
Zofia OSUCHOWSKA — przewodnicząca, Aleksandra PRZEŁĘCKA,
Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

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

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział Wrocławski

Nakład 530+100. Ark. wyd. 9,5, ark. druk. 7,75. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70×100.
Oddano do składania 17 X 1988 r. Podpisano do druku w kwietniu 1989 r. Druk ukończono
w maju 1989 r. Zam. nr 3568/88. Cena 240 zł

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

KOMÓRKI LAK (LYMPHOKINE ACTIVATED KILLER CELLS): CHARAKTERYSTYKA I ROLA W TERAPII NOWOTWORÓW

LAK (LYMPHOKINE ACTIVATED KILLER) CELLS: THEIR CHARACTERIZATION AND ROLE IN CANCER THERAPY

Agnieszka MIGDALSKA

Zakład Hematologii Radiacyjnej, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa

Streszczenie. Aktywność LAK (aktywność cytotoksyczna wywołana interleukiną 2) stała się ostatnio przedmiotem intensywnych badań. Powodem tak dużego zainteresowania jest zdolność komórek LAK do niszczenia komórek nowotworowych, opornych na atak komórek NK. Ta cecha komórek LAK otwiera nowe możliwości przed immunoterapią nowotworów. Celem pracy jest scharakteryzowanie komórek LAK, określenie ich pochodzenia oraz ich klinicznego zastosowania.

Summary. Lymphokine activated killer (LAK) activity has recently been extensively investigated. The capability of cytotoxic damage of NK resistant tumor cells by LAK cells is the main reason for this great interest. This feature of LAK cells gives a new chance to cancer immunotherapy. The review presents a characteristic of LAK cells, their derivation and clinical application.

Wykaz stosowanych skrótów

CTL	– limfocyty T cytotoksyczne
CY	– cyklofosfamid
EBV	– wirus Epstein-Barra
IL-2	– interleukina 2
IFN	– interferon
komórki LAK	– komórki cytotoksyczne aktywowane interleukiną-2
LGL	– duże ziarniste limfocyty
MHC	– główny układ zgodności tkankowej
PGE	– prostaglandyna E
PGF	– prostaglandyna F
TNBS	– kwas 2,4,6-trójnitrobenzenosulfonowy
TNP	– trójnitrofenol

Antygeny różnicowania występujące na ludzkich limfocytach T i komórkach NK:

CD3 – limfocyty T

CD4 – limfocyty T pomocnicze

CD5 – limfocyty T

CD8 – limfocyty T cytotoksyczne/supresyjne

CD16 – komórki NK

NKH1 – komórki NK, część limfocytów T cytotoksycznych/supresyjnych

Antygeny różnicowania występujące na mysich limfocytach T i komórkach NK:

Thy 1 – limfocyty T, część komórek NK

L3T4 – limfocyty T pomocnicze

Lyt 2 – limfocyty T cytotoksyczne/supresyjne

AsGM1 – komórki NK

✓ Jednym z mechanizmów odpornościowych, jakim dysponuje układ immunologiczny, jest tzw. efekt cytotoksyczny, polegający na niszczeniu komórek rozpoznawczych jako „obce” przez wyspecjalizowane populacje komórek organizmu. Najlepiej poznanymi komórkami mającymi zdolność uszkodzenia cytotoksycznego, bez udziału przeciwciał, są limfocyty T cytotoksyczne, komórki NK oraz makrofagi. Te trzy typy komórek spełniają bardzo ważną rolę w niszczeniu komórek nowotworowych [83, 84, 85]. W pracy tej, opisując komórki LAK, będę porównywać je z cytotoksycznymi limfocytami T i komórkami NK, ponieważ, jak sądzi się obecnie, stanowią one źródło komórek LAK.

Działanie limfocytów T cytotoksycznych jest uwarunkowane ich swoistością dla antygeny konwencjonalnego i jednocześnie zgodnością ich antygenów MHC klasy I z antygenami atakowanej komórki. Limfocyty T cytotoksyczne mają na swojej powierzchni receptor rozpoznający kompleksowo antygen konwencjonalny wraz z antygenami MHC. Ekspansja limfocytów T cytotoksycznych zależy od wytwarzanej przez limfocyty T (głównie limfocyty T pomocnicze) interleukiny 2 (IL-2), która jest dla nich bodźcem do proliferacji [85, 90].

W odróżnieniu od limfocytów T cytotoksycznych, komórki NK mają zdolność cytotoksycznego niszczenia komórek w sposób niezależny od antygenów zdolności tkankowej oraz wykazują w swoim działaniu ograniczoną swoistość antygenową. Komórki NK wykazują względną swoistość gatunkową, tzn. efektywniej niszczą komórki allogeniczne niż ksenogeniczne [84, 92].

W 1982 r. Grimm i in. opisali pojawienie się limfocytów cytotoksycznych pod wpływem IL-2 [17]. Limfocyty te, które nazwano komórkami LAK (lymphokine activated killer cells), niszczyły w sposób niezależny od antygenów MHC wiele komórek nowotworowych, opornych na atak komórek NK. Komórki LAK uznano początkowo za populację odrębną od limfocytów

T i komórek NK. Sądzone, że odkryto nowy rodzaj limfocytów cytotoksycznych [17]. Obecnie coraz powszechniejszy staje się pogląd, że zjawisko LAK jest nowym rodzajem aktywności cytotoksycznej, a nie cechą odrębnej populacji komórkowej. Aktywność tę przejawiają głównie komórki NK, a w niektórych przypadkach również limfocyty T cytotoksyczne [26, 48].

I. METODY INDUKOWANIA AKTYWNOŚCI LAK IN VITRO

Komórki o aktywności LAK mogą być indukowane spośród limfocytów wyizolowanych z krwi obwodowej [23, 91, 97], węzłów chłonnych [22], śledziony [3, 51, 94, 98], grasicy [7, 68], szpiku kostnego [37, 47], jamy otrzewnowej [45] i limfocytów infiltrujących guzy nowotworowe [22, 81]. Źródłem ich może być praktycznie większość tkanek limfatycznych. Również limfocyty płodowe, pochodzące z krwi pępowinowej [22], łożyska [9] czy grasicy [82] wykazywały pod wpływem inkubacji z IL-2 aktywność LAK.

Do utworzenia komórek LAK in vitro preferowana jest rekombinowana IL-2 [22]. Stosowane stężenia IL-2 zawierają się w granicach 30–1000 jednostek/1 ml podłoża, zwykle wynoszą 100–400 jednostek/1 ml [9, 33, 69, 91, 97].

Optymalna gęstość limfocytów hodowanych z IL-2 wynosi $1-5 \cdot 10^6$ [4, 8, 15, 35, 41, 52]. Do hodowli limfocytów ludzkich najczęściej stosuje się podłoża zawierające dodatek surowicy AB [8, 12, 42, 97] lub surowicy autologicznej [32], w przypadku zaś limfocytów mysich płodowej surowicy cielęcej [51–53, 59, 98]. Hodowle można prowadzić również w podłożu bezsurowicznym [22, 54, 60].

Zazwyczaj komórki LAK pojawiają się już po 18–24 godz. [73]. Zawiesinę komórek inkubuje się z IL-2 minimum 48 godz. przeważnie 3–7 dni [2, 16, 36, 52, 53, 98].

Najczęściej stosowanym testem czynnościowym dla komórek LAK jest 4- lub 5-godzinny test cytotoksyczny z komórkami docelowymi znakowanymi ^{51}Cr [23, 36, 37, 42, 53].

II. MECHANIZM POWSTAWANIA KOMÓREK O AKTYWNOŚCI LAK

Do utworzenia komórek LAK nie jest wymagany wcześniejszy kontakt prekursorów tych komórek z antygenem, niezbędna jest jedynie IL-2 [17–19, 36, 75]. Wydaje się, że prekursorzy komórek LAK nie mają na swojej powierzchni receptora dla IL-2 lub mają ten receptor w ilości trudnej do wykrycia stosowanymi metodami [88]. Aktywacja komórek LAK może polegać bądź na bezpośrednim oddziaływaniu IL-2 na błonę komórkową, bądź

komórki nabywają receptory podczas inkubacji z IL-2 [23]. Być może właśnie brak receptora dla IL-2 lub receptor o bardzo niskim powinowactwie na prekursorach LAK, może wytłumaczyć zjawisko zaobserwowane we wspólnej hodowli prekursorów LAK i limfocytów T cytotoksycznych. Stwierdzono, że komórki te współzawodniczą o IL-2. Prawdopodobnie z powodu większego powinowactwa limfocytów T cytotoksycznych do IL-2 niż prekursorów komórek LAK, tworzenie aktywności LAK w tym układzie zostaje silnie zahamowane. Dopiero nadmiar IL-2 w środowisku może przywrócić zdolność powstawania komórek LAK [88, 89]. Eksperymenty z przeciwciałami anti-Tac (przeciwko receptorowi dla IL-2) dowiodły, że receptor dla IL-2 pojawia się w trakcie inkubacji komórek z IL-2 równocześnie z pojawieniem się aktywności cytotoksycznej [22, 97].

W jednej z najnowszych prac autorzy sugerują, że powstawanie komórek LAK jest zależne od innego receptora dla IL-2 niż receptor Tac. Istnienie alternatywnego receptora dla IL-2 stwierdzono indukując komórki LAK z prekursorów, którym usunięto bądź zablokowano receptor Tac [65]. Stwierdzono również, że „nowy” receptor jest zaangażowany w początkowe stadium indukowania komórek LAK [65], natomiast receptor Tac jest odpowiedzialny za podtrzymanie proliferacji [12, 14, 45, 65] oraz funkcji cytolitycznej komórek LAK [65].

TABELA 1

Wrażliwość komórek linii nowotworowych na cytotoksyczność typu NK i LAK

Ustalona linia nowotworowa	Pierwotne źródło komórek (typ nowotworu)	Wrażliwość na atak komórek o aktywności		Literatura
		NK	LAK	
YAC 1	chłoniak	+	+	2, 7, 36, 37, 51, 52, 53
K 562	białaczka szpikowa	+	+	23, 32, 35, 42, 78
EL 4	grasiczak	-	+	2, 7, 33, 61
MCA 102	mięśniak indukowany metylocholanrenem	-	+	41, 98
AKSL	grasiczak	-	+	51
P 815	guz z komórek tucznych	-	+	2, 7, 36, 51, 52, 53, 94
CL 27A	chłoniak	-	+	2
Daudi	chłoniak Burkitta	-	+	4, 35, 42, 86
M 5076	mięsak siateczkowy	-	+	4
A 498	rak nerki	-	+	4
Raji	limfocyty B zainfekowane EBV	-	+	97
MBL 2	chłoniak	-	+	97
FBL 3	białaczka wywołana wirusem Frienda	-	+	94

III. ZAKRES DZIAŁANIA KOMÓREK LAK

Stwierdzono, że komórki LAK wykazują dużo szersze spektrum działania niż komórki NK. Okazało się, że istnieje wiele linii nowotworowych opornych na atak komórek NK, a jednocześnie wrażliwych na atak komórek LAK. Zestawienie zamieszczono w tab. 1. Okazało się, że komórki LAK działają cytotoksycznie również w stosunku do świeżych komórek guzów autologicznych, syngenicznych i allogenicznych [24].

Także komórki z sztucznie wprowadzonym onkogenem mogą być niszczone przez komórki LAK. Udowodniły to doświadczenia z fibroblastami NIH 3T3, transfekowanymi onkogenem pochodzącym z ludzkiej ostrej białaczki limfatycznej. Te zmienione nowotworowo komórki były odporne na atak NK, natomiast wrażliwe na cytotoksyczność komórek LAK [41].

Komórki LAK uszkadzają również komórki nienowotworowe, lecz zmodyfikowane haptenami, np. TNBS [2, 3, 20] lub TNP [38]. Także komórki (makrofagi) zainfekowane bakteriami [69] lub komórki zainfekowane riketsjami [8] były niszczone przez komórki LAK.

Zaobserwowano, że komórki aktywowane IL-2, pochodzące z populacji LGL i małych, nie posiadających ziarnistości limfocytów w sposób zależny od dawki IL-2, powodują lizę komórek endotelialnych, nie uszkadzają natomiast fibroblastów i komórek epitelium. Liża komórek endotelium była poprzedzona przyłgnięciem do nich komórek LAK [10].

W części prac stwierdzono, że komórki LAK nie niszczą normalnych limfocytów [34], a w innych zwrócono uwagę na niski poziom uszkodzenia limfocytów [38, 86]. W literaturze przeważa pogląd na braku efektu cytotoksycznego w stosunku do nie zmienionych nowotworowo komórek organizmu [8, 12, 21, 51, 79].

IV. POCHODZENIE KOMÓREK LAK

W pracach, w których starano się dać odpowiedź na pytanie, które populacje komórkowe są prekursorami komórek LAK, często przedstawiane były sprzeczne ze sobą wyniki. Obecnie ugruntował się pogląd, że komórki NK są głównym źródłem cytotoksyczności aktywowanej IL-2. Zanim jednak do tego doszło, wykonano wiele badań, z których wyniki zostaną tu przedstawione. Zdarza się, że doświadczenia te są trudne do porównania z uwagi na różne parametry, jakie poddano badaniu, i nie dające się porównać układy doświadczalne.

Z doświadczeń wynika, że komórki LAK, podobnie jak komórki NK, nie podlegają restrykcyi MHC oraz działają w sposób nieswoisty [17, 67]. Pod tym

względem różnią się zasadniczo od limfocytów T cytotoksycznych, zależnych w swoim działaniu od antygenów MHC I klasy i działających swoiście [94].

Trzy rodzaje aktywności cytotoksycznej: limfocytów T, komórek LAK oraz komórek NK można rozróżnić także na podstawie czasu potrzebnego do ich aktywacji. Komórki NK pojawiają się spontanicznie, komórki LAK po około 2-3 dniach inkubacji z IL-2, natomiast limfocyty T cytotoksyczne stają się aktywne po około 5-6 dniach od kontaktu z antygenem [29, 71].

Powiązania między komórkami NK, limfocytami T cytotoksycznymi i komórkami LAK próbowano wyjaśnić badając kolejność pojawiania się różnych aktywności cytotoksycznych po przeszczepie szpiku, subletalnym napromienieniu organizmu lub po podaniu subletalnej dawki cyklofosfamidu (CY). Stwierdzono, że u myszy po syngenicznym lub allogenicznym (zgodnym antygenowo) przeszczepie szpiku już po dwóch tygodniach pojawiają się prekursorzy komórek LAK, natomiast funkcjonalnie dojrzałe limfocyty T wymagają co najmniej 4 tygodni do ujawnienia swojej cytotoksyczności [51]. Bardzo zbliżone wyniki uzyskano dla subletalnego napromienienia, gdzie komórki LAK wykazywały aktywność po około tygodniu, podczas gdy limfocyty T cytotoksyczne po 4 tygodniach od napromienienia [51]. Badania z CY dały odmienne wyniki. Okazało się, że najwcześniej, bo po 6 dniach, pojawiła się aktywność limfocytów T cytotoksycznych, następnie po 9-12 dniach aktywność NK, natomiast komórki LAK można było indukować po około 21 dniach od podania CY [51].

Niektóre prace dowodzą, że komórki zwierząt z linii wsobnych z wrodzonym deficytem komórek NK [1] lub traktowanych przez dłuższy czas przeciwciałami antyasialo-GMI [52] mogą przejawiać po indukcji IL-2 aktywność typu LAK. Inne doświadczenia wskazują, że szczepy kongeniczne z deficytem aktywności NK są niezdolne do produkowania prekursorów komórek LAK [52].

Doświadczalnie stwierdzono, że aktywność LAK może wiązać się z linią limfocytów T. Stwierdzono, że komórki LAK mogą powstawać z tymocytów [67, 68, 82], oraz że mogą one mieć markery charakterystyczne dla limfocytów T [4, 27, 33, 38, 82]. Zaobserwowano również, że limfocyty T w obecności IL-2 mogą wykazywać aktywność cytotoksyczną, nie podlegającą restrykcji głównego układu zgodności tkankowej [67, 82]. Stwierdzono, że w ciągu pierwszych dni hodowli cytotoksyczność ich ogranicza się do komórek nowotworowych wrażliwych na atak komórek NK [27, 50, 80]. Dopiero dłuższa hodowla powoduje tworzenie komórek T cytotoksycznych w stosunku do wielu opornych na atak NK komórek nowotworowych [3, 4, 27, 80, 97].

Najnowsze prace, w których przeprowadzono zarówno analizę negatywną, tzn. traktowano komórki przeciwciałami i dopełniaczem, oraz analizę pozytywną, czyli rozdział komórek na sorterze komórkowym, potwierdziły, że komórki LAK mogą mieć podwójne pochodzenie. Większość komórek LAK

pochodzi z linii komórek NK, a tylko pewna część może wywodzić się od limfocytów T [47, 76, 97].

Udział obu populacji w tworzeniu komórek LAK zależy od narządu, z jakiego pochodzą limfocyty, i od rodzaju komórek docelowych, na których przeprowadza się test cytotoksyczny [66, 70, 91, 97].

W krwi obwodowej, w porównaniu z innymi tkankami, często stwierdzano dużo wyższy udział komórek LAK pochodzących od komórek NK (NK-LAK) niż od limfocytów T (T-LAK) [31, 46, 63, 91, 97].

Wspomniana proporcja zależy też od rodzaju komórek docelowych, użytych do testowania aktywności LAK. Na przykład komórki LAK pochodzące ze splenocytów, a testowane z linią EL 4 lub MCA 5, zachowywały 40% NK-LAK i 60% T-LAK. Gdy jako komórek docelowych użyto linii Yac 1, NK-LAK uzyskiwały ilościową przewagę [33].

Innym przykładem może być usunięcie z populacji mysich splenocytów komórek o fenotypie Thy1^+ , Lyt2^+ . Usunięcie to spowodowało całkowite zahamowanie tworzenia aktywności LAK, skierowanej przeciwko własnym komórkom zmodyfikowanym TNBS, natomiast nie miało efektu na cytotoksyczność LAK przeciwko komórkom nowotworowym. Z kolei eliminacja komórek o fenotypie AsGM1^+ powodowała zupełne usunięcie aktywności LAK w stosunku do wszystkich testowanych komórek [3].

Za tym, że komórki LAK należą głównie do populacji komórek NK przemawiają liczne eksperymenty. Zwrócono uwagę na korelację między zwiększoną aktywnością komórek LAK a wzbogaceniem limfocytów w komórki populacji bogatej w aktywność NK, tzw. populacji LGL (Large Granular Lymphocytes) [23, 70, 90, 93, 97]. Są to limfocyty morfologicznie rozróżniane na podstawie większej niż przeciętnie ilości cytoplazmy oraz licznych ziarnistości na jej terenie [45]. Również wtedy, gdy po aktywacji limfocytów IL-2 eliminowano za pomocą przeciwciał monoklonalnych i dopełniacza spośród nich komórki NK, aktywność LAK zostawała prawie całkowicie zniesiona [31, 70]. W przeciwieństwie do opisanego zjawiska przeciwciała przeciwko antygenom powierzchniowym limfocytów T miały niewielki wpływ na poziom cytotoksyczności wywołanej IL-2 [31, 63].

Porównanie aktywności cytotoksycznej komórek indukowanych IL-2 spośród różnych frakcji limfocytów krwi obwodowej człowieka wykazało różnice między działaniem komórek powstałych z populacji LGL i limfocytów T cytotoksycznych. NK-LAK były dużo aktywniejsze cytotoksycznie w stosunku do komórek linii K 562 niż T-LAK, obydwa rodzaje komórek działały jednakowo na komórki linii MBL 2, natomiast cytotoksyczność w stosunku do komórek Raji pochodziła tylko z frakcji tworzącej NK-LAK [97].

Badania składu antygenów powierzchniowych prekursorów i komórek dojrzałych o aktywności LAK nie dały jednoznacznych wyników. Opisywano zarówno sytuacje, kiedy komórki o różnych markerach powierzchniowych

(mysie splenocyty Thy 1.2⁻ i Thy1.2⁺) po aktywacji nie różniły się rodzajem markera (Thy 1.2⁺) [98], jak również powstawanie niejednorodnej populacji komórek dojrzałych (ludzkie komórki CD5⁺ i CD5⁻) z prekursorów o jednakowych antygenach (limfocyty CD5⁻) [91].

Również komórki LAK tworzone z prekursorów ze szpiku kostnego o fenotypie Qa2⁺, Qa5⁺, Thy1⁺, AsGM1⁺, NK⁺, Lyt2⁻ stanowiły dwie różne populacje komórek: NK-podobne o fenotypie NK1⁺, Qa5⁺, AsGM1⁺, Thy1⁺, Lyt2⁻ oraz T-podobne o fenotypie NK1⁻, Qa5⁺, AsGM1⁺, Thy1⁺, Lyt2⁺ [36].

Tymocyty ludzkie CD1⁻ i CD3⁻ po inkubacji z IL-2 tworzyły komórki efektorowe LAK o fenotypie CD3⁻, HNK1⁻, CD16⁻, NKH1⁺ [68].

TABELA 2

Występowanie antygenów różnicowania na prekursorowych i efektorowych komórkach LAK

Komórki ludzkie					
komórki prekursorowe			komórki efektorowe		
CD3	-	[18, 26, 68]	CD3	+	[8, 18]
CD4	nie badano			+/-	[55]
CD5	-	[91]		-	[26, 68, 48]
CD8	nie badano		CD4	-	[8, 48, 55]
CD16	+	[26, 48]	CD5	+/-	[91]
NKH1	+	[26, 48]	CD8	+	[8, 18]
				-	[48, 55]
			CD16	+	[26, 48]
				-	[68]
			NKH1	+	[26, 48, 68]
Komórki mysie					
komórki prekursorowe			komórki efektorowe		
Thy1	+	[82]	Thy1	+	[13, 26, 38, 59, 98]
	+/-	[48, 98]	L3T4	-	[26, 38]
	-	[3, 13, 59]	Lyt2	+	[13, 38]
L3T4	-	[26, 48, 76]		+/-	[33]
Lyt2	-	[3, 26, 48, 76]		-	[26]
AsGM1	+	[3, 13, 26, 48, 76, 98]	AsGM1	+	[26, 48, 94]
				+/-	[33]
				-	[38]

Na podstawie badań mysich komórek śledziony, otrzymanych po wirowaniu w gradiencie gęstości na Percollu, stwierdzono, że prekursorzy komórek LAK są obecnie we frakcjach bogatych w komórki NK i we frakcjach bogatych w limfocyty T cytotoksyczne. Frakcja pierwsza składała się z komó-

rek Thy1^- , Lyt2^- i AsGM1^+ , a frakcja druga z komórek Thy1^+ , Lyt2^+ i AsGM1^+ . Frakcja pierwsza, składająca się z komórek NK-LAK, uzyskiwała aktywność cytotoksyczną szybciej niż komórki frakcji drugiej (T-LAK). NK-LAK wymagały też mniejszych ilości IL-2 niż T-LAK [3].

Rozdzielenia prekursorów komórek LAK na Percollu dokonano również używając mysich komórek szpiku. Wyniki były bardzo zbliżone do wyników uzyskanych dla komórek śledziony [53].

Najczęściej występujące markery powierzchniowe na komórkach prekursorowych i efektorowych LAK przedstawiono w tab. 2. Jak widać, komórki o aktywności LAK powstają zarówno z komórek populacji NK, jak i limfocytów T cytotoksycznych. Jednakże należy przyznać, że limfocyty T cytotoksyczne o aktywności LAK często mają na swojej powierzchni antygeny charakterystyczne dla komórek NK, takie jak NKH1 [28, 77] czy Leu7 [91]; nie są to więc typowe limfocyty T. Generalnie można stwierdzić, że większa część aktywności LAK pochodzi od komórek NK, jednak proporcje NK-LAK do T-LAK zależą od tkanki, z której pochodzą komórki LAK, oraz od rodzaju komórek docelowych.

V. WPLYW MEDIATORÓW IMMUNOLOGICZNYCH I ŚRODKÓW FARMAKOLOGICZNYCH NA AKTYWNOŚĆ LAK

Aktywność komórek LAK może być zależna od obecności cytokinin w środowisku. Zbadano wpływ interferonów na aktywność LAK i NK. Inkubacja komórek śledziony z rekombinowanym ludzkim interferonem- α A/D (rHuIFN- α A/D) w przeciwieństwie do wyników uzyskanych dla komórek NK hamowała powstawanie komórek LAK. Maksymalne zahamowanie miało miejsce, gdy rHuIFN- α A/D podawano razem z IL-2. Hamowanie to zmniejszało się, a nawet całkowicie ustępowało, gdy interferon podawano po 1 lub 2 dniu inkubacji komórek z IL-2 [5]. Podobne działanie ludzkiego IFN- α A było opisywane przez innych autorów [87]. W części badań stwierdzono, że dodanie rIFN- γ do komórek inkubowanych wraz z IL-2 powoduje wzrost aktywności cytotoxicznej komórek LAK [5, 32, 62], nie ma natomiast wpływu na proliferację tych komórek [5]. Inne doświadczenia wykazały, że ludzki IFN- γ nie ma wpływu na aktywność komórek LAK [87].

Istnieją sprzeczne doniesienia dotyczące działania IFN- β na komórki LAK. Część badaczy uważa, że IFN- β może podwyższać aktywność komórek LAK [62], wyniki innych badaczy sugerują jego hamujący wpływ [87].

Zbadano również działanie β -IL-1 na aktywność komórek LAK. Stwierdzono, że wywiera on efekt pobudzający [62].

Do innych czynników, których wpływ na komórki LAK został opisany, należą hydrokortyzon i cyklosporyna A. Zauważono, że komórki LAK są wyjątkowo wrażliwe na hydrokortyzon. Jednocześnie ustalono, że hydrokor-

tyzon miał niewielki wpływ na aktywność limfocytów T cytotoksycznych [22]. Zupełnie przeciwny efekt wywierała cyklosporyna A. Nie miała ona wpływu na aktywność komórek LAK, całkowicie natomiast hamowała aktywację limfocytów T cytotoksycznych [21, 22].

Zbadano także wpływ środków farmakologicznych na cytotoksyczność komórek LAK. Stwierdzono, że EDTA hamuje w jednakowym stopniu aktywność LGL, aktywność LAK pochodzącą z LGL oraz aktywność LAK pochodzącą od cytotoksycznych limfocytów T. Świadczy to o roli Ca^{2+} i Mg^{2+} w procesie cytotoksyczności z udziałem tych populacji komórek. Dwuwartościowe kationy są niezbędne do utworzenia wiązania między komórką efektorową a docelową [97].

Trypsyna, fosforan D-mannozy [97] i deksametazon [30], które prawie całkowicie hamowały cytotoksyczność LGL, miały niewielki hamujący wpływ na aktywność cytotoksyczną hodowanych z IL-2 LGL i cytotoksycznych limfocytów T.

Wykonano również eksperymenty z prostaglandynami (PGE2 i PGF2 α). Okazało się, że PGE2 zmniejsza o połowę cytotoksyczność LGL, o jedną czwartą aktywność T-LAK, a na aktywność LAK pochodzącą od LGL ma znikomy hamujący wpływ [30, 97]. Prostaglandyna F2 α nie hamowała żadnej z tych cytotoksyczności [97].

VI. ANTYNOWOTWOROWE DZIAŁANIE KOMÓREK LAK IN VIVO

Nie tylko *in vitro* cytotoksyczność komórek LAK okazała się bardziej efektywna w niszczeniu komórek nowotworowych od innych rodzajów cytotoksyczności. Również eksperymenty na zwierzętach oraz obserwacje kliniczne wykazały dużą skuteczność działania komórek LAK.

Stwierdzono, że *in vivo* komórki LAK mogą być cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych z niehodowanych, litych guzów niewrażliwych na cytotoksyczność typu NK [17, 32, 45].

Przeprowadzono badania na zwierzętach z przerzutami takich nowotworów jak mięsaki i czerniaki do płuc i wątroby. Badania te wykazały skuteczność podawania komórek LAK i IL-2 w całkowitym lub częściowym hamowaniu wzrostu tych nowotworów [6, 39, 40, 49, 56–59]. Niezależnie od tego, czy komórki LAK były autologiczne, czy allogeniczne w stosunku do biorcy, działały w jednakowym stopniu cytotoksycznie na komórki zmienione nowotworowo [14].

Stwierdzono, że przeszczepione komórki LAK podane zwierzęciu wraz z IL-2 mogą rozmnażać się w płucach, wątrobie i nerkach [12]. Podawana IL-2 jednocześnie z komórkami LAK stymuluje *in vivo* ich proliferację [11, 12, 14] i migrację [12]. Wnioski te wyciągnięto m. in. z doświadczeń, w których

zauważono, że napromienione zwierzę po podaniu IL-2 nie tworzy komórek LAK, natomiast podanie takiemu zwierzęciu komórek LAK z IL-2 powodowało proliferację tych komórek i powstawanie aktywności antynowotworowej, zależnej od IL-2 [12].

Badano również aktywność antynowotworową samej IL-2. Okazało się, że stymulowała ona tworzenie się *in vivo* komórek LAK z endogennych limfocytów oraz pobudzała je do proliferacji [11, 12]. Stwierdzono jednak, że IL-2 tylko w bardzo wysokich stężeniach powodowała skuteczne niszczenie komórek nowotworowych [57, 58, 96].

VII. KLINICZNE ZASTOSOWANIE KOMÓREK O AKTYWNOŚCI LAK

Próby leczenia nowotworów u zwierząt doświadczalnych podawaniem interleukiny 2 dały pozytywne wyniki. Zdecydowano się więc zastosować ją w terapii nowotworów u ludzi. Pierwsze próby takiego leczenia podjął zespół S.A. Rosenberga. Chorym podawano początkowo samą IL-2. Stwierdzono, że dawki podzielone dawały lepsze rezultaty niż pojedyncze wstrzyknięcie całej porcji leku [73]. Ilości IL-2, które działały skutecznie antynowotworowo, były jednak źle tolerowane przez organizm [43, 44, 96]. Silne skutki uboczne uniemożliwiły kliniczne wprowadzenie takiej terapii na szerszą skalę. Interleukina 2 powodowała podciśnienie, gorączkę, zatrzymanie płynów w organizmie, zmiany w obrazie krwi, zmiany w poziomie niektórych hormonów i enzymów oraz wiele innych objawów często niebezpiecznych dla życia pacjenta [54, 74, 96].

Leczenie tylko za pomocą komórek LAK nie dało także oczekiwanych rezultatów [64]. Dzieje się tak prawdopodobnie z powodu braku czynnika, który podtrzymywałby aktywność lub stymulował proliferację tych komórek *in vivo*. Wcześniej stwierdzono, że efektywność niszczenia nowotworu jest zależna od liczby przetoczonych komórek efektorowych [14, 39, 57].

W praktyce najkorzystniejsze okazało się połączenie obu tych metod [39, 40, 56–58, 72, 74]. Zmniejszono w ten sposób ilości podawanej IL-2, a więc i działania uboczne, jakie towarzyszyło leczeniu interleukiną 2, a wykorzystano synergistyczny efekt działania IL-2 i komórek LAK. Pierwszym etapem leczenia było uzyskanie przy użyciu separatora komórkowego dużej liczby limfocytów chorego. Następnie inkubowano je *in vitro* z IL-2, indukując aktywność komórek LAK i „oddawano” choremu w kroplówce dożylniej. Stwierdzono, że najkorzystniejszy efekt uzyskano stosując wielokrotnie przetażania komórek LAK i IL-2 [13, 17, 24]. Zapewniono w ten sposób stały poziom IL-2 i komórek LAK w organizmie.

Aby leczenie IL-2 i komórkami LAK było skuteczne, pacjentom podawano dożylnie od 10 000 do 100 000 jednostek IL-2 na kg wagi ciała, co 8 godz. przez

3–7 dni. Limfocyty autologiczne były hodowane przez 3–5 dni w obecności 1000 jednostek IL-2/ml, a następnie 10^{10} lub więcej tych komórek wstrzykiwano pacjentowi [17, 74]. Stwierdzono, że lepszy efekt daje miejscowe podanie komórek LAK niż ogólne. Na przykład w przypadku leczenia nowotworu wątroby miejscowe podanie komórek LAK, tzn. do żyły wątrobowej, daje lepszy efekt niż podanie ogólne. Gdy leczony jest nowotwór jamy otrzewnowej, najlepszy skutek odnosi podanie komórek dootrzewnowo [88].

Immunoterapię komórkami LAK i IL-2 zastosowano w leczeniu raka nerki, czerniaka, raka okrężnicy, chłoniaka nieziarniczego często z bardzo dobrym skutkiem, tzn. całkowitym zanikiem guza [17, 74].

W części prac opisano tworzenie *in vitro* komórek LAK z limfocytów od chorych na ostrą i przewlekłą białaczkę szpikową, białaczkę limfatyczną i raka jajnika. Wcześniej stwierdzono, że przypadki tych nowotworów były połączone z defektem komórek NK, jednak z krwi tych chorych, po dłuższej niż w przypadku normalnych limfocytów inkubacji z IL-2, udało się wytworzyć komórki LAK. Komórki te powodowały *in vitro* niszczenie świeżych komórek białaczkowych [45]. Również komórki ostrej białaczki T limfocytarnej, nie wykazujące aktywności cytotoksycznej, po inkubacji z IL-2 niszczyły komórki nowotworowe odporne na cytotoksyczność NK [34].

Podsumowując, należy podkreślić, że nowa metoda immunoterapii komórkami LAK i IL-2 stworzyła duże możliwości leczenia chorób nowotworowych. Z pewnością metody leczenia komórkami LAK i IL-2 wymagają jeszcze dopracowania, zwłaszcza w aspekcie zmniejszenia skutków ubocznych oraz wysokich kosztów kuracji, lecz w chwili obecnej można mieć nadzieję, że uciążliwości te zostaną w przyszłości usunięte.

LITERATURA

- [1] ANDRIOLE G. L., MULE J. J., HANSEN C. T., LINEHAN W. M., ROSENBERG S. A., Evidence that lymphokine-activated killer cells and natural killer cells are distinct based on an analysis of congenitally immunodeficient mice, *J. Immunol.*, **135**: 2911–2913, 1985.
- [2] BALLAS Z. K., Lymphokine-activated killer (LAK) cells. I. Differential recovery of LAK, natural killer cells, and cytotoxic T lymphocytes after a sublethal dose of cyclophosphamide, *J. Immunol.*, **137**: 2380–2384, 1986.
- [3] BALLAS Z. K., RASMUSSEN W., van OTEGHAM J. K., Lymphokine activated killer (LAK) cells. II. Delineation of distinct murine LAK-precursors subpopulations, *J. Immunol.*, **138**: 1647–1652, 1987.
- [4] BROOKS C. G., Reversible induction of natural killer cell activity in clonal murine cytotoxic T lymphocytes, *Nature*, **305**: 155–157, 1983.
- [5] BRUNDA M. J., TARNOWSKI D., DAVATELIS V., Interaction of recombinant interferons with recombinant interleukin-2: Differential effects on natural killer cell activity and interleukin-2-activated killer cells, *Int. J. Cancer*, **37**: 787–793, 1986.
- [6] BUBENIK J., INDROVA M., Cancer immunotherapy using local interleukin 2 administration, *Immunol. Lett.*, **16**: 305–310, 1987.

- [7] BUDD R. C., CEROTTINI J. C., MacDONALD H. R., Cultured Lyt-2- L3T4- T lymphocytes from normal thymus or lpr mice express a broad spectrum of cytotoxic activity, *J. Immunol.*, **137**: 3734–3741, 1986.
- [8] CARL M., DASCH G. A., Characterization of human cytotoxic lymphocytes directed against cells infected with typhus group rickettsiae: Evidence for lymphokine activation of effectors, *J. Immunol.*, **136**: 2654–2661, 1986.
- [9] CHIN T. W., ANK B. J., STROM S. R., STICHM E. R., Enhanced interferon production and lymphokine-activated cytotoxicity of human placental cells, *Cell. Immunol.*, **113**: 1–9 1988.
- [10] DAMLE N. K., DOYLE L. V., BENDER J. R., BRADLEY E. C., Interleukin 2-activated human lymphocytes exhibit enhanced adhesion to normal vascular endothelial cells and cause their lysis, *J. Immunol.*, **138**: 1779–1785, 1987.
- [11] ETTINGHAUSEN S. E., LIPFORD E. H., III, MULE J. J., ROSENBERG S. A., Systemic administration of recombinant interleukin-2 stimulates in vivo lymphoid cell proliferation in tissues, *J. Immunol.*, **135**: 1488–1497, 1985.
- [12] ETTINGHAUSEN S. E., LIPFORD E. H., III, MULE J. J., ROSENBERG S. A., Recombinant interleukin-2 stimulates in vivo proliferation of adoptively transferred lymphokine activated killer (LAK) cells, *J. Immunol.*, **135**: 3623–3635, 1985.
- [13] ETTINGHAUSEN S. E., ROSENBERG S. A., Immunotherapy of murine sarcomas using lymphokine activated killer cells: Optimization of the schedule and route of administration of recombinant interleukin-2, *Cancer Res.*, **46**: 2784–2792, 1986.
- [14] – The adoptive immunotherapy of cancer using lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2, *Springer Semin. Immunopathol.*, **9**: 51–71, 1986.
- [15] GAMBACORTI-PASSERINI C., RADRIZZANI M., ERBA E., FOSSATI G., PARMIANI G., Lysis of activated lymphocytes of melanoma and small lung cancer cells surviving in vitro treatment with mafosfamide, *Cancer Res.*, **47**: 2547–2552, 1987.
- [16] GRIEND R. J. van de, TAX W. J. M., KRIMPEN B. A van, VREUGDENHIL R. J., RONTELTAP C. P. M., BOLHUIS R. L. H., Lysis of tumor cells by CD3+4–8–16+ T cell receptor $\alpha\beta$ -clones, regulated via CD3 and CD16 activation sites, recombinant interleukin 2, and interferon β , *J. Immunol.*, **138**: 1527–1533, 1987.
- [17] GRIMM E. A., MAZUMDER A., ZHANG H. Z., ROSENBERG S. A., Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **155**: 1823–1841, 1982.
- [18] GRIMM E. A., RAMSEY K. M., MAZUMDER A., WILSON D. J., DJEU J. Y., ROSENBERG S. A., Lymphokine activated killer cells phenomenon. II. Precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes and natural killer cells, *J. Exp. Med.*, **157**: 884–897, 1983.
- [19] GRIMM E. A., ROBB R. J., ROTH J. A., NECKERS J. A., LACHMAN L. B., WILSON D. J., ROSENBERG S. A., Lymphokine-activated killer cell phenomenon: III. Evidence that IL-2 alone is sufficient for direct activation of PBL into LAK, *J. Exp. Med.*, **158**: 1356–1361, 1983.
- [20] GRIMM E. A., WILSON D. J., The human lymphokine activated killer cell system. V. Purified recombinant interleukin-2 activates cytotoxic lymphocytes which lyse both NK resistant autologous and allogeneic tumors and trinitrophenyl-modified autologous PBL, *Cell. Immunol.*, **94**: 568–578, 1985.
- [21] GRIMM E. A., MUUL L. M., WILSON D. J., The differential inhibitory effects exerted by cyclosporine and hydrocortisone on the activation of human cytotoxic lymphocytes by recombinant interleukin-2 versus allospecific CTL, *Transplantation*, **39**: 537–540, 1985.
- [22] GRIMM E. A., Human lymphokine-activated killer cells (LAK cells) as a potential immunotherapeutic modality, *Bioch. Biophys. Acta*, **865**: 267–279, 1986.

- [23] HAREL-BELLAN A., BERTOGLIO J., QUILLET A., MARCHIOL C., WAKASUGI H., MISHALL Z., FRADELIZI D., Interleukin 2 (IL 2) up-regulates its own receptor on a subset of human unprimed peripheral blood lymphocytes and triggers their proliferation, *J. Immunol.*, **136**: 2463–2469, 1986.
- [24] HERBERMAN R. B., Adoptive therapy for cancer with interleukin-2 – activated killer cells, *Cancer Bull.*, **39**: 6–13, 1987.
- [25] – Lymphocytes: Cytotoxic activities, red. J. I. Gallin, I. M. Goldstein and R. Snyderman, Raven Press, New York 1988, 613–629.
- [26] – Lymphokine-activated killer cell activity, *Immunol. Today*, **8**: 178–181, 1987.
- [27] HERCEND T., MAUER S., BRENNAN A., EDSON M. A., ACUTO O., REINHERZ E. L., SCHLOSSMAN S. F., RITZ J., Natural killer-like function of activated T lymphocytes: Differential blocking effect of monoclonal antibodies specific for a 90 KD clonotypic structure, *Cell. Immunol.*, **86**: 381–392, 1984.
- [28] HERCEND T., REINHERZ E. L., MAUER S. C., SCHLOSSMAN S. F., RITZ J., Phenotypic and functional heterogeneity of human cloned natural killer cell lines, *Nature*, **301**: 158–160, 1983.
- [29] HERSEY P., BOLHUIS R., 'Nonspecific' MHC-unrestricted killer cells and their receptors, *Immunol. Today*, **8**: 233–239, 1987.
- [30] IMIR T., SIBBITT W., BANKHURST A., The relative resistance of lymphokine activated killer cells to suppression by prostaglandins and glucocorticoids, *Prostagl. Leukotr. Med.*, **28**: 111–118, 1987.
- [31] ITOH K., TILDEN A. B., KUMAGAI K., BALCH C. M., Leu-11+ lymphocytes with natural killer (NK) activity are precursors of recombinant interleukin-2 (IL-2)-induced activated (AK) cells, *J. Immunol.*, **134**: 802–806, 1985.
- [32] ITOH K., TILDEN A. B., BALCH C. M., Lysis of human solid tumor cells by lymphokine activated natural killer cells, *J. Immunol.*, **136**: 3910–3915, 1986.
- [33] KALLAND T., BELFRAGE H., BHILADVALA P., HEDLUNG G., Analysis of the murine lymphokine activated killer (LAK) cell phenomenon: Dissection of effectors and progenitors into NK- and T-like cells, *J. Immunol.*, **138**: 3640–3645, 1987.
- [34] KAUFMANN Y., LEVANON M., DAVIDSOHN J., RAMOT B., Interleukin-2 induces human acute lymphocytic leukemia cells to manifest lymphokine activated killer (LAK) activity, *J. Immunol.*, **139**: 977–982, 1987.
- [35] KOLITZ J. E., WELTE K., WONG G. Y., HOLLOWAY K., MERLUZZI V. J., EUGERT A., BRADLEY E. D., KONRAD M., POLIVKA A., GABRILOVE J. L., SYKORA K. W., MILLER G. A., FIEDLER W., KROWN S., OETTGEN H. F., MERTELSMANN R., Expansion of activated T lymphocytes in patients treated with recombinant interleukin 2, *J. Biol. Res. Modif.*, **6**: 412–429, 1987.
- [36] KOO G. C., MANYAK C. L., Generation of cytotoxic cells from murine bone marrow by human recombinant IL-2, *J. Immunol.*, **137**: 1751–1756, 1986.
- [37] KOO G. C., DUMONT F. J., TUTT M., HACKETT J. Jr., KUMAR V., The NK-1.1(–) mouse: A model to study differentiation of NK cells, *J. Immunol.*, **137**: 3742–3747, 1986.
- [38] KORIYAMA T., SUZUKI G., NAKAO I., AIZAWA S., OKUMURA K., NISHIMURA T., TAKAKU F., Induction of anomalous killing activity from antigen-specific CTL clones by adding high doses of human recombinant interleukin 2, *Cell. Immunol.*, **111**: 482–491, 1988.
- [39] LAFRENIERE R., ROSENBERG S. A., Successful immunotherapy of experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2, *Cancer Res.*, **45**: 3735–3741, 1985.
- [40] LAFRENIERE R., ROSENBERG S. A., Adoptive immunotherapy to murine hepatic metastases with lymphokine activated killer (LAK) cells and recombinant interleukin-2 (RIL-2) can mediate the regression of both immunogenic and nonimmunogenic sarcomas and an adenocarcinoma, *J. Immunol.*, **135**: 4273–4280, 1985.

- [41] LANZA L. A., WILSON D. J., IKEJIRI B., ROTH J., GRIMM E. A., Human oncogene-transfected tumor cells display differential susceptibility to lysis by lymphokine-activated killer cells (LAK) and natural killer cells, *J. Immunol.*, **137**: 2716–2720, 1986.
- [42] LONDON L., PERUSSIA B., TRINCHIERI G., Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: IL 2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells, but only a minor subset of low density T cells, *J. Immunol.*, **137**: 3845–3854, 1986.
- [43] LOTZE M., FRANA L., SHARROW S., ROBB R. J., ROSENBERG S. A., In vivo administration of purified human interleukin-2: I. Half-life and immunologic effects of the Jurkat cell line-derived interleukin-2, *J. Immunol.*, **134**: 157–166, 1985.
- [44] LOTZE M., MATORY Y., ETTINGHAUSEN S., RAYNER A. A., SHARROW S. O., SEIPP C. A. Y., CUSTER M. C., ROSENBERG S. A., In vivo administration of purified human interleukin-2: II. Half-life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant interleukin-2, *J. Immunol.*, **135**: 2865–2870, 1985.
- [45] LOTZOVA E., Interleukin-2-generated killer cells, their characterization and role in cancer therapy, *Cancer Bull.*, **39**: 30–38, 1987.
- [46] LOTZOVA E., SAVARY C. A., HERBERMAN R. B., Induction of NK activity against fresh human leukemia in culture with interleukin-2, *J. Immunol.*, **138**: 2718–2727, 1987.
- [47] LOTZOVA E., SAVARY C. A., Generation of NK cell activity from human bone marrow, *J. Immunol.*, **139**: 279–284, 1987.
- [48] LOTZOVA E., HERBERMAN R. B., Reassessment of LAK phenomenology: A review, *Nat. Immun. Cell Growth Regul.*, **6**: 109–115, 1987.
- [49] MAZUMDER A., ROSENBERG S. A., Successful immunotherapy of natural killer – resistant established pulmonary melanoma metastases by the intravenous adoptive transfer of syngeneic lymphocytes activated in vitro by interleukin-2, *J. Exp. Med.*, **159**: 495–507, 1984.
- [50] MERLUZZI V. J., SAVAGE D. M., MERTELSMANN R., WELTE K., Generation of nonspecific murine cytotoxic cells in vitro by purified human interleukin 2, *Cell. Immunol.*, **84**: 74–84, 1984.
- [51] MERLUZZI V. J., SAVAGE D. M., SMITH M. D., LAST-BARNEY K., MERTELSMANN R., MOORE M. A. S., WELTE K., Lymphokine-activated killer cells are generated before classical cytotoxic T lymphocytes after bone marrow transplantation in mice, *J. Immunol.*, **135**: 1702–1706, 1985.
- [52] MERLUZZI V. J., SMITH M. D., LAST-BARNEY K., Similarities and distinction between murine natural killer cells and lymphokine-activated killer cells, *Cell. Immunol.*, **100**: 563–569, 1986.
- [53] MERLUZZI V. J., TRAIL P. A., LAST-BARNEY K., Differential expression of lymphokine-activated killer cells and natural killer cells in adoptive transfer experiments utilizing fractionated bone marrow, *J. Immunol.*, **137**: 2425–2427, 1986.
- [54] MIER J. W., Therapeutic uses of recombinant interleukin-2 in patients with cancer. *Cancer Bull.*, **39**: 19–24, 1987.
- [55] MINGARI M. C., FERRINI S., PENDE D., BOTTINO C., PRIGIONE I., MORETTA A., MORETTA L., Phenotypic and functional analysis of human CD3⁺ and CD3⁻ clones with „lymphokine-activated killer” (LAK) activity. Frequent occurrence of CD3⁺ LAK clones which produce interleukin-2, *Int. J. Cancer*, **40**: 495–498, 1987.
- [56] MULE J. J., SHU S., SCHWARZ S. L., ROSENBERG S. A., Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2, *Science (Wash. DC)*, **225**: 1487–1489, 1984.
- [57] MULE J. J., SHU S., ROSENBERG S. A., The antitumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in vivo, *J. Immunol.*, **135**: 646–652, 1985.
- [58] MULE J. J., ETTINGHAUSEN S. E., SPIESS P. J., SHU S., ROSENBERG S. A., Antitumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in vivo:

- Survival benefit and mechanisms of tumor escape in mice undergoing immunotherapy, *Cancer Res.*, **46**: 676–683, 1986.
- [59] MULE J. J., YANG J., SHU S., ROSENBERG S. A., The anti-tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 in vivo: Direct correlation between reduction of established metastases and cytotoxic activity of lymphokine-activated killer cells, *J. Immunol.*, **136**: 3899–3909, 1986.
- [60] MUUL L. M., NASON-BURCHENAL K., HYATT C., SCHWARZ S., SLAVIN D., DIRECTOR E. P., ROSENBERG S. A., Studies of serum-free culture medium in the generation of lymphokine activated killer cells, *J. Immunol. Methods*, **105**: 183–192, 1987.
- [61] NISHIMURA T., UCHIYAMA Y., MASHIMOTO Y., In vivo generation of lymphokine-activated killer cells by sensitization with interleukin 2-producing syngenic T-lymphoma cells. *Cell, Immunol.*, **112**: 220–225, 1988.
- [62] OCHOA A. C., GROMO G., ALTER B. J., SONDEL P. M., BACH F. H., Long-term growth of lymphokine activated killer (LAK) cells: Role of anti CD3, β -IL-1, interferon- γ and $-\beta$, *J. Immunol.*, **138**: 2728–2733, 1987.
- [63] ORTALDO J. R., MASON A., OVERTON R., Lymphokine-activated killer cells: Analysis of progenitors and effectors, *J. Exp. Med.*, **164**: 1193–1205, 1986.
- [64] OTTOW R. T., STELLER E. P., SUGARBAKER P. H., WESLEY R. A., ROSENBERG S. A., Immunotherapy of intraperitoneal cancer with interleukin-2 and lymphokine activated killer cells reduces tumor load and prolongs survival in murine models, *Cell. Immunol.*, **104**: 366–376, 1987.
- [65] OVEN-SCHAUB L. B., LONDON W. G., YAGITA M., GRIMM E. A., Functional differentiation of human lymphokine-activated killing (LAK) is distinct from expansion and involves dissimilar interleukin 2 receptor, *Cell. Immunol.*, **111**: 235–246, 1988.
- [66] PHILLIPS J. H., LANIER L. L., Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon: Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytolysis, *J. Exp. Med.*, **164**: 814–825, 1986.
- [67] PHILLIPS J. H., LANIER L. L., Acquisition of non-MHC restricted cytotoxic function by IL-2 activated thymocytes with an immature antigenic phenotype, *J. Immunol.*, **139**: 683–687, 1987.
- [68] RANSEDELL F. J., GOLUB S. H., Generation of lymphokine activated killer cell activity from human thymocytes, *J. Immunol.*, **139**: 1446–1453, 1987.
- [69] RESNICK M., ROGUEL M., BERCOVIER H., ENK C., FRANKENBURG S., KEDAR E., Lysis of murine macrophages infected with intracellular pathogens by interleukin 2-activated killer (LAK) cells in vitro, *Cell. Immunol.*, **113**: 214–219, 1988.
- [70] ROBINSON B. W. S., MORSTYN G., Natural killer (NK)-resistant human lung cancer cells are lysed by recombinant interleukin-2-activated NK cells, *Cell. Immunol.*, **106**: 215–222, 1987.
- [71] ROSENBERG S. A., Adoptive immunotherapy of cancer: accomplishments and prospects, *Canc. Treat. Rep.*, **68**: 233–255, 1984.
- [72] ROSENBERG S. A., MULE J. J., SPIESS P. J., REICHERT C. M., SCHWARZ S. L., Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2, *J. Exp. Med.*, **161**: 1169–1188, 1985.
- [73] ROSENBERG S. A., LOTZE M. T., MUUL L. M., Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer, *N. Engl. J. Med.*, **313**: 1485–1492, 1985.
- [74] ROSENBERG S. A., LOTZE M. T., MUUL L. M., CHANG A. E., AVIS F. P., LEITMAN S., LINEHAN W. M., ROBERTSON C. N., LEE R. E., RUBIN J. T., SEIPP C. A., SIMPSON C. G., WHITE D. E., A progress report on the treatment of 157 patients with

- advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone, *N. Engl. J. Med.*, **316**: 889-897, 1987.
- [75] ROSENSTEIN M., YRON I., KAUFMANN Y., ROSENBERG S. A., Lymphokine-activated killer cells: lysis of fresh syngenic natural killer resistant murine tumor cells by lymphocytes cultured in interleukin 2, *Cancer Res.*, **44**: 1946-1953, 1984.
- [76] SALUP R. R., MATHIESON B. J., WILTROUT R. H., Precursor phenotype of lymphokine-activated killer cells in the mouse, *J. Immunol.*, **138**: 3635-3639, 1987.
- [77] SCHMIDT R. E., HERCEND T., FOX D. A., BENSUSSAN A., BARTLEY G., DALEY J. F., SCHLOSSMAN S. F., REINHERZ E. L., RITZ J., The role of interleukin 2 and T11 E rosette antigen in activation and proliferation of human NK clones, *J. Immunol.*, **135**: 672-678, 1985.
- [78] SHANAHAN F., BROGAN M. D., NEWMAN W., TARGAN S. R., K562 killing by K, IL 2-responsive NK, and T cells involves different effector cell post-binding trigger mechanisms, *J. Immunol.*, **137**: 723-726, 1986.
- [79] SHILONI E., EISENTHAL A., SACHS D., ROSENBERG S. A., Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by murine lymphocytes activated in recombinant interleukin 2, *J. Immunol.*, **138**: 1992-1998, 1987.
- [80] SHORTMAN K., WILSON A., SCOLLAY R., CHEN W. F., Development of large granular lymphocytes with anomalous, nonspecific cytotoxicity in clones derived from Ly-2⁺ T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 2728-2732, 1983.
- [81] SHU S., CHOU T., ROSENBERG S. A., In vitro sensitization and expansion with viable tumor cells and interleukin 2 in the generation of specific therapeutic effector cells, *J. Immunol.*, **136**: 3891-3898, 1986.
- [82] SKINNER M., MARBROOK J., Effect of interleukin 2 on foetal thymocytes in organ cultures: Generation of lymphokine-activated killer cells, *Cell. Immunol.*, **112**: 104-111, 1988.
- [83] SKÓRSKI T., Rola makrofagów, monocytów i granulocytów w zwalczaniu nowotworów, *Post. Biol. Kom.*, **12**: 185-204, 1985.
- [84] — Komórki NK i K: Charakterystyka, stymulacja aktywności i rola w zwalczaniu nowotworów, *Post. Biol. Kom.* **13**: 51-74, 1986.
- [85] — Limfocyty B i T: Charakterystyka, stymulacja aktywności i rola w zwalczaniu nowotworów, *Post. Biol. Kom.* **13**: 335-358, 1986.
- [86] SONDEL P. M., HANK J. A., KOHLER P. C., CHEN B. P., MINKOFF D. Z., MOLEND A. J. A., Destruction of autologous human lymphocytes by interleukin 2-activated cytotoxic cells, *J. Immunol.*, **137**: 502-511, 1986.
- [87] SONE S., UTSUGI T., NII A., OGURA T., Differential effects of recombinant interferons α , β and γ on induction of human lymphokine (IL-2) — activated killer activity, *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**: 425-431, 1988.
- [88] SUGARBAKER P. H., EGGERMONT A. M. M., OTTOW R., EDINGTON H., STELLER E. P., Effector cell competition for interleukin-2-A fundamental control mechanism of immunologic and immunotherapeutic phenomena, *Cancer Bull.*, **39**: 38-51, 1987.
- [89] SUGARBAKER P. H., MATTHEWS W., STELLER E. P., EGGERMONT A. M. M., Inhibitory effects of alloimmune T cells on the generation of cytolytic responses of lymphokine-activated killer cells, *J. Biol. Res. Modif.*, **6**: 430-445, 1987.
- [90] TALMADGE J. E., WILTROUT R. H., COUNTS D. F., HERBERMAN R. B., McDONALD T., ORTALDO J. R., Proliferation of human peripheral blood lymphocytes induced by recombinant human interleukin 2: Contribution of large granular lymphocytes and T lymphocytes, *Cell. Immunol.*, **102**: 261-272, 1986.
- [91] TILDEN A. B., ITOH K., BALCH C. M., Human lymphokine activated killer (LAK) cells: identification of two types of effector cells, *J. Immunol.*, **138**: 1068-1073, 1987.
- [92] TIMONEN T., RANKIN A., SAKSELA E., HAYRY P., Fractionation, morphological and

- functional characterization of effector cells responsible for human natural killer activity against cell-line targets, *Cell. Immunol.*, **48**: 121–132, 1979.
- [93] TIMONEN T., ORTALDO J. R., HERBERMANN R. B., Fractionation, morphological and functional characterization of effector cells responsible for human natural killer activity against cell-line targets, *Cell. Immunol.*, **48**: 133–148, 1979.
- [94] TING C. C., HARGROVE M. E., WUNDERLICH J., LOH N. N., Differential expression of asialo GM1 on alloreactive cytotoxic T lymphocytes and lymphokine-activated killer cells, *Cell. Immunol.*, **104**: 115–125, 1987.
- [95] VOŚĘ B. M., Specific T-cell-mediated killing of autologous lung tumor cells, *Cell. Immunol.*, **55**: 12–19, 1980.
- [96] WEST W. H., TAUER K. W., YANNELLI J. R., MARSHALL G. D., ORR D. W., THURMAN G. B., OLDHAM R. K., Constant-infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer, *N. Engl. J. Med.*, **316**: 898–905, 1987.
- [97] YAMADA S., ORTALDO J. R., Regulation of large granular lymphocytes and human T cell growth and function by recombinant interleukin 2, *J. Leukocyte Biol.*, **42**: 263–272, 1987.
- [98] YANG J. C., MULE J. J., ROSENBERG S. A., Murine lymphokine-activated killer (LAK) cells: Phenotypic characterization of the precursor and effector cells, *J. Immunol.*, **137**: 715–722, 1986.

Otrzymano : 7 lipca 1988.

Przyjęto: 1 września 1988.

Adres autorki: ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa.

PEROKSYSOMY KOMÓREK ZWIERZĘCYCH

PEROXISOMES OF ANIMAL CELLS

Jan A. LITWIN

Zakład Histologii, Akademia Medyczna im. M. Kopernika w Krakowie

Streszczenie. Pomimo 30 lat intensywnych badań, peroksysomy, powszechnie występujące w komórkach roślinnych i zwierzęcych, są wciąż jedną z najbardziej zagadkowych organeli. Artykuł przedstawia obecny (połowa 1988 r.) stan wiedzy na temat peroksysomów komórek zwierzęcych. Autor omawia morfologię peroksysomów, ich wyposażenie enzymatyczne oraz udział w procesach metabolicznych komórki. Dyskutowane są również zjawiska indukowanej eksperymentalnie proliferacji peroksysomów, ich zmiany towarzyszące różnym procesom patologicznym, a także aktualne poglądy na ich biogenezę.

Summary. In spite of 30 years of extensive research, peroxisomes — ubiquitous constituents of plant and animal cells — still remain perhaps the most mysterious cell organelle. This review presents the current (mid 1988) state of knowledge in this field. The author describes morphology of peroxisomes, their enzymatic content and involvement in the cell metabolism. Experimentally induced peroxisome proliferation, peroxisomal alterations accompanying various pathological processes and current concepts concerned with the biogenesis and turnover of peroxisomes are also discussed.

W 1954 r., kiedy mikroskopia elektronowa wkraczała dopiero do badań przyrodniczych, Rhodin opublikował swą pracę doktorską poświęconą ultrastrukturze kanalika proksymalnego nerki. Opisał w niej pęcherzykowe twory, które nazwał mikrociałkami (microbodies) i wysunął przypuszczenie, iż może to być nie znany do tej pory rodzaj organeli komórkowej [143]. Dwa lata później Rouiller i Bernhard zaobserwowali mikrociałka w komórkach wątrobowych [148]. Pierwsze informacje dotyczące funkcjonalnego znaczenia nowo poznanej organeli przyniosło w latach sześćdziesiątych zastosowanie techniki frakcjonowania komórki przez De Duve'a i współpracowników, którzy wykazali, że mikrociałka zawierają oksydazy utleniające wiele substratów i wytwarzające jako produkt uboczny nadtlenek wodoru, oraz katalazę, która ten nadtlenek na miejscu rozkłada [25]. Z uwagi na te własności enzymatycznego wyposażenia mikrociałek, De Duve zaproponował dla nich

nową nazwę – peroksysomy, która weszła odtąd na stałe do słownika biologii komórki. Pojęcie mikrociałko odnosi się obecnie wyłącznie do niektórych struktur spokrewnionych z peroksysomami, ale zawierających odmienne od nich zestawy enzymów.

Pod koniec lat sześćdziesiątych opracowano metodę cytochemicznej identyfikacji peroksysomów poprzez uwidocznienie peroksydacyjnej aktywności katalazy w reakcji z dwuaminobenzydyną [28]. Od tej chwili badania nad morfologią i biochemią peroksysomów stały się jednym z istotnych działów biologii komórki.

Paradoksem jest, że około 30 lat badań nad peroksysomami, przy zastosowaniu wszystkich dostępnych technik cytofizjologii i biologii molekularnej, przyniosło więcej znaków zapytania niż odpowiedzi. Nie będzie przesadą stwierdzenie, że peroksysomy są dziś najbardziej tajemniczą organelą komórkową. Ich kształt przestrzenny, biogeneza oraz rola w procesach życiowych komórki poznane są tylko fragmentarycznie.

Przegląd stanu wiedzy na temat peroksysomów należy zatem otworzyć podstawowym pewnikiem: peroksysomy występują we wszystkich komórkach eukariotycznych – nie tylko u organizmów wyższych, ale także u pierwotniaków, grzybów i roślin zielonych. To rozpowszechnienie peroksysomów w świecie ożywionym wyraźnie wskazuje na ich istotne znaczenie w wewnętrznej organizacji komórki i prowadzonych przez nią procesach metabolicznych.

Najwięcej informacji pochodzi z badań nad peroksysomami komórek wyższych kręgowców, głównie ssaków. Dlatego przedstawiona poniżej charakterystyka peroksysomów dotyczyć będzie tych właśnie organizmów. Odmienne funkcjonalnie peroksysomy i pokrewne mikrociałka pierwotniaków, grzybów i roślin (glikosomy, hydrogenosomy, glioksysomy) wymagają, ze względu na odrębność problematyki, osobnego opracowania. Czytelników pragnących rozszerzyć podane tu, z konieczności skrótowo, informacje, odsyłam do wyczerpujących artykułów przeglądowych i monografii opublikowanych za granicą [14, 15, 38, 87, 123, 138, 151, 194].

1. MORFOLOGICZNA CHARAKTERYSTYKA PEROKSYSOMÓW

1.1. DANE MORFOMETRYCZNE

Na ultracienkich skrawkach oglądanych w mikroskopie elektronowym peroksysomy widoczne są z reguły jako okrągłe, owalne lub poligonalne twory o średnicy od 0,1 do 1,0 μm . Bardzo liczne i duże peroksysomy (powyżej 0,5 μm) spotyka się przede wszystkim w hepatocytach i komórkach kanalików proksymalnych nerki. Komórki te stanowią wdzięczny i szeroko wykorzystywany materiał badawczy. Stosunkowo bogate w peroksysomy są także

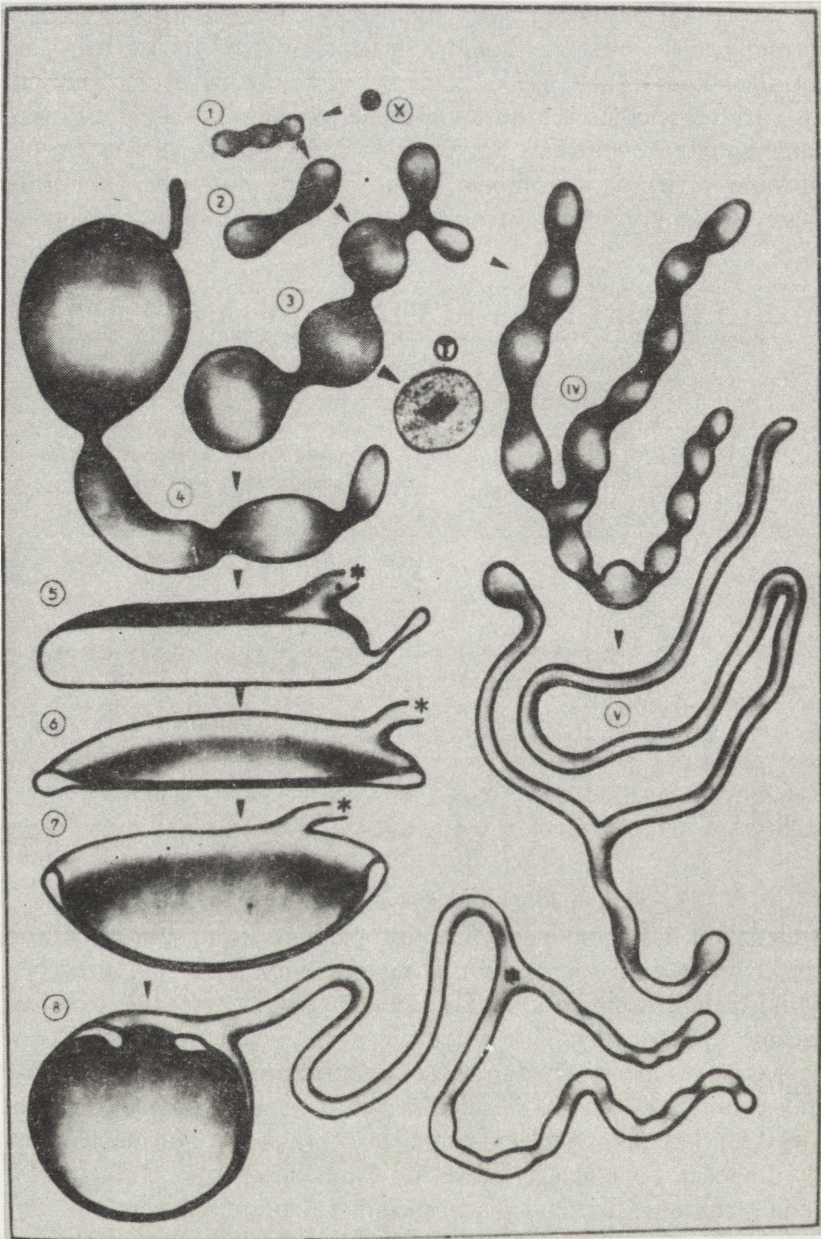
komórki nabłonka jelitowego, kory nadnerczy i innych struktur produkujących hormony sterydowe, oraz komórki gruczołów łojowych i cytotrofoblastu. W pozostałych komórkach peroksysony są bardzo małe i jest ich niewiele. Tak znaczny rozrzut wielkości i liczebności peroksysonów uniemożliwia sformułowanie ogólnych wniosków dotyczących liczby peroksysonów czy objętości zajmowanej przez nie w komórce, aczkolwiek dysponujemy takimi danymi w odniesieniu do komórek wątrobowych różnych gatunków zwierząt [145] (tab. 1).

TABELA 1
Charakterystyka morfometryczna peroksysonów obecnych w hepatocytach różnych gatunków ssaków (wg [145])

Gatunek		Liczba peroksysonów w komórce	Średnia objętość peroksysonu [μm^3]	% objętości komórki
Szczer	♂	718	0,15	1,56
	♀	715	0,13	1,23
Chomik	♂	462	0,35	2,77
	♀	354	0,44	2,96
Pies	♂	791	0,15	2,60
	♀	423	0,18	1,76
Rezus	♂	500	0,25	2,48
	♀	500	0,16	1,59
Człowiek		850	0,12	1,20

1.2. KSZTAŁT PEROKSYSONÓW

Do niedawna uważano powszechnie, opierając się na obrazach z mikroskopu elektronowego, iż peroksysony, podobnie jak lizosomy, są pęcherzykami. Wyniki badań ostatnich kilku lat wskazują jednak wyraźnie, że obraz taki był znacznie uproszczony. Rekonstrukcje przestrzenne seryjnych skrawków, a także zastosowanie do badań wysokonapięciowego mikroskopu elektronowego wykazały, że typowe sferoidalne peroksysony hepatocytów mogą się łączyć wąskimi kanalikowymi mostkami w „koralikowe” formacje o znacznej niekiedy długości, dochodzącej nawet do 5 μm (ryc. 1) [41, 110, 186]. Często spotykaną strukturą, urozmaicającą kształt wątrobowych peroksysonów, są „ogonki” — krótkie, palczaste wypustki błony peroksysonów występujące pojedynczo i ślepo zakończone (ryc. 1) [41, 171]. W komórkach wątrobowych liczba peroksysonów o urozmaiconych kształtach jest wyraźnie większa w trakcie ich namnażania się, np. podczas rozwoju embrionalnego, po hepatektomii, a także przy proliferacji peroksysonów indukowanej chemicznie [140, 171, 186].



Ryc. 1. Postulowany schemat morfologicznych przekształceń peroksyosomów w komórkach zwierzęcych: od hipotetycznego prekursora (x) – małego pęcherzyka o średnicy ok. 100 nm do skomplikowanych form błonowych spotykanych w niektórych komórkach (np. w gruczołach łojowych). Wyodrębniono dwie główne linie: przekształcenia prowadzące do powstania struktur koralikowych (3), typowych pęcherzyków (T) i form dyskowatych (5–8) oraz przekształcenia prowadzące do powstania form tubularnych (numeracja rzymska) (wg [42], zmodyfikowane)

Interesujące wyniki przyniosła seria prac Gorgas i wsp., którzy badali peroksysony komórek gruczołów łojowych u różnych gatunków zwierząt. Okazało się bowiem, iż w komórkach tych peroksysony cechuje wyjątkowa wręcz polimorficzność. W gruczole okołoodbytniczym psa peroksysony mają postać spłaszczonych, wklęsłych cystern, naśladujących diktiosomy aparatu Golgiego [44]. Peroksysony gruczołu napletkowego myszy tworzą labiryntowe, tubularne formacje zmieniające swój kształt wraz z cyklem wydzielniczym komórki i przyjmujące w sposób typowy formę zakłęśniętego dysku, a następnie kubka (ryc. 1) [40]. W komórkach gruczołu Meiboma u myszy występują prawie wyłącznie peroksysony tubularne (ryc. 1), które w trakcie dojrzewania komórki tworzą bardzo zagęszczone heksagonalne układy [43]. Również tubularne peroksysony znacznej długości i silnie rozgałęzione występują w białym gruczole pachwinowym królika [42] i w gruczole kuprowym kaczki [189]; w obu przypadkach mogą one również tworzyć układy koralikowe. W tzw. lipidowym segmencie kanalikula proksymalnego nerki psa peroksysony mają kształt układających się w stopy spłaszczonych dysków [190].

Obserwacje te skłoniły Gorgas do zaproponowania schematycznej sekwencji morfologicznych przekształceń peroksysonów w komórkach zwierzęcych, obejmującej wszystkie poznane dotychczas ich formy przestrzenne (ryc. 1) [42].

Lazarow i wsp. [90] stworzyli koncepcję tzw. siateczki peroksysonowej, która zakłada, iż peroksysony tworzą w komórce skomplikowany, labiryntowy układ błon, analogiczny do siateczki śródplazmatycznej. Hipoteza ta wyjaśnia wiele problemów dotyczących biogenezy tych organeli, jednakże znajduje tylko częściowe potwierdzenie w badaniach morfologicznych. Analiza morfometryczna peroksysonów w normalnej wątrobie szczura dowiodła, iż w narządzie tym peroksysony są oddzielnymi, sferoidalnymi tworami [182]. Przestrzenna rekonstrukcja peroksysonów w regenerującej wątrobie szczura wykazała natomiast, że koralikowa czy labiryntowa forma charakteryzuje jedynie niewielką część peroksysonów, natomiast większość ma nadal postać pojedynczych pęcherzyków [186]. Występowanie zarówno typowych, oddzielnych peroksysonów, jak i elementów „siateczki peroksysonowej”, hipoteza Lazarowa tłumaczy dużą plastycznością i dynamiką systemu peroksysonowego, którego błony miałyby się nieustannie rozdzielać i łączyć, tworząc w efekcie zarówno pojedyncze pęcherzykowe struktury, jak i bardziej złożone formacje. Nie zmienia to jednak faktu, iż wyjaśnienie takie ma charakter spekulatywny, a uzyskane dotychczas dane nie pozwalają na razie na wyciągnięcie ogólnych wniosków na temat rzeczywistego kształtu peroksysonów.

1.3. WEWNĘTRZNE STRUKTURY PEROKSYSONÓW

Peroksysony hepatocytów wielu kręgowców zawierają charakterystyczny cylindryczny rdzeń o parakrystalicznej strukturze, składający się z równoległe ułożonych białkowych rurek o średnicy ok. 10 nm [170]. Rdzeń, nazywany

także nukleoidem, wykazuje znaczną zmienność międzygatunkową: może mieć formę wstęgowatą lub rozgałęzioną, a także nie zawsze cechuje go wysoki stopień strukturalnego uporządkowania [61]. U naczelnych Nowego Świata i u człowieka peroksysomy wątrobowe nie zawierają rdzenia.

Parakrystaliczny rdzeń peroksysomów wątroby szczura zbudowany jest głównie z oksydazy moczanowej [56]. W badaniach porównawczych, obejmujących różne gatunki zwierząt, zaobserwowano dość ścisłą korelację między występowaniem oksydazy moczanowej i obecnością rdzenia w peroksysomach, aczkolwiek u niektórych gatunków pozbawionych tego enzymu peroksysomy również zawierały nukleoid o nietypowej jednak, niekrystalicznej formie [61].

Szczególną morfologią wewnętrzną charakteryzują się peroksysomy w komórkach kanalików proksymalnych nerki szczura: w ich centralnej części znajduje się homogenny, bezpostaciowy obszar (tzw. centralna jasna macierz), natomiast strefa obwodowa ma większą gęstość elektronową i zawiera równoległe ułożone rurki białkowe o średnicy 120 nm [9]. Ich obecność pozwala na identyfikację peroksysomów nerkowych szczura w replikach sporządzanych metodą mrożenia i łamania [66].

1.4. PŁYTKA BRZEŻNA

U wielu gatunków, szczególnie u zwierząt owadożernych i u naczelnych, peroksysomy wątroby i nerki często zawierają elektronowo gęstą płytkę grubości 8–15 nm i długości dochodzącej do 0,5 μm , zlokalizowaną tuż pod błoną peroksysomu i powodującą w tym rejonie spłaszczenie jego obrysu [61]. U człowieka płytki brzeżne spotyka się raczej rzadko, aczkolwiek opisywano ich obecność zarówno w peroksysomach hepatocytów [162], jak i komórek kanalika proksymalnego nerki [146]. Nie powiodły się, jak dotąd, próby izolacji płytek brzeżnych, stąd ich skład chemiczny i znaczenie funkcjonalne są niejasne.

1.5. MACIERZ PEROKSYSOMU

W konwencjonalnie przygotowanym materiale biologicznym, peroksysomy obserwowane w mikroskopie elektronowym zawierają macierz o delikatnie ziarnistej lub kłaczkowatej strukturze. Frakcjonowanie peroksysomów z wątroby szczura, których błona została uszkodzona w wyniku działania zmiennych temperatur (zamrażanie i rozmrażanie), ultradźwięków lub detergentów uwidocznilo wewnątrz organeli delikatny włókienkowy zrąb przyczepiony z jednej strony do błony peroksysomu, z drugiej zaś powiązany z parakrystalicznym rdzeniem [2]. Niektóre enzymy peroksysomowe (oksydaza acylo-CoA, białko dwufunkcyjne), koenzym A, a także niezidentyfikowane dotąd białka niebłonowe (29 kD) wydają się dość mocno związane z tym właśnie zrębem, i dopiero wysokie stężenia detergentów powodują ich oddzielenie się i przejście do nadsączu [2, 177].

1.6. MIKROPEROKSYSONY

W 1972 r. Novikoff i wsp. wyodrębnili spośród peroksysonów występujących w komórkach zwierzęcych szczególną klasę, którą nazwali mikroperoksysonami. Według tych autorów, mikroperoksysony charakteryzowały się następującymi cechami: niewielką średnicą, od 0,1 do 0,3 μm , brakiem rdzenia oraz często obserwowanymi bezpośrednimi połączeniami z kanałami siateczki śródplazmatycznej [119]. W odróżnieniu od dużych peroksysonów z rdzeniem, występujących w komórkach wątroby i nerki, mikroperoksysony zaobserwowano praktycznie we wszystkich komórkach zwierzęcych [120]. Podział ten, spotykany jeszcze niekiedy w literaturze, traktowany jest obecnie z dużą rezerwą i nie wydaje się uzasadniony, gdyż opisywane przez Novikoffa połączenia mikroperoksysonów z siateczką śródplazmatyczną okazały się połączeniami między poszczególnymi segmentami „koralikowych” układów peroksysonów [141, 144, 186]. Formacje takie często zawierają zarówno duże peroksysony z rdzeniem, jak i mikroperoksysony zgodne z opisem Novikoffa [41, 186]. Można zatem przyjąć, że mikroperoksysony są po prostu arbitralnie wyodrębnioną częścią heterogeniczną pod względem wielkości i kształtu populacji peroksysonów komórek zwierzęcych.

1.7. BLISKIE RELACJE PRZESTRZENNE Z INNYMI STRUKTURAMI KOMÓRKOWYMI

Badania ostatnich lat wykazały jednoznacznie, iż peroksysony nie łączą się bezpośrednio z żadnymi innymi organelami komórkowymi. Obserwuje się natomiast regularnie bliskie związki przestrzenne z siateczką śródplazmatyczną i kroplami lipidowymi.

Najbardziej charakterystyczne i najczęściej spotykane jest częściowe otoczenie peroksysonu przez pojedynczą cysternę gładkiej siateczki śródplazmatycznej [29, 40, 41]. Błony peroksysonu i siateczki zbliżają się na odległość zaledwie 10–15 nm; można również zaobserwować spinające je elektronowo gęste mostki [69]. Cysterny siateczki połączone mostkami z błonami peroksysonów utrzymują się nawet po izolacji peroksysonów i ich starannym oczyszczeniu metodami biochemicznymi [192]. W trakcie namnażania się peroksysonów sąsiadujące bezpośrednio elementy siateczki mogą wykazywać liczne fenestracje, a także tworzyć kilkuwarstwowe pokłady [10]. W komórkach niektórych gruczołów łojowych peroksysony tworzą regularne szeregi przeplatające się z równoległe ułożonymi cysternami siateczki [189]. Obserwacje te wyraźnie wskazują na powiązanie funkcjonalne obu organeli. Przypuszcza się, iż między peroksysonami a siateczką dochodzi do stałej wymiany produktów pośrednich biosyntezy złożonych lipidów [10, 192].

Udział peroksysonów w metabolizmie tłuszczów może także tłumaczyć częste występowanie peroksysonów w bezpośredniej bliskości kropli lipidowych, co zaobserwowano w komórkach wątrobowych [97], nerkowych [190] i niektórych gruczołów łojowych [42].

Wzajemne powiązania przestrzenne peroksysomów z mitochondriami opisane zostały w komórkach gruczołu napletkowego myszy w trakcie cyklu wydzielniczego. Peroksysomy i mitochondria wykazują tu równoległe zachodzące przekształcenia w rozgałęzione, labiryntowe formacje, przy czym błony mitochondriów i peroksysomów w wielu miejscach zbliżają się do siebie na bardzo niewielką odległość [40]. Znaczenie tego bliskiego związku przestrzennego obu organelli nie jest jasne, zwłaszcza że brak dotychczas podobnych obserwacji.

2. BŁONA PEROKSYSOMU

Peroksysomy otoczone są pojedynczą błoną o wyraźnie zaznaczonej trójwarstwowej strukturze i grubości ok. 7 nm. Jest ona nieco cieńsza niż błona lizosomów, pęcherzyków wewnątrzkomórkowych i błona komórkowa. Od innych błon komórki różni ją także większa odporność na uszkodzenie detergentami [18].

W skład błony peroksysomu wchodzi fosfolipidy i białka. Stosunek obu składników wynosi ok. 200 nM/mg i jest niższy niż w błonie siateczki śródplazmatycznej. Głównymi elementami fosfolipidowymi są fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina oraz niewielka ilość estrów cholesterolu [31]. W błonie peroksysomu nie występuje kardiolipina, charakterystyczna dla wewnętrznej błony mitochondrialnej.

Wśród białek błony peroksysomu zidentyfikowano niskocząsteczkowe białko (15 kD), występujące także w innych błonach komórki, oraz 4 główne polipeptydy specyficzne wyłącznie dla tej błony: 22, 26, 27, i 70 kD. Rozdział białek błony peroksysomu metodą SDS-PAGE ujawnia także wyraźne prążki odpowiadające białkom o m. cz. 41 i 68 kD, jednakże są one najprawdopodobniej wynikiem proteolizy białka 70 kD [31, 52, 54, 79]. Białka błonowe stanowią ok. 12% całkowitej ilości białek w peroksysomach. Niektóre z nich występują w formie ufosforylowanej [152], jednak znaczenie fizjologiczne tego zjawiska jest niejasne.

Błona peroksysomu jest swobodnie przepuszczalna dla jonów, sacharozy, niskocząsteczkowych substratów (moczany, mlecza, aminokwasy, karnityna, ATP) i koenzymów (NAD^+ , CoA), nie przepuszcza natomiast inuliny (m. cz. 5 kD) [25, 175].

Badania przepuszczalności błony peroksysomu sugerują, iż zawiera ona białko kanałowe, pozwalające na swobodne przechodzenie przez błonę substancji o m. cz. do ok. 1 kD. Białko to wymaga dla swej aktywności obecności niektórych lipidów błonowych, a jego charakterystyka wskazuje, że odpowiada ono polipeptydowi 22 kD [176]. Tworzone przez nie kanały są selektywne dla kationów i modulowane przez różnice potencjałów po obu stronach błony: otwierają się przy braku różnicy potencjałów, zamykają natomiast przy

jej pojawieniu się, niezależnie od biegunowości. Przybliżona średnica kanału wynosi ok. 3 nm w formie otwartej i ok. 1,5 nm w formie zamkniętej. Wyniki badań nad przepuszczalnością błony peroksysomu przemawiają również za istnieniem drugiego typu kanałów, selektywnych dla anionów, charakteryzujących się średnicą ok. 0,3 nm i dwoma stanami funkcjonalnymi [83].

TABELA 2
Enzymy zlokalizowane w peroksysomach komórek zwierzęcych

Enzym	E.C.	Lokalizacja	Literatura
Katalaza	1.1.1.6	macierz	[25]
Oksydaza moczanowa	1.7.3.3	rdzeń	[25]
Oksydaza D-aminokwasów	1.4.3.3	macierz	[25]
Oksydaza L-aminokwasów	1.4.3.2	macierz	[25]
Oksydaza α -hydroksykwasów	1.1.3.15	macierz, rdzeń	[25]
Oksydaza ksytynowa	1.2.3.2	rdzeń	[153]
Oksydaza poliamin		macierz	[60]
Oksydaza acylo-CoA	1.3.99.3	macierz	[86]
Oksydaza glutarylo-CoA		macierz	[173]
Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu	1.1.1.49	macierz	[128]
Dehydrogenaza glicerofosforanu	1.1.1.8	macierz	[35]
Dehydrogenaza izocytrynianowa	1.1.1.42	macierz	[25]
Dehydrogenaza aldehydowa	1.2.1.3	błona	[5]
Dehydrogenaza 3-hydroksyacylo-CoA*	1.1.1.35	zrąb macierzy	[86]
Acylotransferaza (AcT)karnitynowa	2.3.1.23	macierz	[101]
AcT fosforanu dwuhydroksyacetonu (DHA)	2.3.1.42	błona	[49]
AcT choloilo-CoA:glycyna/tauryna		macierz	[71]
Aminotransferaza (AT) seryna:pirogonian	2.6.1.51	macierz	[122]
AT alanina:glioksylan	2.6.1.44	macierz	[111]
AT asparagina:pirogonian	2.6.1.14	macierz	[115]
Reduktaza acylo-CoA		macierz	[12]
Reduktaza 2,4-dwuenoilo-CoA	1.3.1.34	macierz	[27]
Reduktaza 3-OH-3-metyloglutarylo-CoA	1.1.1.34	macierz	[73]
Reduktaza acylo/alkilo fosforanu DHA	1.1.1.101	błona	[48]
Syntaza acylo-CoA	6.2.1.3	błona	[80]
Syntaza alkilo-fosforanu DHA		błona	[48]
Syntaza jablczanowa	4.1.3.2	macierz	[23]
Hydrataza enoilo-CoA*	4.2.1.17	zrąb macierzy	[86]
Tiolaza 3-ketoacylo-CoA	2.3.1.16	macierz	[86]
Izomeraza Δ^3, Δ^2 -enoilo-CoA	5.3.3.8	macierz	[68]
Epimeraza D-3-hydroksyacylo-CoA	5.1.2.3	macierz	[187]
Allantoinaza	3.5.2.5	macierz	[153]
Allantoikaza	3.5.3.4	macierz	[118]
Hydrolaza epoksydowa	3.3.2.3	macierz	[180]
Lucyferaza	1.13.12.7	macierz	[74]

* enzym dwufunkcyjny

3. ENZYMY PEROKSYSOMOWE

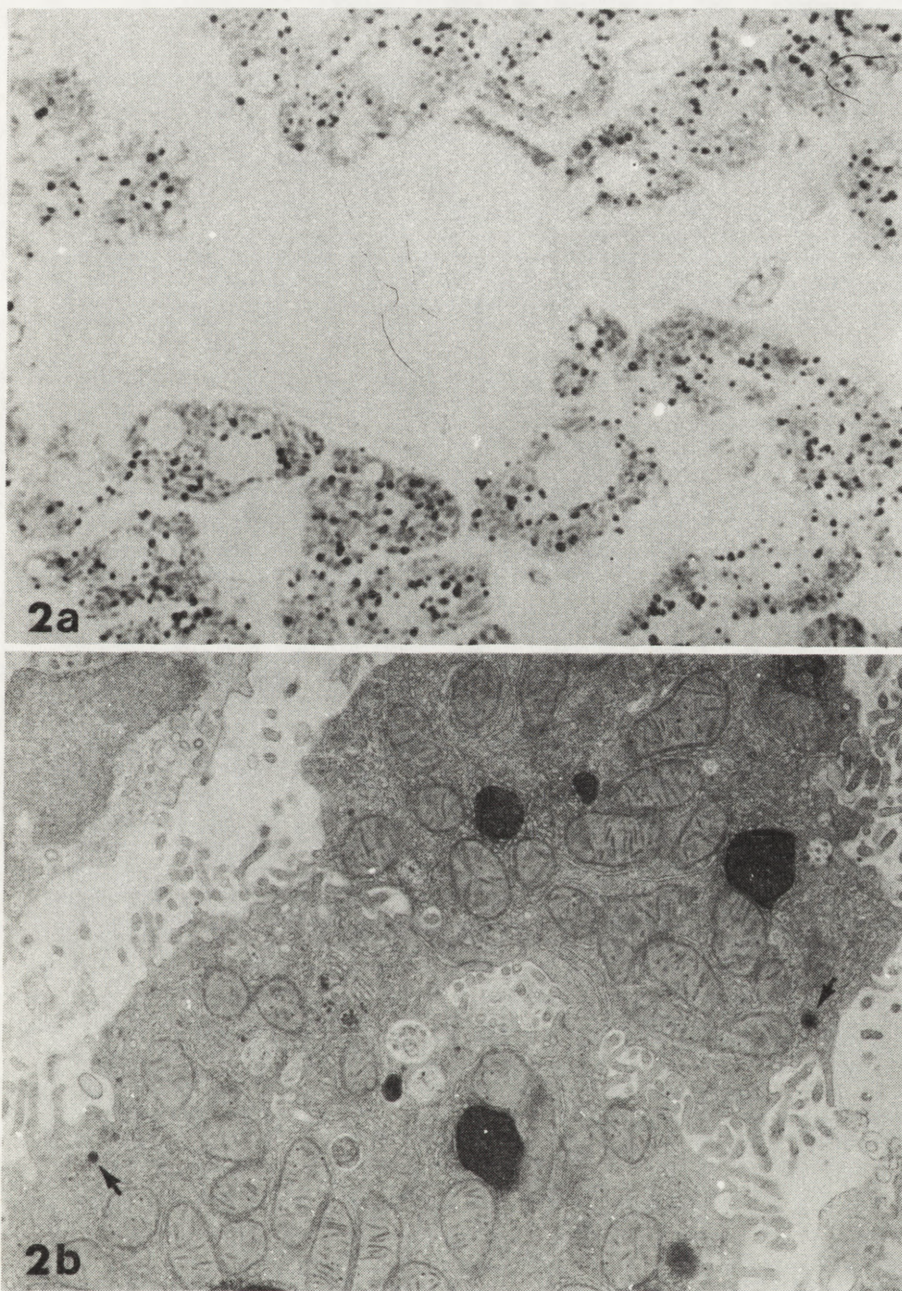
Peroksosomy zawierają kilkadziesiąt enzymów, z których część występuje wyłącznie w tej organeli, natomiast pozostałe spotyka się również w innych przedziałach komórki: w mitochondriach, siateczce śródplazmatycznej i w cytozolu. Enzymy peroksosomowe mające swe odpowiedniki w innych przedziałach komórki, bywają jednak często odmienne od nich pod wieloma względami i kodowane są przez odrębne geny.

Dotychczasowe badania wykazały, iż pod względem wyposażenia enzymatycznego peroksosomy stanowią bardzo niejednorodną populację: występowanie wielu enzymów uzależnione jest od różnic gatunkowych, narządowych, a nawet może wykazywać zmienność w obrębie peroksosomów jednej komórki. Tabela 2 przedstawia enzymy zidentyfikowane dotychczas w peroksosomach komórek zwierzęcych, z zaznaczeniem ich lokalizacji w obrębie peroksosomu.

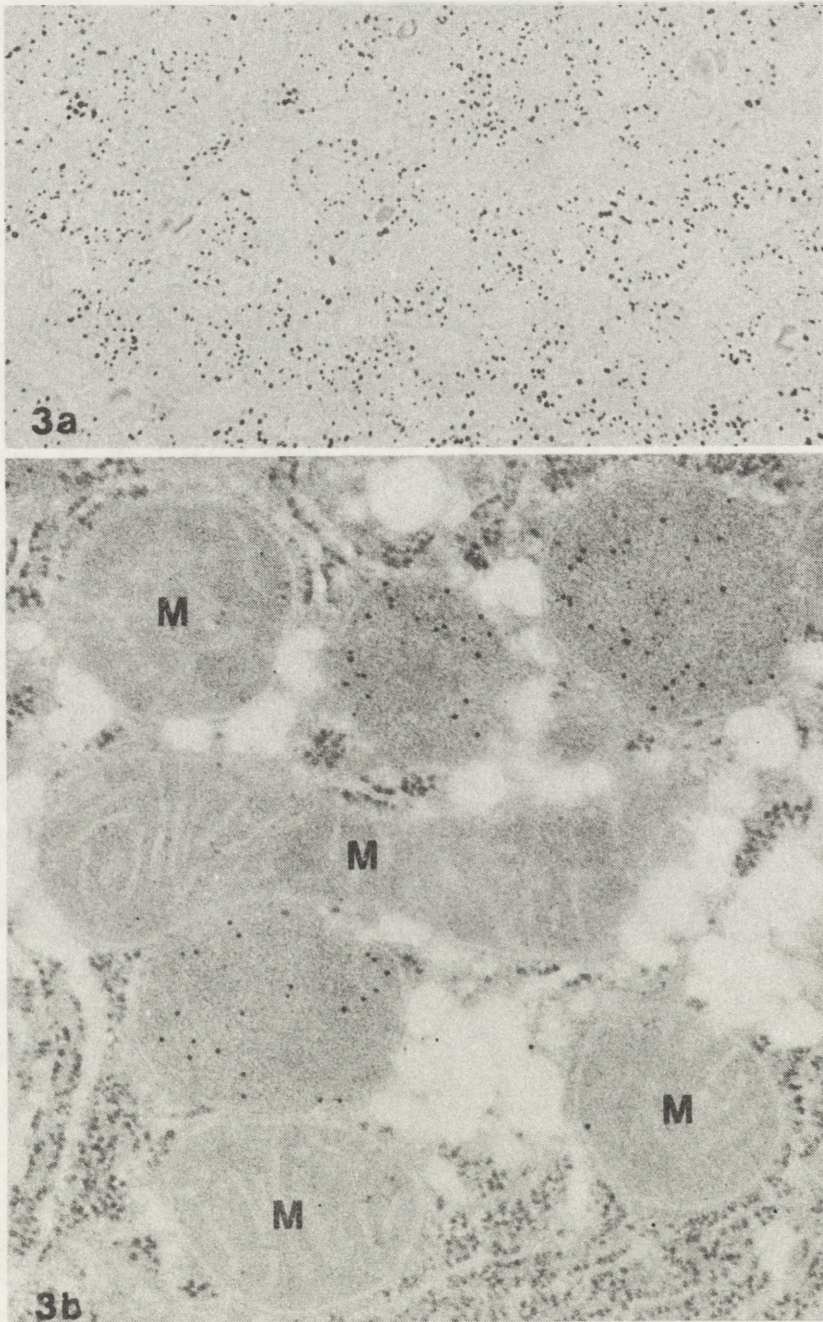
Enzymy peroksosomowe badane są zarówno metodami biochemicznymi, stosowanymi po izolacji czystej subkomórkowej frakcji tych organeli [52, 94, 179], jak i przy użyciu technik mikroskopowych, pozwalających na uwidocznienie lokalizacji konkretnych enzymów *in situ*. Opracowane dotychczas metody cytoenzymatyczne umożliwiają śledzenie aktywności katalazy [28, 119, 146] (ryc. 2) i oksydaz peroksosomowych [3, 4, 51], natomiast wprowadzone w ostatnich latach techniki immunocytochemiczne pozwoliły na mikroskopową lokalizację również tych enzymów peroksosomowych, które nie mogły być uwidocznione metodami klasycznej histochemii enzymów [73, 95, 96] (ryc. 3).

Enzymatycznym znacznikiem peroksosomów, stosowanym zarówno w doświadczeniach biochemicznych, jak i cytochemicznych, jest katalaza. Fakt, iż występuje ona także w cytozolu (tzw. katalaza pozaperoksosomowa), nie rzutuje na użyteczność tego enzymu jako znacznika: podczas frakcjonowania enzymy cytozolowe są skutecznie eliminowane, natomiast w eksperymentach cytochemicznych aktywność katalazy pozaperoksosomowej jest — poza nielicznymi wyjątkami — zbyt niska, aby uwidoczniła się w obrazie mikroskopowym.

Wyniki badań biochemicznych, cytochemicznych i immunocytochemicznych dowodzą, że większość enzymów peroksosomowych znajduje się w płynnej macierzy peroksosomu, w formie nie związanej z żadnymi elementami strukturalnymi: uszkodzenie błony peroksosomu powoduje ich natychmiastowe przejście do otoczenia [2, 85, 94, 132]. Jedynie kilka enzymów wydaje się wiązać ściślej z upostaciowanymi składnikami peroksosomu. Syntaza acylo-CoA zatopiona jest w błonie, przy czym jej centrum aktywne znajduje się na powierzchni zewnętrznej [100]; lokalizację błonową wykazuje również dehydrogenaza aldehydowa [6] oraz dwa enzymy odpowiedzialne za biosyntezę eterolipidów: acylotransferaza i syntaza fosforanu dwuhydroksyacetonu [48].



Ryc. 2. Peroksysomy w komórkach wątrobowych szczura uwidocznione cytochemiczną reakcją (z 3,3'-dwuaminobenzydyną) wykrywającą peroksydacyjną aktywność katalazy w mikroskopie optycznym (2a) i elektronowym (2b), gdzie dostrzec można zarówno typowe, duże peroksysomy, jak i „mikroperoksysomy” o znacznie mniejszych rozmiarach (strzałki)



Ryc. 3. Peroksysomy w komórkach wątrobowych szczura uwidocznione przy użyciu metod immunocytochemicznych z przeciwciałami przeciw enzymom β -oksydacji kwasów tłuszczowych. 3a: pośrednia reakcja immunoperoksydazowa wykrywająca oksydazę acylo-CoA. 3b: reakcja z białkiem A i złotem koloidalnym, wykrywająca enzym dwufunkcyjny (hydratazę enoilo-CoA/dehydrogenazę 3-hydroksyacylo-CoA). M – mitochondria

Białko dwufunkcyjne (hydrataza enoilo-CoA/dehydrogenaza 3-hydroksyacylo-CoA) związane jest ze słabo dotychczas scharakteryzowanym zrębem włóknistym macierzy [2]. Oksydaza moczanowa występuje zawsze w obrębie parakrystalicznego rdzenia i nie spotyka się jej wcale w peroksysomach nie wykazujących tej struktury [19]. Wyjątek stanowią peroksysomy proliferujące: w regenerujących komórkach wątrobowych opisano przejściową lokalizację oksydazy moczanowej w macierzy zarówno peroksysomów z rdzeniem, jak i bez rdzenia. Lokalizacja ta przypuszczalnie odzwierciedla proces inkorporacji nowo zsyntetyzowanego enzymu do namnażających się peroksysomów [185]. W obrębie rdzenia wykazano także aktywność oksydazy ksantynowej [3]. W obu przypadkach produkt reakcji enzymatycznej gromadzi się we wnętrzu rurek tworzących rdzeń. Oksydaza α -hydroksykwasów wykazywała zmienną lokalizację w zależności od użytego w eksperymencie substratu: produkt reakcji cytochemicznej znajdowano w macierzy, w rdzeniu, albo równocześnie w obu tych przedziałach [4]. Peroksysomy komórek kanalika proksymalnego nerki szczura zawierają oksydazę D-aminokwasów wyłącznie w swojej centralnej, elektronowo jasnej części [172]. W pracach, w których uwidoczniono złożone, „koralikowe” formy peroksysomów, zaobserwowano niejednorodne rozmieszczenie katalazy: koncentrowała się ona w sferoidalnych segmentach układu, nie było jej natomiast, albo występowała w śladowych ilościach w kanalikowych połączeniach między tymi segmentami [41, 186].

Enzymy peroksysomowe nie wykazują latencji, co świadczy o swobodnej penetracji substratów do wnętrza peroksysomów [25].

4. METABOLICZNE FUNKCJE PEROKSYSONÓW

4.1. UTLENIANIE BIOLOGICZNE

Zespół flawoproteidowych oksydaz, występujący w peroksysomach, zużytkowuje tlen molekularny do bezpośredniego utleniania wielu substratów, przy czym w reakcji wytwarzany jest nadtlenek wodoru. Około 20% tlenu zużywanego w procesach metabolicznych przez komórkę wątrobową przypada na procesy utleniania, odbywające się w peroksysomach. Substratami dla oksydaz peroksysomowych są aminokwasy, kwasy tłuszczowe, mleczały, glikolany i inne α -hydroksywasy, moczały, ksantyny i poliaminy. Enzymy te, z wyjątkiem oksydazy α -hydroksykwasów, mają duże powinowactwo do tlenu [25].

Wysunięto hipotezę, iż fizjologicznymi substratami dla peroksysomowych oksydaz są związki z grupy adduktów glioksylianów i tioli lub aminotioli, np. oksalilotioloestry ($RSCOCOO^-$). Produkty ich utlenienia w peroksysomach mają odgrywać rolę wewnątrzkomórkowych przekazyńców dla niektórych hormonów (insulina) [50].

Nadtlenek wodoru, powstający w reakcjach katalizowanych przez oksydazy peroksysomowe, jest natychmiast rozkładany przez katalazę wykazującą podwójny mechanizm działania: w reakcji katalatycznej proces oksydoredukcyjny dotyczy dwóch cząsteczek nadtlenu wodoru, natomiast w reakcji peroksydacyjnej utlenieniu ulega inny substrat (ryc. 4). Substratami dla peroksydacyjnej aktywności katalazy mogą być alkohole, mrówczany, azotyny i chinony [25]. W wątrobie peroksysomy uczestniczą tylko w niewielkim stopniu (ok. 10%) w katabolizmie alkoholu etylowego, gdyż za proces ten odpowiedzialne są głównie systemy enzymatyczne cytozolu i siateczki śródplazmatycznej [76], natomiast w innych narządach, np. w mięśniu sercowym, peroksydacyjna aktywność peroksysomowej katalazy stanowi prawdopodobnie podstawowy mechanizm eliminacji etanolu [30]. Peroksydacyjna aktywność katalazy wydaje się dominować nad aktywnością katalatyczną z uwagi na warunki panujące wewnątrz peroksysomu: znaczne stężenie enzymu i stosunkowo wolną, stałą produkcję nadtlenu wodoru. Mechanizm katalatyczny włącza się jedynie w przypadku nagłego wzrostu stężenia nadtlenu [25].

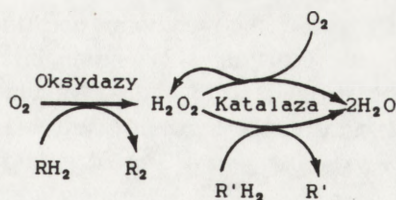
Nadtlenek wodoru, z uwagi na swoją wysoką aktywność chemiczną, wywiera silnie toksyczny wpływ na komórkę. Peroksysomowa katalaza oraz znajdująca się w cytozolu peroksydaza glutationu stanowią dwa podstawowe mechanizmy obrony komórki przed tym cytotoksycznym działaniem [160].

W odróżnieniu od procesów oksydoredukcyjnych, przebiegających w mitochondriach, energia wyzwolona podczas utleniania peroksysomowego nie jest wiązana w wysokoenergetycznych związkach typu ATP, lecz rozprasza się w postaci ciepła. W związku z tym dyskutowana jest rola peroksysomów w procesie termogenezy. Według obliczeń przedstawionych przez Hryba [63], przebiegające w peroksysomach reakcje utleniania i rozkładu nadtlenu wodoru generują 0,065 cal/min/g tkanki wątrobowej. Peroksysomy tkanki tłuszczowej brunatnej mają uczestniczyć w procesie termogenezy u szczurów wystawionych na działanie niskich temperatur [113]. Ten aspekt procesów utleniania w peroksysomach niewątpliwie wymaga dalszych badań.

4.2. β -OKSYDACJA KWAŚÓW TŁUSZCZOWYCH

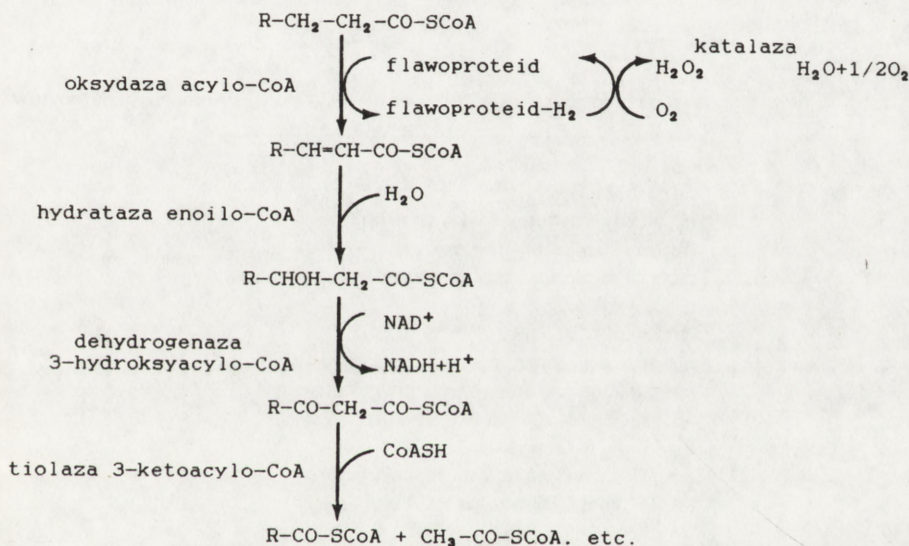
Odkrycie przez Lazarowa i De Duve'a enzymatycznego systemu β -oksydacji kwasów tłuszczowych w peroksysomach komórek zwierzęcych [84, 86] otworzyło nowy rozdział w badaniach nad tymi organelami i ich funkcjami. Udział peroksysomów w metabolizmie lipidów stał się pierwszoplanowym problemem badawczym, który przez ostatnie 10 lat przyniósł szczególnie wiele wartościowych wyników.

Proces β -oksydacji kwasów tłuszczowych, przebiegający w peroksysomach (ryc. 5), jest prawie identyczny z reakcjami zachodzącymi w mitochondriach. Odmienny jest jedynie pierwszy etap cyklu: w peroksysomach katalizuje go



Ryc. 4. Schemat procesów utleniania przebiegających w peroksysonach (wg [25])

oksydaza acylo-CoA, podczas gdy w mitochondriach enzymem inicjującym β -oksydację jest dehydrogenaza [24]. Pozostałe reakcje przebiegają w ten sam sposób, aczkolwiek odpowiednie enzymy peroksysonowe różnią się od mito-



Ryc. 5. Przebieg wewnątrzperoksysonowej β -oksydacji kwasów tłuszczowych (wg [24])

chondrialnych swymi własnościami (powinowactwem do substratów, kinetyką reakcji, cechami antygenowymi itd.) i stanowią de facto odmienne białka kodowane przez odrębne geny [34, 53, 106, 125].

Oksydaza acylo-CoA ma typowe własności oksydaz peroksysonowych, tzn. przenosi elektrony bezpośrednio na tlen molekularny z wytworzeniem

nadtlenku wodoru. Aktywność tego enzymu decyduje o szybkości całego procesu β -oksydacji. Dwie kolejne aktywności enzymatyczne – hydrazazy enoilo-CoA i dehydrogenazy 3-hydroksyacylo-CoA realizowane są przez pojedyncze białko, zwane z tego powodu białkiem dwufunkcyjnym [53]. Ostatnią reakcję cyklu katalizuje peroksysomowa tiolaza 3-ketoacylo-CoA.

Do optymalnego przebiegu β -oksydacji kwasów tłuszczowych nie jest konieczne ani zachowanie integralności błony peroksysomu, ani obecność karnityny, wymagany jest natomiast wysoki poziom ATP i NAD^+ [24]. System peroksysomowy, w odróżnieniu od mitochondrialnego, nie jest sprzężony z łańcuchem oddechowym, ani z fosforylacją, stąd cechuje go niewrażliwość na inhibitory blokujące β -oksydację w mitochondriach: cyjanki, rotenon i antymycynę A [86, 178]. Mogą go stymulować niektóre leki i związki chemiczne, a także dieta wysokotłuszczowa lub wysokocholesterolowa [55, 86, 112].

TABELA 3

Czynniki stymulujące β -oksydację kwasów tłuszczowych w peroksysomach hepatocytów

leki hypolipidemiczne
 estry ftalanowe
 herbicydy zawierające kwas propionowy
 fluorowane kwasy tłuszczowe
 dieta wysokotłuszczowa i wysokocholesterolowa
 głódówka
 cukrzyca
 niektóre leki przeciwwymiotne i przeciwzapalne
 związki będące antagonistami leukotrienu D
 adaptacja do niskich temperatur
 niedobór witaminy E
 umiarkowana nadczynność tarczycy
 ACTH, deksametazon + ACTH

Peroksysomowe enzymy β -oksydacji kwasów tłuszczowych nie metabolizują kwasów krótkołańcuchowych (poniżej 8 atomów węgla), natomiast charakteryzują się bardzo wysoką efektywnością w stosunku do kwasów o długich, a zwłaszcza bardzo długich łańcuchach (powyżej 22 atomów węgla) [53, 84]. Szybkość procesu dla kwasów tłuszczowych o różnych długościach łańcucha zależy także od innych czynników, takich jak stężenie substratu czy narząd [178]. Wymagania substratowe całego systemu zdeterminowane są przez własności oksydazy acylo-CoA, dla której dolną granicą długości łańcucha kwasu tłuszczowego, rozpoznawanego jako substrat, jest 8 atomów węgla [53].

Aktywacja kwasów tłuszczowych, za którą odpowiedzialna jest syntaza acylo-CoA, zachodzi na cytoplazmatycznej powierzchni błony peroksisomu, w związku z czym przez błonę przechodzi już forma aktywna kwasu, a nie, jak w mitochondriach, wolny kwas tłuszczowy [100]. Peroksisomowa syntaza acylo-CoA wymaga ATP do swej aktywności i również nie wykazuje powinowactwa do kwasów krótszych niż 8-węglowe [80]. Wydaje się, że kwasy tłuszczowe o bardzo długich łańcuchach aktywowane są przez swoistą dla nich syntazę, która nie występuje w mitochondriach [156]. Z danych tych wynika, że β -oksydacja zachodząca w peroksisomach skraca kwasy tłuszczowe tylko do granicznej dla systemu długości łańcucha (8 atomów węgla). Kwasy te przenoszone są następnie do mitochondriów za pośrednictwem mitochondrialnej acylotransferazy karnitynowej i tam ulegają dalszej β -oksydacji [101, 112].

Zważywszy, iż import kwasów tłuszczowych do wnętrza peroksisomów jest niezależny od karnityny, wciąż niejasna jest funkcja wykrytych w macierzy peroksisomów oktanoiltransferazy i palmitylotransferazy karnitynowej – pierwsza z nich jest enzymem specyficznym dla peroksisomów [105], a druga występuje zarówno w peroksisomach, jak i w mitochondriach [65]. Być może enzymy te pomagają przy eksporcie kwasów tłuszczowych z peroksisomów, aczkolwiek przeczy temu ich lokalizacja (w macierzy, a nie błonie).

Przeprowadzone dotychczas oceny ilościowego udziału peroksisomów i mitochondriów w β -oksydacji kwasów tłuszczowych dowodzą, że w peroksisomach komórki wątrobowej zachodzi od 10 do 30% tego procesu [78, 99]. Stosunkowo znaczną rozbieżność uzyskanych wyników można tłumaczyć zależnością badanych proporcji od metabolizowanych substratów: w przypadku kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcucha β -oksydacja w peroksisomach stanowi zaledwie niewielki margines, podczas gdy kwasy długołańcuchowe metabolizowane są głównie – jeżeli nie wyłącznie – w peroksisomach [157].

Substratami dla peroksisomowej β -oksydacji mogą być również nienasycone kwasy tłuszczowe, zarówno z jednym, jak i z licznymi wiązaniami podwójnymi. Proces ten wymaga jednakże enzymów pomocniczych, które także zostały zlokalizowane na terenie peroksisomów. D-3-hydroksyacylo-CoA powstały na skutek działania hydratazy może być utleniany jedynie po przekształceniu w izomer L, katalizowanym przez odpowiednią epimerazę [187]. Innym enzymem pomocniczym jest izomeraza Δ^3 , Δ^2 -enoilo-CoA [68]. Jednak najistotniejszą rolę przypisuje się reduktazie 2,4-dienoilo-CoA, katalizującej zależną od NADPH redukcję podwójnego wiązania w pozycji Δ^4 , które blokuje dalsze skracanie łańcucha. Enzym ten jest niezbędny do degradacji nienasyconych kwasów tłuszczowych z podwójnymi wiązaniami w pozycji *cis*, wytworzonymi przez parzyste atomy węgla [27].

W peroksisomach mogą również zachodzić niektóre etapy metabolizmu

prostanoidów i innych pochodnych kwasu arachidonowego: skracanie cząsteczki prostaglandyny $\text{PGF}_{2\alpha}$ o 4 atomy węgla do tetranor- $\text{PGF}_{2\alpha}$ [26], skracanie karboksylowego łańcucha bocznego PGE_2 [154], a także retrokonwersja kwasu adrenowego (22:4(n-6)) i doksoheksanowego (22:6(n-3)) do kwasu arachidonowego [47].

Peroxisomy przeprowadzają β -oksydację dwukarboksylowych kwasów tłuszczowych, powstających w procesie mikrosomowej ω -oksydacji [108], a także mają zdolność metabolizowania glutarylo-CoA [173] i ksenobiotycznych kwasów tłuszczowych, które nie są katabolizowane przez mitochondria [184].

Szczególną rolę wydaje się odgrywać wykryta niedawno w peroksisomach hydrolaza epoksydowa, przekształcająca tlenki arenowe i alkenowe w dwuhydrodiole, co umożliwi β -oksydację kwasów tłuszczowych zawierających pierścień oksyranowy [180].

Jak się obecnie wydaje, systemy β -oksydacji kwasów tłuszczowych, zawarte w mitochondriach i peroksisomach, mają charakter bardziej uzupełniający niż konkurencyjny: peroksisomy metabolizują głównie te substraty (długołańcuchowe kwasy tłuszczowe), które utleniane są słabo (lub wcale) przez system mitochondrialny [16].

4.3. BIOSYNTeza ETEROLIPIDÓW

Eterolipidy (O-alkiloglicerolipidy, gliceroeterolipidy) są specyficzną grupą tłuszczowców, charakteryzującą się obecnością eterowego połączenia między alkilowymi rodnikami długołańcuchowych alkoholi i glicerolem. Najczęściej spotykanym w komórkach rodzajem eterolipidów są tzw. plazmalogeny (alkeniloglicerolipidy) posiadające w cząsteczce resztę fosfatydyloetanolaminy (rzadziej fosfatydylocholiny) i wchodzące w skład fosfolipidowej warstwy błon biologicznych. Jedynym eterolipidem o znanej funkcji fizjologicznej jest czynnik aktywujący płytki krwi [98].

Biosynteza eterolipidów przebiega tzw. szlakiem fosforanu dwuhydroksyacetonu [98]. Enzymy katalizujące pierwsze dwie reakcje szlaku: acylotransferaza fosforanu dwuhydroksyacetonu i syntaza fosforanu alkildwuhydroksyacetonu zostały zlokalizowane zarówno w peroksisomach, jak i we frakcji mikrosomalnej. Rozmieszczenie enzymów w tych dwóch przedziałach komórkowych jest zmienne gatunkowo: w wątrobie świnki morskiej zlokalizowane są one wyłącznie w peroksisomach, natomiast u szczurów występują w peroksisomach i siateczce śródplazmatycznej [48, 135]. W tkankach ludzkich biosynteza eterolipidów przebiega głównie w peroksisomach, bowiem u pacjentów z genetycznie uwarunkowanym brakiem tych organeli obserwuje się znaczny spadek poziomu plazmalogenów w błonach komórkowych [22, 59].

4.4. BIOSYNTETA CHOLESTEROLU I DOLICHOLU

Do niedawna sądzono, iż cholesterol wytwarzany jest wyłącznie na terenie siateczki śródplazmatycznej. Wykrycie kluczowego enzymu inicjującego biosyntezę cholesterolu, a także dolicholu i izopentyloadenozyny – reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA – w peroksysomach hepatocytów szczura [73] dostarczyło dowodów na udział peroksysomów w tym procesie. Badania ilościowe wykazały, że w warunkach normalnych peroksysomy zawierają ok. 5% całkowitej aktywności reduktazy w komórce wątrobowej, a pod wpływem cholestyraminy, która selektywnie stymuluje enzym peroksysomowy, nieznacznie tylko wpływając na reduktazę z frakcji mikrosomowej, udział ten zwiększa się do 20–30% [75]. Przypuszczenie, iż peroksysomowa aktywność reduktazy może wynikać z inkorporacji do tej organeli produktów proteolitycznego rozszczepienia enzymu z siateczki nie potwierdziło się, bowiem oba enzymy dają przy rozdziale podobne dwa polipeptydy (97 i 55 kD). Wskazywałoby to raczej na ich niezależność i być może specyficzność dla danej organeli [81], tak jak w przypadku peroksysomowych i mitochondrialnych enzymów β -oksydacji kwasów tłuszczowych.

Jak wynika z najnowszych badań, izolowane peroksysomy mogą w obecności białek cytozolowych przeprowadzać kompletną biosyntezę cholesterolu, mając przypuszczalnie także inne enzymy niezbędne do tego procesu [169].

Wykryto również w peroksysomach obecność niespecyficznego białka przenoszącego lipidy (dawna nazwa: białko przenoszące sterole 2) [174]. In vitro katalizuje ono przenoszenie fosfolipidów i cholesterolu między błonami biologicznymi i stymuluje niektóre etapy sterydogenezy. W powiązaniu z omówionym już tu udziałem w biosyntezie cholesterolu i kwasów żółciowych wskazuje to wyraźnie na istotną rolę peroksysomów w różnych aspektach wewnątrzkomórkowego metabolizmu cholesterolu i jego pochodnych.

Peroksysomy uczestniczą również w biosyntezie dolicholu – lipidu odgrywającego rolę w regulacji stabilności, płynności i przepuszczalności błon biologicznych, a w formie ufosforylowanej – niezbędnego do syntezy oligosacharydów i do procesu N-glikozytacji białek [7]. Dolichol produkowany jest również w siateczce śródplazmatycznej. Oba systemy – peroksysomowy i mikrosomowy reagują inaczej na chemiczne regulatory metabolizmu lipidów (klofibrat, estry ftalanowe, cholestyramina), co sugeruje ich wzajemną niezależność i pozostawanie pod kontrolą odrębnych mechanizmów regulacyjnych [7].

4.5. UDZIAŁ W BIOSYNTYZIE KWASÓW ŻÓLCIOWYCH

Peroksysomy przeprowadzają *in vitro* wiele przemian związanych z biosyntezą kwasów żółciowych:

- (1) utlenienie kwasu $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trójhydroksy- 5β -cholestanowego do kwasu

cholowego [70] i kwasu $3\alpha,7\alpha$ -dwohydroksy- 5β -cholestanowego do kwasu chenodezoksycholowego [134];

(2) odcinanie bocznego łańcucha cholesterolu [46];

(3) utlenianie 26-hydroksycholesterolu do kwasu 3β -hydroksy-5-cholowego [82];

(4) koniugację kwasów żółciowych z glicyną i tauryną [71].

Pierwsza z wymienionych reakcji jest ściśle uzależniona od obecności CoA, ATP, Mg^{2+} i NAD^+ [70], a jej intensywność jest znacznie wyższa w peroksysomach niż w innych frakcjach subkomórkowych [72]. Jak się wydaje, peroksysomy odcinają boczny łańcuch cholesterolu przy C27 za pośrednictwem mechanizmu identycznego lub zbliżonego do procesu β -oksydacji kwasów tłuszczowych. Nie wiadomo, czy w obu procesach uczestniczą te same enzymy, choć możliwość ta wydaje się raczej mało prawdopodobna, gdyż kłofibrat, który silnie stymuluje β -oksydację, nie wpływa na peroksysomowe przemiany kwasów żółciowych [129].

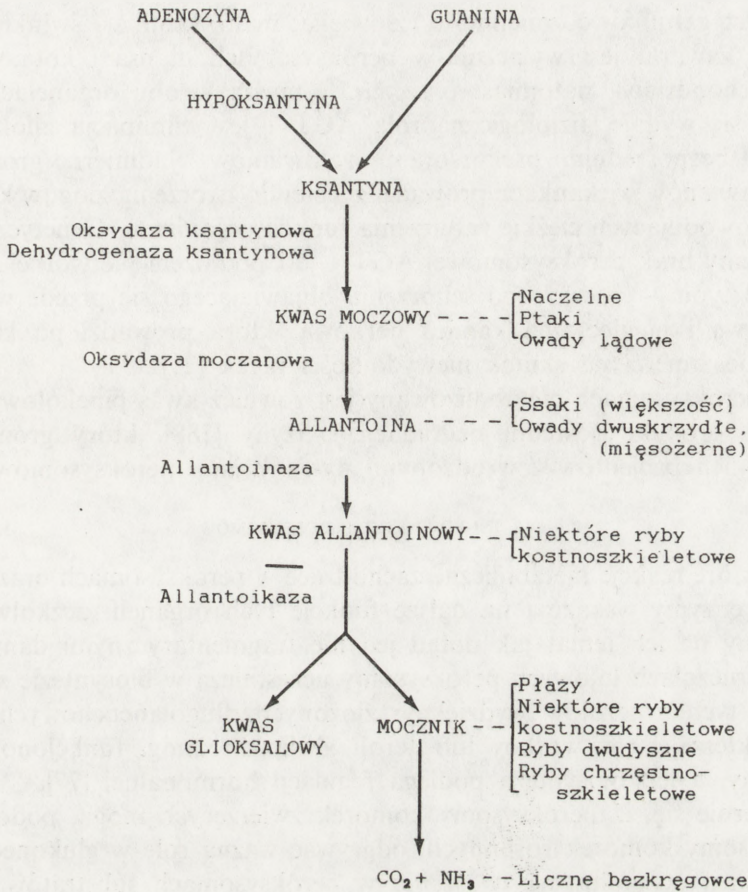
4.6. KATABOLIZM PURYN

Peroksysomy komórek zwierzęcych uczestniczą w katabolizmie puryn, aczkolwiek ich udział w tym procesie wykazuje znaczną zmienność gatunkową. W procesie ewolucji gatunki zwierzęce stopniowo traciły enzymy odpowiedzialne za degradację puryn, wydalając jako produkty końcowe tego procesu związki powstające na coraz wcześniejszym etapie szlaku (ryc. 6).

W peroksysomach różnych gatunków zwierząt wykryto wprawdzie wszystkie enzymy uczestniczące w katabolizmie puryn, ale nie opisano dotychczas przypadku obecności pełnego kompletu tych enzymów w peroksysomach jednego gatunku. I tak np. u ryb peroksysomy zawierają oksydazę moczanową, alantoinazę i alantoikazę, ale oksydaza ksantynowa występuje w cytozolu [118]. Peroksysomy płazów wykazują obecność dwóch pierwszych enzymów, natomiast alantoikaza jest w tej grupie zwierząt enzymem pozaperoksysomowym [153]. Większość ssaków wydalą z moczem alantoinę, a ich peroksysomy zawierają oksydazę ksantynową i moczanową o charakterystycznej lokalizacji w rdzeniu. Naczelne (małpy Nowego Świata) i człowieka cechuje najbardziej zredukowany szlak przemian puryn: komórki nie zawierają oksydazy moczanowej (w związku z czym w peroksysomach nie obserwuje się rdzenia), a wydalany jest kwas moczowy. Wydaje się, że peroksysomy odgrywają istotną rolę w katabolizmie puryn, współpracując w tym zakresie z innymi przedziałami komórkowymi (cytozol, siateczka śródplazmatyczna).

4.7. UDZIAŁ W METABOLIZMIE AMINOKWASÓW

Peroksysomy wykazują aktywność aminotransferazową. Doniesiono dotychczas o wewnątrzperoksysomowej lokalizacji 3 aminotransferaz: alani-na:glioksylian [111], seryna:pirogronian [12] i asparagina:pirogronian [115].



Ryc. 6. Katabolizm puryn z zaznaczeniem etapów odbywających się w peroksyssomach u przedstawicieli różnych grup zwierząt

Choć aktywności te przypisuje się różnym enzymom wyodrębnionym w międzynarodowej klasyfikacji (tab. 2), istnieją przekonujące dowody, iż peroksyssomy zawierają tylko jeden enzym tego typu – aminotransferazę alanina:glioksylian 1 (AGT 1), która może wykorzystywać zarówno glioksylian, jak i pirogronian jako akceptory grupy aminowej, a jako donory – szerokie spektrum L-aminokwasów (m.in. alaninę, serynę, glutaminę, metioninę, asparaginę, leucynę i in.) [117]. Enzym ten występuje zarówno w peroksyssomach, jak i w mitochondriach. Enzymy AGT 1 wyizolowane z obu organeli cechują się identycznymi własnościami i charakterem antygenowym i prawdopodobnie kodowane są przez ten sam gen, jednakże podlegają różnym mechanizmom regulacyjnym. Glukagon i c-AMP aktywują aminotransferazę mitochondrialną, pozostając bez wpływu na enzym peroksyssomowy [116], natomiast klofibrat ma działanie odwrotne [168]. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie tego en-

zymu jest gatunkowo zmienne: u człowieka, małp, królika i świnki morskiej AGT 1 zawarta jest wyłącznie w peroksysomach, u psa i kota wyłącznie w mitochondriach, natomiast u szczura i myszy w obu organelach [114].

Jak się wydaje, fizjologiczną rolą AGT 1 jest eliminacja glioksyalanów, które są bezpośrednimi prekursorami szczawianów. Nadmierne gromadzenie się szczawianów w tkankach prowadzi z kolei do tworzenia złogów krystalicznych, powodujących ciężkie zaburzenia funkcji organizmu. Genetycznie uwarunkowany brak peroksysomowej AGT 1 jest podłożem pierwotnej hiperoksalurii I typu – poważnego schorzenia objawiającego się przede wszystkim uporczywą i nieuleczalną kamicą nerkową, która prowadzi po kilkunastu latach do śmierci na skutek niewydolności nerek [21].

W peroksysomach metabolizowany jest również kwas pipekolowy – iminokwas, produkt pośredni degradacji L-lizyny [188], który gromadzi się w tkankach pacjentów z wrodzonymi dysfunkcjami peroksysomowymi.

4.8. INNE FUNKCJE PEROKSYSOMÓW

Niektóre reakcje metaboliczne zachodzące w peroksysomach oraz wykryte w nich enzymy wskazują na dalsze funkcje tych organeli, aczkolwiek dysponujemy na ich temat jak dotąd jedynie fragmentarycznymi danymi.

W gruczołach łojowych peroksysomy uczestniczą w biosyntezie specyficznej dla tych gruczołów wydzieliny: złożonych długołańcuchowych lipidów o charakterze estrów wosków lub steroli. Związki te mogą funkcjonować jako feromony, a ich biosynteza podlega regulacji hormonalnej [77].

Sugeruje się, iż peroksysomy komórek zwierzęcych mogą, podobnie jak peroksysomy komórek roślinnych, odgrywać ważną rolę w glukoneogenezie. Mechanizm polegałby na tworzeniu w peroksysomach substratów do tego procesu, α -ketokwasów, w reakcjach katalizowanych przez peroksysomowe oksydazy [25].

Niedawno wykryto w peroksysomach płazów syntazę jabłczanową, co dało asumpt do spekulacji na temat możliwości prowadzenia reakcji cyklu glioksalowego nie tylko przez specyficzne peroksysomy roślinne (glioksysomy), lecz również przez peroksysomy komórek zwierzęcych [23].

5. CHEMICZNIE INDUKOWANA PROLIFERACJA PEROKSYSOMÓW

W 1965 r. Hess i wsp. [58] opisali nagłe zwiększenie liczby peroksysomów w komórkach wątrobowych szczurów, którym podawano w paszy klofibrat (Clofibrate, etylo-p-chlorofenoksyizomaślan, CPIB) – lek hypolipidemiczny, powodujący spadek poziomu cholesterolu i trójglicerydów w surowicy. Dalsze badania ujawniły, iż efekt namnażania peroksysomów w hepatocytach i towarzyszącą temu zjawisku hepatomegalię wywołuje wiele leków hypolipidemicznych, zarówno spokrewnionych chemicznie z klofibratem, jak i o odmiennej strukturze, a także niektóre estry ftalanowe używane w charakterze plas-

TABELA 4

Związki chemiczne wywołujące proliferację peroksysomów w hepatocytach szczura

-
- A. Leki hypolipidemiczne spokrewnione strukturalnie z klofibratem (nazwy oryginalne)
- Clofibrate
 - Ciprofibrate
 - Bezafibrate
 - Fenofibrate
 - Nafenopin
 - Methyl Clofenapate
 - Gemfibrozil
 - Clobuzarit (ICI 55897)
- B. Plastyfikatory
- Dwu-(2-etyloheksylo)ftalan (DEHP)
 - Monoetyloheksyloftalan (MEHP)
 - Dwu-(2-etyloheksylo)apdypinian (DEHA)
- C. Leki hypolipidemiczne i związki odmienne strukturalnie od klofibratu
- WY-14643
 - BM-15766
 - LY-171883
 - Kwas tibrowy
 - Kwas trójchlorooctowy

tyfikatorów (zmiękczaczy) w przemyśle (tab. 4) [138]. Proliferacji peroksysomów (z 2% objętości komórki do 15–25%) towarzyszy znamieny (nawet 20–30-krotny) wzrost aktywności enzymów peroksysomowej β -oksydacji kwasów tłuszczowych, co tłumaczy mechanizm hypolipidemicznego działania klofibratu i jego pochodnych [86]. Tak znaczna aktywacja katabolizmu lipidów jest rezultatem nasilonej biosyntezy enzymów, gdyż ilość funkcjonalnie czynnego m-RNA dla enzymów β -oksydacji wzrasta pod wpływem proliferatorów 10–20-krotnie, a szybkość transkrypcji odpowiednich genów zwiększa się 9–15-krotnie już po 1 godz. od jednorazowego podania proliferatora i utrzymuje się na tym poziomie ok. 16 godz. [137].

Inne enzymy peroksysomowe reagują na proliferatory w zróżnicowany sposób: oktanoiltransferaza karnitynowa wykazuje, podobnie jak enzymy β -oksydacji, znaczny wzrost pozostający w liniowej korelacji z procesem namnażania się peroksysomów, aktywność katalazy wzrasta umiarkowanie (o 100%), natomiast aktywność oksydaz: moczanowej, D-aminokwasów i L- α -hydroksykwasów spada [93].

Reakcję peroksysomów można zauważyć już po 24 godz. podawania proliferatora; nasila się ona wyraźnie po 3 dniach, a swe maksimum przechodzące następnie w fazę plateau osiąga po 10 dniach. Namnażające się peroksysomy zasadniczo zachowują swą normalną morfologię, choć częściej obserwuje się ich złożone, koralikowe formy [140]. Zdolność układu peroksysomowego do proliferacji indukowanej chemicznie wykazuje znaczne róż-

nicowanie gatunkowe, a także uzależniona jest w pewnym stopniu od płci [145]. Namnażanie się peroksosomów jest najsilniej wyrażone u szczurów (samców) i myszy, nieco słabiej u innych gryzoni, a znacznie słabiej lub wcale u pozostałych ssaków (tab. 5). Raczej fragmentaryczne badania przeprowadzone na pacjentach leczonych środkami hypolipidemicznymi nie dostarczyły przekonujących dowodów na indukowaną proliferację peroksosomów w ludzkich hepatocytach [145].

TABELA 5

Porównanie wpływu niektórych leków hypolipidemicznych i estrów ftalanowych na proliferację peroksosomów w hepatocytach różnych gatunków ssaków (wg [145])

Proliferator	Szczur	Mysz	Chomik	Pies	Rezus	Człowiek
Clofibrate	+	+	+	+	n.b.	-/+
Fenofibrate	+	-	+	-	-	-
Gemfibrozil	+	n.b.	+	-	+	-
ICI 55897	+	+	+	-	n.b.	n.b.
LY 171883	+	+	+	-	-	n.b.
DEHP	+	+	+	n.b.	n.b.	n.b.

n.b.: nie badano

Wydaje się, że indukowane chemicznie namnażanie się peroksosomów dotyczy wyłącznie komórek wątrobowych, które wykazują ten efekt nawet w warunkach hodowli *in vitro*, podczas gdy peroksosomy kanalików proksymalnych nerki czy komórek innych narządów praktycznie nie reagują na proliferatory zmianami morfologicznymi, choć wykazują — w mniejszym stopniu niż peroksosomy hepatocytów — aktywację procesu β -oksydacji lipidów [142, 158].

Mechanizm działania proliferatorów jest jak dotąd niejasny, a dotyczące go hipotezy są różne. Pewne przesłanki (swoistość komórkowa odpowiedzi, proliferacja peroksosomów w hepatocytach przeszczepionych do innych rejonów organizmu) wskazują na mechanizm receptorowy. Ostatnio wyizolowano hipotetyczny receptor — białko o m.c.z. 70 kD wiązane na kolumnie z zaadsorbowanym proliferatorem [139], choć interpretacja tych wyników została zakwestionowana [103]. Zauważono równocześnie, że proliferatory mają pewne wspólne cechy strukturalne: albo mają grupę karboksylową w obrębie struktury amfifatycznej, albo też mogą być metabolizowane do kwasu karboksylowego — w obu przypadkach stanowią „fałszywe substraty” dla β -oksydacji, gdyż nie mogą ulec dalszemu rozkładowi w tym procesie. Nieskuteczny atak enzymów na te substraty ma powodować — być może na drodze sprzężenia zwrotnego — aktywację całego systemu β -oksydacji i wtórnie proliferację peroksosomów [11]. Hipoteza ta zakłada swobodny dostęp proliferatów do wnętrza peroksosomów i jest trudna do pogodzenia z mechanizmem receptorowym.

W mechanizmie działania proliferatorów uczestniczy w bliżej nieznanym sposobie acylotransferaza karnitynowa, bowiem jej inhibitory zapobiegają chemicznie indukowanemu namnażaniu się peroksysonów [57]. Proliferatory zwiększają przepuszczalność błony peroksysonów [102], powodują zmiany ilościowe jej składników lipidowych (spadek poziomu fosfatydylocholiny, a wzrost lizofosfatydylocholiny, która ma charakter detergentu i może destabilizować błonę) [20], a także hamują biosyntezę fosfatydylocholiny [127]. W związku z tym sugeruje się, iż proliferatory zaburzają cykl deacylacji – reacylacji tych dwóch fosfolipidów [20].

Przewlekłe podawanie szczurom związków wywołujących proliferację peroksysonów indukuje powstawanie pierwotnych nowotworów wątroby. Proliferatory nie wykazują własności mutagennych, nie wiążą się z DNA, ani też nie powodują zmian w jego strukturze. W związku z tym Reddy i wsp. [138] uznali je za nową klasę karcynogenów o odmiennym mechanizmie działania: transformacja nowotworowa komórek miałyby być wtórnym efektem proliferacji peroksysonów i związanego z nią nasilenia procesów oksydacyjnych, połączonych z nadmierną produkcją agresywnych chemicznie wolnych rodników tlenowych i nadtlenu wodoru (stres oksydacyjny).

6. PEROKSYSONY W ZJAWISKACH PATOLOGICZNYCH

6.1. ZABURZENIA SYSTEMU PEROKSYSONÓW W PROCESACH CHOROBYCH

W trakcie dotychczasowych badań nad peroksysonami komórek wątrobowych nagromadziło się wiele danych świadczących o zmianach ilości i struktury peroksysonów w przebiegu niektórych procesów chorobowych.

W ostrym zakażeniu bakteryjnym (pneumokokowym), wywołanym eksperymentalnie u szczurow, stwierdzono redukcję liczby peroksysonów do około połowy oraz wyraźny spadek aktywności katalazy i oksydazy moczanowej [18]. Podobną reakcję peroksysonów uzyskano po indukowanym chemicznie aseptycznym zapaleniu wątroby [17]. W przebiegu ostrego wirusowego zapalenia wątroby obserwowano reaktywny wzrost liczby peroksysonów zarówno u myszy [92], jak i u ludzi [150, 162].

Wiele doniesień dotyczy zmian układu peroksysonowego w patologii człowieka: cytochemiczne badania 85 biopsji wątrobowych pochodzących od pacjentów z różnymi schorzeniami tego narządu wykazały wzrost liczby peroksysonów w marskości i procesach przebiegających z zastojem żółci, a także spadek cytochemicznie wykrywanej aktywności katalazy w tych dwóch stanach oraz w wirusowym zapaleniu wątroby i w nowotworach tego narządu [147]. W chorobie Wilsona (genetycznie uwarunkowane zaburzenie przemiany miedzi doprowadzające do odkładania się tego metalu w tkankach) sporadycznie obserwowano wzrost liczby peroksysonów [161] i zwiększenie ich roz-

miarów [162]. Zwiększona ilość peroksysomów oraz występowanie w nich nukleoidów, których nie spotyka się u człowieka, opisano w przypadkach zespołu Reye'a (ostra encefalopatia przebiegająca ze stłuszczeniem wątroby) [166]. Zmniejszenie rozmiarów peroksysomów ma natomiast towarzyszyć chorobie Menkesa i wrodzonej analbuminemii [162].

Obserwowane w opisanych schorzeniach zmiany peroksysomów są raczej objawami towarzyszącymi niż cechami charakterystycznymi, a ponadto opisano je na podstawie nielicznych przypadków. Podkreśla się również, że stosowana tu mikroskopia elektronowa daje zaledwie wycinkowy obraz badanego narządu (wynika to z bardzo małych rozmiarów próbek tkanki) i jedynie rzetelna analiza morfometryczna mogłaby stanowić podstawę do wysuwania uzasadnionych wniosków.

6.2. PEROKSYSOMY W PROCESACH NOWOTWOROWYCH

Pierwotnym nowotworom wątroby u zwierząt (wątrobiak, chłoniak, rak, mięsak) towarzyszy znaczny spadek aktywności katalazy w tym narządzie (do 5% normy). Efekt ten jest odwracalny: aktywność enzymu powraca do fizjologicznych wartości po chirurgicznej lub chemioterapeutycznej likwidacji guza [67]. Podobne zjawisko zauważono w procesach nowotworowych u człowieka [124, 183]. W przeszczepialnych liniach komórek transformowanych nowotworowo obserwuje się, oprócz zróżnicowanego spadku aktywności enzymów peroksysomowych, także wyraźne zmniejszenie liczby samych peroksysomów: w komórkach guza wysiękowego Ehrlicha ilość peroksysomów spada o 40% [107], a w wątrobiakach różnego typu (Morrisa, Nowikoffa) liczba peroksysomów jest ujemnie skorelowana z dynamiką wzrostu guza, przy czym w najszybciej rozwijających się guzach peroksysomy zanikają zupełnie [62].

6.3. CHOROBY PEROKSYSOMOWE

W 1973 r. Goldfischer i wsp. [37] opisali całkowity brak wykrywalnych ultrastrukturalnie i cytochemicznie peroksysomów w komórkach wątrobowych i nerkowych pacjentów z zespołem mózgowo-wątrobowo-nerkowym Zellwegera. Odkrycie to dało początek szeroko zakrojonym badaniom peroksysomów i występujących w nich enzymów w wrodzonych zaburzeniach metabolicznych. W chwili obecnej wiadomo, że przynajmniej w 10 schorzeniach tego typu dysfunkcja peroksysomów (defekt enzymatyczny, a niekiedy również zaburzenie biogenezy całej organeli) stanowi zasadniczy, jeżeli nie jedyny patomechanizm. Zespołom tym nadano zbiorczą etykietę „chorób peroksysomowych” [109, 151]. Choroby te, z wyjątkiem jednej, charakteryzuje autosomalny recesywny sposób dziedziczenia, przeważnie występują we wczesnym okresie życia i kończą się niepomyślnie.

Choroby peroksysomowe podzielono wstępnie na 3 grupy:

(1) zespoły z defektem pojedynczego enzymu i normalną liczbą peroksysomów w hepatocytach;

(2) zespoły z defektem wieloenzymatycznym i normalną liczbą peroksysomów;

(3) zespoły z defektem wieloenzymatycznym i obniżoną liczbą peroksysomów lub ich całkowitym brakiem (tab. 6).

TABELA 6
Choroby peroksysomowe

Grupa	Nazwa zespołu	Przeciętny czas życia	Początek manifestacji objawów	Enzym podlegający defektowi	Liczba peroksysomów w hepatocytach
I	Akatalazemia	normalny	do 10 r.ż.	katalaza	normalna
	Pierwotna hyperoksaluria I typu	18 lat	0-3 r.ż.	aminotransferaza alanina:glioksylan	normalna
	Adrenoleukodystrofia sprzężona z chromosomem X	15 lat	3-5 r.ż.	syntaza (ligaza) acylo-CoA	normalna
II	Hyperacydemia pipelkowa	2 lata	0-1 r.ż.	defekt wieloenzymatyczny	normalna
	Pseudozespół Zellwegera	1 rok	0-6 m.ż.	tiolaza 3-ketoacylo-CoA (defekt wieloenzymatyczny?)	normalna
III	Zespół Zellwegera	1 rok	0-6 m.ż.	defekt wieloenzymatyczny	brak
	Noworodkowa adrenoleukodystrofia	2-10 lat	0-1 r.ż.	defekt wieloenzymatyczny	zmniejszona do 10%
	Pseudoadrenoleukodystrofia noworodkowa [130]	?	0-1 r.ż.	wieloenzymatyczny oksydaza acylo-CoA (defekt wieloenzymatyczny?)	zmniejszona, duże peroksysomy
	Niemowlęca postać choroby Refsum	15 lat	0-3 r.ż.	defekt wieloenzymatyczny	brak lub zmniejszona
	Chondrodysplazja punktowa, typ ryzomeliczny	1 rok	0-6 m.ż.	defekt wieloenzymatyczny	zmniejszona

Choroby należące do pierwszej grupy charakteryzują się odrębną symptomatologią kliniczną: w akatalazemii objawy ograniczają się do wrzodząco-martwiczych zmian w jamie ustnej, nie pociągających za sobą — przy prawidłowym leczeniu — żadnych konsekwencji dla pacjenta, natomiast w pierwotnej hyperoksalurii wiodącym objawem jest ciężka kamica nerkowa, prowadząca z reguły do śmierci na skutek niewydolności nerek.

Jest interesujące, iż zespoły z wieloenzymatyczną dysfunkcją peroksyso-

mów wykazują wiele wspólnych objawów klinicznych. Na pierwszy plan wysuwają się ciężkie zaburzenia neurologiczne, wynikające z upośledzonego procesu mielinizacji włókien nerwowych. Zjawisko to wyjaśnia rola peroksysomów w biosyntezie eterolipidów, stanowiących istotny składnik błon biologicznych i zapewne niezbędnych także do tworzenia osłonek mielinowych. Inne wspólne cechy kliniczne: zaburzenia rozwojowe twarzoczaszki, zmiany degeneracyjne siatkówki i zaburzenia kostnienia, wynikają być może również z dysfunkcji peroksysomów, aczkolwiek ewentualny związek przyczynowy pozostaje wciąż nieznanym.

Wieloenzymatyczne dysfunkcje peroksysomów cechują się także podobnymi zaburzeniami biochemicznymi, odzwierciedlającymi wypadnięcie metabolicznych funkcji peroksysomów: u pacjentów stwierdza się podwyższony poziom długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w płynach ustrojowych i tkankach, upośledzoną β -oksydację tych kwasów, obniżony poziom plazmalogenów w błonach komórkowych i ich zmniejszoną biosyntezę, a także zaburzenia syntezy kwasów żółciowych.

Obiektem szczególnie intensywnych badań jest zespół Zellwegera, z uwagi na jego modelowe własności spowodowane całkowitym brakiem peroksysomów. Jak się okazało, defekt ten nie jest w pełni uogólniony, bowiem nieliczne i bardzo małe peroksysomy wykryto u tych pacjentów w komórkach nabłonka jelitowego [13] i w hodowanych fibroblastach skórnych [8]. W hepatocytach, w których peroksysomy nie występują, syntetyzowane są jednak białka błony peroksysomowej [88, 149]. Pomimo braku wszystkich enzymów peroksysomowej β -oksydacji lipidów, wykryto w pełni funkcjonalny m-RNA dla tych enzymów [163]. Wyniki te sugerują, iż w zespole Zellwegera tworzone są zarówno błony peroksysomów, jak i enzymy peroksysomowe, natomiast defekt dotyczy ostatniego etapu biogenezy organeli — łączenia się tych składników w prawidłowe, aktywne peroksysomy. W tej sytuacji błony peroksysomowe mogą tworzyć w komórce niecharakterystyczne formacje, nie do odróżnienia od elementów siateczki śródplazmatycznej czy pęcherzyków wewnątrzkomórkowych, natomiast enzymy peroksysomowe, nie mogąc dotrzeć do swej „stacji docelowej”, są degradowane prawie natychmiast po ich translacji [167].

Jak wynika z przedstawionej tu bardzo skrótowo problematyki, choroby peroksysomowe stanowią cenny materiał badawczy, mogący w znacznej mierze przyczynić się do poszerzenia naszej wiedzy na temat biogenezy peroksysomów i ich fizjologicznej roli w skali zarówno komórki, jak i całego organizmu.

7. BIOGENEZA PEROKSYSOMÓW

Przez wiele lat akceptowano hipotezę wyjaśniającą biogenezę peroksysomów w bardzo prosty sposób: miałyby one odszczepiać się z cystern siateczki śródplazmatycznej po uprzednim zgromadzeniu w jej fragmentach odpowie-

dnich enzymów, które w procesie takiego „pączkowania” dostawałyby się do nowo wytworzonych peroksysomów [25]. W ciągu ostatniego dziesięciolecia nagromadziło się jednakże wiele danych jednoznacznie przeczących tej hipotezie, którą należy obecnie uznać za fałszywą, choć wciąż można się z nią spotkać nawet w stosunkowo nowych i cieszących się bardzo dobrą opinią podręcznikach biologii komórki [1]. Prowadzone w ostatnich latach badania nad biogenezą peroksysomów przyniosły znacznie więcej argumentów negatywnych, obalających dotychczasowe poglądy na ten temat, niż danych wyjaśniających mechanizm tego procesu. Naszą obecną wiedzę można przedstawić następująco.

A. Peroksysomy nie wykazują żadnej morfologicznej łączności z siateczką śródplazmatyczną. Kanalikowe wypustki peroksysomów, które błędnie interpretowano jako połączenia z siateczką [121] okazały się połączeniami między peroksysomami [41, 141, 186]. Zastosowanie metod cytochemicznych, uwidaczniających aktywność enzymów specyficznych dla siateczki i peroksysomów, nie wykazało w żadnym przypadku współlistnienia obu rodzajów enzymów w tym samym przedziale błonowym [155].

B. W błonie peroksysomów obecnie są swoiste tylko dla niej białka [31, 54]. Różni się ona ponadto od błon siateczki śródplazmatycznej i mitochondriów ilością białek i lipidów [31], a także przepuszczalnością [176]. Błona peroksysomów ma zatem charakter unikatowy i nie można wykazać jej pokrewieństwa z żadnym innym systemem błonowym w komórce.

C. Wszystkie zbadane dotychczas pod tym kątem białka peroksysomowe (zarówno enzymy, jak i białka błonowe) syntetyzowane są na wolnych (cytoplazmatycznych) rybosomach i zostają posttranslacyjnie włączone do peroksysomów z pominięciem siateczki śródplazmatycznej. Udowodniono to, jak dotąd, w odniesieniu do katalazy, oksydazy moczanowej, enzymów β -oksydacji kwasów tłuszczowych oraz białek błonowych o m.cz. 22 i 70 kD [32, 39, 79, 89, 104, 164]. W odróżnieniu od podobnego mechanizmu syntezy egzogennych białek mitochondrialnych oraz białek tworzonych na rybosomach związanych z siateczką, białka peroksysomowe produkowane są w swojej finalnej wielkości, tzn. bez dodatkowego peptydu sygnałowego. W konsekwencji ich inkorporacja do peroksysomów nie wymaga proteolitycznego skrócenia cząsteczki [32, 136]. Wyjątek stanowi tiolaza 3-ketoacylo-CoA, która syntetyzowana jest w postaci dłuższego prekursora o m.cz. 44 kD, skracanego do 41 kD przed włączeniem do peroksysomu [33]. Proteolityczne skrócenie cząsteczki tego enzymu nie jest sprzężone z procesem jego inkorporacji do peroksysomów [104]. Badania prowadzone nad katalazą wykazały, iż przeciętny czas upływający między translacją a włączeniem do peroksysomu wynosi 14 min. Enzym ten syntetyzowany jest w formie apomonomeru i dopiero w obrębie peroksysomu dołącza hem i agreguje w aktywny tetramer [85].

Proces inkorporacji białek z cytozolu do peroksysomów jest wciąż mało

znany. Wymaga on hydrolizy ATP, jednakże w odróżnieniu od analogicznego mechanizmu dotyczącego mitochondriów nie jest uzależniony od potencjału błony [64]. Import dwóch zbadanych dotąd pod tym kątem białek, oksydazy acylo-CoA i lucyferazy, rozpoczyna się od końca karboksylowego [45, 159], podczas gdy do błon siateczki śródplazmatycznej i mitochondriów białka wbudowywane są od przeciwnego, aminowego końca. Istnienie mechanizmu receptorowego przy inkorporacji białek peroksysomowych jest sporne z uwagi na nieobecność typowych, odszczepianych odcinków sygnałowych. Równocześnie sugeruje się możliwość pełnienia tej roli przez końcowy fragment cząsteczki każdego białka peroksysomowego i w przypadku lucyferazy ustalono, iż cechy odcinka sygnałowego wykazuje 12-aminokwasowy fragment na karboksylowym końcu łańcucha [45]. Wyizolowano nawet niedawno przypuszczalny receptor z błony peroksysomowej [91].

Badania komórek nie zawierających peroksysomów, pochodzących od pacjentów z zespołem Zellwegera, pozwoliły stwierdzić, że obecność peroksysomów jest niezbędna dla posttranslacyjnej „żywności” białek peroksysomowych: przy braku „stacji docelowej” enzymy te są syntetyzowane, lecz prawie natychmiast ulegają degradacji [163, 165].

Biosynteza lipidów wchodzących w skład błony peroksysomu jest dość zagadkowa. Przyjmuje się, że powstają one w siateczce śródplazmatycznej, gdyż nie wykryto dotychczas w peroksysomach enzymów odpowiedzialnych za ich syntezę (wyjątek stanowią enzymy biosyntezy eterolipidów). Nowo powstałe fosfolipidy mają być dostarczane do peroksysomów za pośrednictwem białek nośnikowych [19].

D. Nowe peroksysomy powstają przez podział dotychczas istniejących peroksysomów. Stwierdzenie to, będące obecnie pewnego rodzaju dogmatem, implikuje sposób dziedziczenia organeli: podobnie jak mitochondria, peroksysomy mogą być przekazywane z pokolenia na pokolenie wyłącznie przez komórkę jajową [36]. Nikt jednak dotychczas nie wykrył peroksysomów w komórkach jajowych.

Wszystkie przytoczone tu dane najlepiej łączy hipoteza „siateczki peroksysomowej”, wysunięta przez Lazarowa i wsp. już w 1980 r. [90]. Według tej hipotezy peroksysomy są nie tyle odrębnymi jednostkami, co specyficznym, samopowielającym się przedziałem błonowym w komórce. Elementy tego przedziału mogą się w sposób przypadkowy łączyć i rozdzielać, wymieniając przy tym składniki w nich zawarte. W odróżnieniu od innego przedziału błonowego, siateczki śródplazmatycznej, która stanowi dosyć statyczną strukturalnie całość, w „siateczce peroksysomowej” przeważają procesy rozdziału, co prowadzi do powstawania odrębnych pęcherzyków jako dominującej formy morfologicznej. Nowe składniki peroksysomów syntetyzowane są poza ich obrębem, wbudowywane, a następnie rozprowadzane do różnych fragmentów „siateczki peroksysomowej” na skutek wspomnianych już zjawisk przypadkowego łączenia się i rozdzielania jej elementów.

TABELA 7
Porównanie danych dotyczących biogenezy peroksysomów i mitochondriów

	Peroksysomy	Mitochondria
Miejsce biosyntezy białek	wolne rybosomy	wolne rybosomy*
Import białek do organeli	posttranslacyjny	posttranslacyjny
Białka syntetyzowane w postaci większych prekursorów	nie	tak
Proteoliza białek niezbędna do ich importu	nie	tak
Źródło energii dla importu białek	hydroliza ATP	gradient elektrochemiczny
Kierunek inkorporacji białka	od końca –COOH	od końca –NH ₂
Sposób namnażania	podział	podział
Autonomiczny DNA	brak	obecny

* dotyczy białek kodowanych w jądrze komórkowym.

Z uwagi na swoistą autonomię, a także mechanizmy syntezy i inkorporacji białek, peroksysomy wykazują pewne podobieństwo do mitochondriów i chloroplastów, które jak wiadomo wywodzą się ewolucyjnie z organizmów prokariotycznych. Niemniej podobieństwom towarzyszą różnice (tab. 7), a ewentualnych zwolenników przypisania endosymbiotycznej drogi ewolucyjnej także peroksysomom skutecznie odstrasza fakt, iż nie wykryto jak dotąd w peroksysomach nawet śladowych ilości DNA ani też żadnych innych elementów składowych autonomicznego aparatu genetycznego. Warto byłoby może rozważyć sytuację, w której nie część (jak w mitochondriach i chloroplastach), lecz całość informacji genetycznej byłego endosymbionta została „przeniesiona” do jądra komórki-gospodarza. Sytuacja taka zdaje się dość dobrze odpowiadać rozszyfrowanej do tej pory części historii naturalnej peroksysomów.

8. OBRÓT PEROKSYSONÓW W KOMÓRCIE

„Cykl życiowy” peroksysomów był, jak dotąd, przedmiotem tylko nielicznych badań. W obrazach z mikroskopu elektronowego wielokrotnie obserwowano peroksysomy wewnątrz typowych wakuoli autofagicznych, co wskazuje, iż są one, podobnie jak inne organele komórkowe, degradowane przy użyciu własnego systemu trawienia komórki [61]. Peroksysomy hepatocytów szczura charakteryzują się podobnym czasem półtrwania, wynoszącym ok. 36 godz. [131]. Czas ten jest zgodny z czasem półtrwania katalazy, określonym przy użyciu dwóch niezależnych do siebie metod [133]. Nie wykryto dotychczas żadnych morfologicznych ani biochemicznych wykładników „starzenia się”

peroksysomów; wydaje się, że nie zmieniają one w żaden określony sposób kształtu, wielkości ani wyposażenia enzymatycznego [132]. Obserwacje te popierają pogląd, iż peroksysomy nieustannie wymieniają między sobą zawartość, a ich eliminacja z komórki ma charakter przypadkowy.

9. UWAGI KOŃCOWE

Czytelnik, który dotarł do końca tego przydługiego przeglądu, może odnieść wrażenie, iż ma przed sobą dość chaotyczny zbiór danych, z których nie wynikają żadne wnioski ogólniejszej natury. Tak właśnie przedstawia się obecny stan wiedzy na temat tej organeli. Nie wiadomo nawet, czy peroksysomy są elementami istotnymi dla funkcjonowania komórki zwierzęcej, czy też być może — jak przypuszczają niektórzy — stanowią swego rodzaju skamielinę, ewolucyjny rudymet zamierzchłych szlaków metabolicznych. Jest to bowiem jedyna organela, przy której braku komórki mogą żyć i namnażać się, o czym świadczą tkanki pacjentów z zespołem Zellwegera, a także zmutowana linia komórkowa pozbawiona peroksysomów, wyizolowana niedawno z jajnika chomika chińskiego [139]. Brak natomiast peroksysomów związany jest z poważnymi zaburzeniami metabolicznymi w skali narządów i całego organizmu, przy czym nie sposób na razie wyrokować, czy zaburzenia te są skutkiem eliminacji organeli, czy też brak peroksysomów jest jedynie objawem ubocznym jakiegoś głębszego defektu.

Nauka czeka zatem na dalsze dane, które umożliwiłyby dokonanie „wielkiej syntezy”, wyjaśniającej rolę i ustalającą miejsce peroksysomów w funkcjonalnej organizacji komórki i w fizjologii organizmu zwierzęcego. W badaniach nad peroksysomami otworzyły się niedawno nowe perspektywy, wynikające z zastosowania najbardziej wyrafinowanych metod biologii molekularnej [126], z możliwości znakowania błon peroksysomowych swoistymi przeciwciałami [149] oraz z dostępności atrakcyjnego modelu badawczego, jakim są komórki pozbawione peroksysomów. Można żywić nadzieję, iż nadchodzące dziesięciolecie rozwiąże wiele zagadek dotyczących tej organeli.

LITERATURA

- [1] ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D., *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing Inc., New York-London 1983.
- [2] ALEXSON S. E. H., FUJIKI Y., SHIO H., LAZAROW P. B., Partial disassembly of peroxisomes, *J. Cell Biol.*, **101**: 294-305, 1985.
- [3] ANGERMÜLLER S., BRUDER G., VÖLKL A., WESCH H., FAHIMI H. D., Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes: A cytochemical and biochemical study. *Eur. J. Cell Biol.*, **45**: 137-145, 1987.
- [4] ANGERMÜLLER S., LEUPOLD C., VÖLKL A., FAHIMI H. D., Electron microscopic cytochemical localization of α -hydroxyacid oxidase in rat liver, *Histochemistry*, **85**: 403-409, 1986.

- [5] ANTONENKOV V. D., PIROZHKOVA S. V., PANCHENKO L. F., Intraparticulate localization and some properties of a clofibrate-induced peroxisomal aldehyde dehydrogenase from rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **149**: 159–167, 1985.
- [6] – Aldehyde dehydrogenase in mammalian peroxisomes, [w] *Peroxisomes in Biology and Medicine*, red. H. D. Fahimi, H. Sies, Springer, Berlin–Heidelberg 1987, 244–252.
- [7] APPELKVIST E.-L., DALLNER G., Dolichol metabolism and peroxisomes, [w] *Peroxisomes in Biology and Medicine*, red. H. D. Fahimi, H. Sies, Springer, Berlin–Heidelberg 1987, 53–66.
- [8] ARIAS J. A., MOSER A. B., GOLDFISCHER S. L., Ultrastructural and cytochemical demonstration of peroxisomes in cultured fibroblasts from patients with peroxisomal deficiency disorders, *J. Cell Biol.*, **100**: 1789–1792, 1985.
- [9] BARRETT J. M., HEIDGER P. M., Microbodies of the rat renal proximal tubule: ultrastructural and cytochemical investigations, *Cell Tissue Res.*, **157**: 283–305, 1975.
- [10] BAUMGART E., STEGMEIER K. H., SCHMIDT F. H., FAHIMI H. D., Proliferation of peroxisomes in pericentral hepatocytes of rat liver after administration of a new hypocholesterolemic agent (BM 15766). Sex-dependent ultrastructural differences. *Lab. Invest.*, **56**: 554–564, 1987.
- [11] BERGE R. K., AARSLAND A., OSMUNDSEN H., AARSAETHER N., MALE R., The relationship between the levels of long-chain acyl-CoA and clofibril-CoA and the induction of peroxisomal β -oxidation, [w] *Peroxisomes in Biology and Medicine*, red. H. D. Fahimi, H. Sies, Springer, Berlin–Heidelberg 1987, 273–278.
- [12] BISHOP J. E., HAJRA A. K., Mechanism and specificity of formation of long chain alcohols by developing rat brain, *J. Biol. Chem.*, **256**: 9542–9550, 1981.
- [13] BLACK V. H., CORNACCHIA L., Stereological analysis of peroxisomes and mitochondria in intestinal epithelium of patients with peroxisomal deficiency disorders: Zellweger's syndrome and neonatal-onset adrenoleukodystrophy, *Am. J. Anat.*, **177**: 107–118, 1986.
- [14] BORST P., How proteins get into microbodies (peroxisomes, glyoxysomes, glycosomes), *Biochim. Biophys. Acta*, **866**: 179–203, 1986.
- [15] BÖCK P., KRAMAR R., PAVELKA M., Peroxisomes and Related Particles in Animal Tissues. *Cell Biology Monographs 7*, Springer, Wien–New York 1980.
- [16] BREMER J., Carnitine and its role in fatty acid metabolism. *Trends Biochem. Sci.*, **2**: 207–209, 1977.
- [17] CANONICO P. G., RILL W., AYALA E., Effects of inflammation on peroxisomal enzyme activities, catalase synthesis and lipid metabolism, *Lab. Invest.*, **37**: 479–486, 1977.
- [18] CANONICO P. G., WHITE J. D., POWANDA M. C., Peroxisome depletion in rat liver during pneumococcal sepsis, *Lab. Invest.*, **33**: 147–150, 1975.
- [19] CRANE D. I., HOLMES R. S., MASTERS C. J., Synthesis and incorporation of phospholipids by peroxisomes of mouse liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **712**: 57–64, 1982.
- [20] CRANE D. I., MASTERS C. J., The effect of clofibrate on the phospholipid composition of the peroxisomal membranes in mouse liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **876**: 256–263, 1986.
- [21] DANPURE C. J., JENNINGS P. R., Peroxisomal alanine: glyoxylate aminotransferase deficiency in primary hyperoxaluria type I, *FEBS Lett.*, **201**: 20–24, 1986.
- [22] DATTA N. S., WILSON G. N., HAJRA A. K., Deficiency of enzymes catalyzing the biosynthesis of glycerol-ether lipids in Zellweger syndrome, *New Engl. J. Med.*, **311**: 1080–1083, 1984.
- [23] DAVIS W. L., JONES R. G., GOODMAN D. B. P., Cytochemical localization of malate synthetase in amphibian fat body adipocytes: possible glyoxylate cycle in a vertebrate, *J. Histochem. Cytochem.*, **34**: 689–692, 1986.
- [24] DEBEER L. J., MANNAERTS G. P., The mitochondrial and peroxisomal pathways of fatty acid oxidation in rat liver, *Diabet. Metabol.*, **9**: 134–140, 1983.

- [25] DE DUVE C., BAUDHUIN P., Peroxisomes (microbodies and related particles), *Physiol. Rev.*, **46**: 323-357, 1966.
- [26] DICZFALUSY U., ALEXSON S. E. H., PEDERSEN J. I., Chain-shortening of prostaglandin F_{2a} by rat liver peroxisomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**: 1206-1213, 1987.
- [27] DOMMES V., BAUMGART C., KUNAU W. H., Degradation of unsaturated fatty acids in peroxisomes. Existence of a 2,4-dienoyl-CoA reductase pathway, *J. Biol. Chem.*, **256**: 8259-8262, 1981.
- [28] FAHIMI H. D., Cytochemical localization of peroxidase activity in rat hepatic microbodies (peroxisomes), *J. Histochem. Cytochem.*, **16**: 547-550, 1968.
- [29] FAHIMI H. D., GRAY B. A., HERZOG V. K., Cytochemical localization of catalase and peroxidase in sinusoidal cells of rat liver, *Lab. Invest.*, **34**: 192-201, 1976.
- [30] FAHIMI H. D., KINO M., HICKS L., THORP K. A., ABELMAN H. W., Increased myocardial catalase in rats fed ethanol, *Am. J. Pathol.*, **96**: 373-390, 1979.
- [31] FUJIKI Y., FOWLER S., SHIO H., HUBBARD A. L., LAZAROW P. B., Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *J. Cell Biol.*, **93**: 103-110, 1982.
- [32] FUJIKI Y., RACHUBIŃSKI R. A., LAZAROW P. B., Synthesis of a major integral membrane polypeptide of rat liver peroxisomes on free polysomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 7127-7131, 1984.
- [33] FUJIKI Y., RACHUBIŃSKI R. A., MORTENSEN R. M., LAZAROW P. B., Synthesis of 3-ketoacyl-CoA thiolase of rat liver peroxisomes on free polyribosomes as a larger precursor. Induction of thiolase mRNA activity by clofibrate, *Biochem. J.*, **226**: 697-704, 1985.
- [34] FURUTA S., MIYAZAWA S., OSUMI T., HASHIMOTO T., UI N., Properties of mitochondrial and peroxisomal enoyl-CoA hydratases from rat liver, *J. Biochem.*, **88**: 1059-1070, 1980.
- [35] GEE R., Mc GROARTY E., HSIEH B., WIED D. M., TOLBERT N. E., Glycerol phosphate dehydrogenase in mammalian peroxisomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**: 187-195, 1974.
- [36] GOLDFISCHER S. L., Pathogenesis of Zellweger's cerebro-hepato-renal syndrome and related peroxisome deficiency disorders, [w] *Peroxisomes in Biology and Medicine*, red. H. D. Fahimi. H. Sies. Springer, Berlin-Heidelberg 1987, 323-334.
- [37] GOLDFISCHER S., MOORE C. L., JOHNSON A. B., SPIRO A. J., VALSAMIS M. P., WIŚNIEWSKI H. K., RITCH R. H., NORTON W. T., RAPIN I., GARTNER L. M., Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science*, **182**: 62-64, 1973.
- [38] GOLDFISCHER S., REDDY J. K., Peroxisomes (microbodies) in cell pathology, *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **26**: 45-84, 1984.
- [39] GOLDMAN B. M., BLOBEL G., Biogenesis of peroxisomes: intracellular site of synthesis of catalase and uricase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **75**: 5066-5070, 1978.
- [40] GORGAS K., Peroxisomes in sebaceous glands. V. Complex peroxisomes in the mouse preputial gland: Serial sectioning and three-dimensional reconstruction studies. *Anat. Embryol.*, **169**: 261-270, 1984.
- [41] - Serial section analysis of mouse hepatic peroxisomes, *Anat. Embryol.*, **172**: 21-32, 1985.
- [42] - Morphogenesis of peroxisomes in lipid-synthesizing epithelia. [w] *Peroxisomes in Biology and Medicine*, red. H. D. Fahimi, H. Sies, Springer, Berlin-Heidelberg 1987, 3-17.
- [43] GORGAS K., VÖLKL A., Peroxisomes in sebaceous glands. IV. Aggregates of tubular peroxisomes in the mouse Meibomian gland, *Histochem. J.*, **16**: 1079-1098, 1984.
- [44] GORGAS K., ZAAR K., Peroxisomes in sebaceous glands. III. Morphological similarities of peroxisomes with smooth endoplasmic reticulum and Golgi stacks in the circumanal gland of the dog, *Anat. Embryol.*, **169**: 9-20, 1984.

- [45] GOULD S. J., KELLER G. A., SUBRAMANI S., Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase, *J. Cell Biol.*, **105**: 2923–2931, 1987.
- [46] HAGEY L. R., KRISANS S. K., Degradation of cholesterol to propionic acid by rat liver peroxisomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**: 834–841, 1982.
- [47] HAGVE T.-A., CHRISTOPHERSEN B. O., Evidence for peroxisomal retroconversion of adrenic acid [22:4(n–6)] and doxohexaenoic acid [22:6(n–3)] in isolated liver cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **875**: 165–173, 1986.
- [48] HAJRA A. K., BISHOP J. E., Glycerolipid synthesis in peroxisomes via the acyl dihydroxyacetone phosphate pathway, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **386**: 170–182, 1982.
- [49] HAJRA A. K., BURKE C. L., JONES C. L., Subcellular localization of acyl coenzyme A: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase in rat liver peroxisomes (microbodies), *J. Biol. Chem.*, **254**: 10896–10900, 1979.
- [50] HAMILTON G. A., AFEFY H. Y., AL-ARAB M. M., BRUSH E. J., BUCKTHAL D. J., BURNS C. L., HARRIS R. K., IBRAHIM D. A., KISELICA S. G., LAW W. A., RYALL R. P., SKORCZYŃSKI S. S., VENKATESAN P. P., Peroxisomal oxidase and their probable role in controlling animal metabolism, [w] *Peroxisomes in Biology and Medicine*, red. H. D. Fahimi, H. Sies, Springer, Berlin–Heidelberg 1987, 223–233.
- [51] HAND R. A., Cytochemical detection of peroxisomal oxidases, *J. Histochem. Cytochem.*, **27**: 1367–1370, 1979.
- [52] HARTL F.-U., JUST W. W., KÖSTER A., SCHIMASSEK H., Improved isolation and purification of rat liver peroxisomes by combined rate zonal and equilibrium centrifugation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **237**: 124–134, 1985.
- [53] HASHIMOTO T., Individual peroxisomal β -oxidation enzymes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **386**: 5–12, 1982.
- [54] HASHIMOTO T., KUWABARA T., USUDA N., NAGATA T., Purification of membrane polypeptides of rat liver peroxisomes, *J. Biochem.*, **100**: 301–310, 1986.
- [55] HAYASHI H., HASHIMOTO F., NAKATA K., Effect of high cholesterol diet on rat liver peroxisomal enzymes, *Chem. Pharmacol. Bull.*, **34**: 3964, 1986.
- [56] HAYASHI H., TAYA K., SUGA T., NIINOBE S., Studies on peroxisomes. VI. Relationship between the peroxisomal core and urate oxidase, *J. Biochem.*, **79**: 1029–1034, 1976.
- [57] HERTZ R., BAR-TANA J., Prevention of peroxisomal proliferation by carnitine palmitoyltransferase inhibitors in cultured rat hepatocytes, *Biochem. J.*, **245**: 387–392, 1987.
- [58] HESS R., STAUBLI W., RIESS W., Nature of the hepatomegalic effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat, *Nature*, **208**: 856–858, 1965.
- [59] HEYMANS H. S. A., SCHUTGENS R. B. H., TAN R., Van DEN BOSCH H., BORST P., Severe plasmalogen deficiency in tissues of infants without peroxisomes (Zellweger syndrome), *Nature*, **306**: 69–70, 1983.
- [60] HOLTTA E., Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: purification and properties of polyamine oxidase, *Biochemistry*, **16**: 91–100, 1977.
- [61] HRUBAN Z., RECHCIGL M., Microbodies and related particles: morphology, biochemistry and physiology, *Int. Rev. Cytol., Suppl.* **1**: 1–126, 1969.
- [62] HRUBAN Z., SWIFT H., RECHCIGL M., Fine structure of transplantable hepatomas in the rat, *J. Natl. Cancer Inst.*, **35**: 459–473, 1965.
- [63] HRYB D. J., Peroxisomal respiration and energy conservation. Possible relationships between heat production, thermosmosis and conformational changes, *FEBS Lett.*, **128**: 1–4, 1981.
- [64] IMANAKA T., SMALL G. M., LAZAROW P. B., Translocation of acyl-CoA oxidase into peroxisomes requires ATP hydrolysis but not a membrane potential, *J. Cell Biol.*, **105**: 2915–2922, 1987.
- [65] ISHII S., ISHII H., WATANABE T., SUGA T., Purification and properties of peroxisomal carnitine palmitoyltransferase in chick embryo liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **924**: 530–542, 1987.

- [66] KALMBACH P., FAHIMI H. D., Peroxisomes: identification in freeze-etch preparations of rat kidney, *Cell Biol. Int. Rep.*, **2**: 389–396, 1978.
- [67] KAMPSCHMIDT R. F., Mechanism of liver catalase depression in tumor-bearing animals, *Cancer Res.*, **25**: 34–45, 1965.
- [68] KÄRKKI T., HAKKOLA E., HASSINEN I. E., HILTUNEN J. K., β -oxidation of polyunsaturated fatty acids in peroxisomes. Subcellular distribution of Δ^3, Δ^2 -enoyl-CoA isomerase activity in rat liver, *FEBS Lett.*, **215**: 228–232, 1987.
- [69] KARTENBECK J., FRANKE W. W., Membrane relationships between endoplasmic reticulum and peroxisomes in rat hepatocytes and Morris hepatoma cells, *Cytobiol.*, **10**: 152–156, 1974.
- [70] KASE B. F., BJÖRKHEM I., PEDERSEN J. I., Formation of cholic acid from $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholestanoic acid by rat liver peroxisomes, *J. Lipid Res.*, **24**: 1560–1567, 1983.
- [71] KASE B. F., PRYDZ K., BJÖRKHEM I., PEDERSEN J. I., Conjugation of cholic acid with taurine and glycine by rat liver peroxisomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **138**: 167–173, 1986.
- [72] – In vitro formation of bile acids from di- and trihydroxy- 5β -cholestanoic acid in human liver peroxisomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **877**: 37–42, 1986.
- [73] KELLER G.-A., BARTON M. C., SHAPIRO D. J., SINGER S. J., 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase is present in peroxisomes in normal rat liver cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **82**: 770–774, 1985.
- [74] KELLER G.-A., GOULD S., DELUCA M., SUBRAMANI S., Firefly luciferase is targeted to peroxisomes in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **84**: 3264–3268, 1987.
- [75] KELLER G.-A., PAZIRANDEH M., KRISANS S., 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver peroxisomes and microsomes of control and cholestyramine-treated animals: quantitative biochemical and immunoelectron microscopical analyses, *J. Cell Biol.*, **103**: 875–886, 1986.
- [76] KHANNA J. M., ISRAEL Y., Ethanol metabolism, [w] *Liver and Biliary Tract Physiology*, red. N. B. Javitt, University Park Press, Baltimore 1980, 275–315.
- [77] KOLLATUKUDY P. E., BOHNET S., ROBERTS E., ROGERS L., Peroxisomes in sebaceous glands: biosynthetic role and hormonal regulation, [w] *Peroxisomes in Biology and Medicine*, red. H. D. Fahimi, H. Sies, Springer, Berlin–Heidelberg 1987, 18–31.
- [78] KONDRUP J., LAZAROW P. B., Peroxisomal beta-oxidation in intact rat hepatocytes: quantitation of its flux, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **386**: 404–405, 1982.
- [79] KÖSTER A., HEISIG M., HEINRICH P. C., JUST W. W., In vitro synthesis of peroxisomal membrane polypeptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **137**: 626–632, 1986.
- [80] KRISANS S., MORTENSEN R. M., LAZAROW P. B., Acyl-CoA synthetase in rat liver peroxisomes. Computer-assisted analysis of cell fractionation experiments, *J. Biol. Chem.*, **255**: 9599–9607, 1980.
- [81] KRISANS S., PAZIRANDEH M., RUSNAK M., KELLER G.-A., Characterization of peroxisomal HMG-CoA reductase activity, *Fed. Proc.*, **45**: 361, 1986.
- [82] KRISANS S. K., THOMPSON S. L., PENA L. A., KOK E., JAVITT N. B., Bile acid synthesis by rat liver peroxisomes: metabolism of 26-hydroxycholesterol to 3β -hydroxy-5-choleonoic acid, *J. Lipid Res.*, **26**: 1324–1332, 1985.
- [83] LABARCA P., WOLFF D., SOTO U., NECOCHEA C., LEIGHTON C., Large cation-selective pores from rat liver peroxisomal membranes incorporated to planar lipid bilayers, *J. Membrane Biol.*, **94**: 285–291, 1986.
- [84] LAZAROW P. B., Rat liver peroxisomes catalyze the β -oxidation of fatty acids, *J. Biol. Chem.*, **253**: 1522–1528, 1978.
- [85] LAZAROW P. B., De DUVE C., The synthesis and turnover of rat liver peroxisomes. V. Intracellular pathway of catalase synthesis, *J. Cell Biol.*, **59**: 507–524, 1973.

- [86] — A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes: enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **73**: 2043–2046, 1976.
- [87] LAZAROW P. B., FUJIKI Y., Biogenesis of peroxisomes, *Ann. Rev. Cell Biol.*, **1**: 489–550, 1985.
- [88] LAZAROW P. B., FUJIKI Y., SMALL G. M., WATKINS P., MOSER H., Presence of the peroxisomal 22 kDa integral membrane protein in the liver of a person lacking recognizable peroxisomes (Zellweger syndrome), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **83**: 9193–9196, 1986.
- [89] LAZAROW P. B., ROBBI M., FUJIKI Y., WONG L., Biogenesis of peroxisomal proteins in vivo and in vitro, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **386**: 285–300, 1982.
- [90] LAZAROW P. B., SHIO H., ROBBI M., Biogenesis of peroxisomes and the peroxisome reticulum hypothesis, [w] *Biological Chemistry of Organelle Formation*, red. T. Bucher, W. Sebald, H. Weiss, Springer, New York 1981, 187–206.
- [91] LAZAROW P. B., SMALL G. M., IMANAKA T., SHIO H., ALEXSON S., MORTENSEN R. M., RACHUBINSKI R. A., FUJIKI Y., Biogenesis of peroxisomes in rat liver and *Candida tropicalis*, [w] *Peroxisomes in Biology and Medicine*, red. H. D. Fahimi, H. Sies, Springer, Berlin–Heidelberg 1987, 394–401.
- [92] LEDUC E. H., Changes in fine structure of the mouse liver induced by ectromelia virus, *Anat. Rec.*, **136**: 230–235, 1960.
- [93] LEIGHTON F., COLOMA L., KOENIG C., Structure, composition, physical properties and turnover of proliferated peroxisomes. A study of the trophic effect of Su-13437 on rat liver, *J. Cell Biol.*, **67**: 281–309, 1975.
- [94] LEIGHTON F., POOLE F., BEAUFAY H., BAUDHUIN P., COFFEY J. W., FOWLER S., De DUVE C., The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria and lysosomes from the livers of rats injected with Triton WR-1339, *J. Cell Biol.*, **37**: 482–513, 1968.
- [95] LITWIN J. A., VÖLKL A., MÜLLER-HÖCKER J., HASHIMOTO T., FAHIMI H. D., Immunocytochemical localization of peroxisomal enzymes in human liver biopsies, *Am. J. Pathol.*, **128**: 141–150, 1987.
- [96] LITWIN J. A., YOKOTA S., HASHIMOTO T., FAHIMI H. D., Light microscopic immunocytochemical demonstration of peroxisomal enzymes in epon sections, *Histochemistry*, **81**: 15–22, 1984.
- [97] LOUD A. V., A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells, *J. Cell Biol.*, **37**: 27–46, 1968.
- [98] MANGOLD H. K., PAULTAUF F., *Ether Lipids: Biochemical and Biomedical Aspects*, Academic Press, New York 1983.
- [99] MANNAERTS G. P., DEBEER L. J., THOMAS J., De SCHEPPER P. J., Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate-treated rats. *J. Biol. Chem.*, **254**: 4585–4595, 1979.
- [100] MANNAERTS G. P., Van VELDHoven P. P., Van BROEKHOVEN A., VANDERBROEK C., DEEBER L. J., Evidence that peroxisomal acyl-CoA synthetase is located at the cytoplasmic side of the peroxisomal membrane, *Biochem. J.*, **204**: 17–23, 1982.
- [101] MARKWELL M. A. K., Mc GROARTY E. J., BIEBER L. L., TOLBERT N. E., The subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney: A new peroxisomal enzyme. *J. Biol. Chem.*, **248**: 3426–3432, 1973.
- [102] MASTERS C., Peroxisomes, proliferation and the synthesis of phospholipids, [w] *Peroxisomes in Biology and Medicine*, red. H. D. Fahimi, H. Sies. Springer, Berlin–Heidelberg 1987, 78–88.
- [103] MILTON M. N., ELCOMBE C. R., KASS G. E. N., GIBSON G. G., Lack of evidence for a hepatic peroxisome proliferator receptor and an explanation for the binding of hypolipidaemic drug to liver homogenates, *Biochem. Pharmacol.*, **37**: 793–798, 1988.
- [104] MIURA S., MORI M., TAKIGUCHI M., TATIBANA M., FURUTA S., MIYAZAWA

- S., HASHIMOTO T., Biosynthesis and intracellular transport of enzymes of peroxisomal β -oxidation, *J. Biol. Chem.*, **259**: 6397–6402, 1984.
- [105] MIYAZAWA S., OSAZA H., OSUMI T., HASHIMOTO T., Purification and properties of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase from rat liver, *J. Biochem.*, **94**: 529–542, 1983.
- [106] MIYAZAWA S., OSUMI T., HASHIMOTO T., The presence of a new 3-oxoacyl-CoA thiolase in rat liver peroxisomes, *Eur. J. Biochem.*, **103**: 589–596, 1980.
- [107] MOCHIZUKI Y., An electron microscope study on hepatocyte microbodies of mice bearing Ehrlich ascites tumor, *Tumor Res.*, **3**: 1–33, 1968.
- [108] MORTENSEN P. B., GREGERSEN N., RASMUSSEN K., The β -oxidation of dicarboxylic acids in isolated mitochondria and peroxisomes, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **6**, Suppl. 2: 123–124, 1983.
- [109] MOSEK H. W., New approaches in peroxisomal disorders, *Dev. Neurosci.*, **9**: 1–18, 1987.
- [110] NAKAMURA M., A processing aspect of peroxisomes by high voltage electron microscopy, [w] *International Cell Biology*, red. S. Seno, Y. Okada, Academic Press Japan, Tokyo 1984, 282.
- [111] NAKATANI T., KAWASAKI Y., MINATOGAWA Y., OKUNO E., KIDO R., Peroxisome localized human hepatic alanine-glyoxylate aminotransferase and its application to clinical diagnosis, *Clin. Biochem.*, **18**: 311–316, 1985.
- [112] NEAT C. E., THOMASSEN M. S., OSMUNDSEN H., Effect of high fat diets on hepatic fatty acid oxidation in the rat. Isolation of rat liver peroxisomes by vertical-rotor centrifugation and by using a self-generated, iso-osmotic Percoll gradient, *Biochem. J.*, **196**: 149–159, 1981.
- [113] NEDERGAARD J., ALEXSON S., CANNON B., Cold adaptation in the rat: increased brown fat peroxisomal beta-oxidation relative to maximal mitochondrial oxidative capacity, *Am. J. Physiol.*, **293**: C 208–216, 1980.
- [114] NOGUCHI T., Amino acid metabolism in mammalian peroxisomes, [w] *Peroxisomes in Biology and Medicine*, red. H. D. Fahimi, H. Sies, Springer, Berlin–Heidelberg 1987, 234–243.
- [115] NOGUCHI T., FUJIWARA S., Identification of mammalian aminotransferases utilizing glyoxylate or pyruvate as amino acceptor. Peroxisomal and mitochondrial asparagine aminotransferase, *J. Biol. Chem.*, **263**: 182–186, 1988.
- [116] NOGUCHI T., MINATOGAWA Y., TAKADA Y., OKUNO E., KIDO R., Subcellular distribution of pyruvate (glyoxylate) aminotransferases in rat liver, *Biochem. J.*, **170**: 173–175, 1978.
- [117] NOGUCHI T., OKUNO E., TAKADA Y., MINATOGAWA Y., OKAI K., KIDO R., Characteristics of hepatic alanine-glyoxylate aminotransferase in different mammalian species, *Biochem. J.*, **169**: 113–122, 1978.
- [118] NOGUCHI T., TAKADA Y., FUJIWARA S., Degradation of uric acid to urea and glyoxylate in peroxisomes, *J. Biol. Chem.*, **254**: 5272–5275, 1979.
- [119] NOVIKOFF A. B., NOVIKOFF P. M., DAVIS C., QUINTANA N., Studies on microperoxisomes. II. A cytochemical method for light and electron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, **20**: 1006–1023, 1972.
- [120] – Studies on microperoxisomes. V. Are microperoxisomes ubiquitous in mammalian cells?, *J. Histochem. Cytochem.*, **21**: 737–755, 1973.
- [121] – Studies on microperoxisomes. III. Observations on human and rat hepatocytes, *J. Histochem. Cytochem.*, **21**: 540–558, 1973.
- [122] ODA T., YANAGISAWA M., ICHIYAMA A., Induction of serine: pyruvate aminotransferase in rat liver organelles by glucagon and high protein diet, *J. Biochem.*, **91**: 219–232, 1982.

- [123] OHNO S., Peroxisomes of the kidney, *Int. Rev. Cytol.*, **95**: 131–162, 1985.
- [124] OHNUMA T., MALDIA G., HOLLAND J. F., Hepatic catalase activity in advanced human cancer, *Cancer Res.*, **26**: 1806–1818, 1966.
- [125] OSUMI T., HASHIMOTO T., UI N., Purification and properties of acyl-CoA oxidase from rat liver, *J. Biochem.*, **87**: 1735–1746, 1980.
- [126] OSUMI T., HIJIKATA M., ISHII N., MIYAZAWA S., HASHIMOTO T., Cloning and structural analysis of the genes for peroxisomal β -oxidation enzymes, [w] *Peroxisomes in Biology and Medicine*, red. H. D. Fahimi, H. Sies, Springer, Berlin–Heidelberg 1987, 105–114.
- [127] PARTHASARATHY S., KRITCHEVSKY D., BAUMANN W. J., Hypolipidemic drugs are inhibitors of phosphatidylcholine synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **79**: 6890–6893, 1982.
- [128] PATAL B. N., MACKNESS M. I., CONNOCK M. J., Peroxisomal localization of glucose-6-phosphate dehydrogenase and pyrophosphate-stimulated dihydroxyacetone phosphate acyltransferase in mouse kidney, *Biochem. J.*, **244**: 443–448, 1987.
- [129] PEDERSEN J. I., KASE B. F., PRYDZ K., BJÖRKHEM I., Liver peroxisomes and bile acid formation, [w] *Peroxisomes in Biology and Medicine*, red. H. D. Fahimi, H. Sies, Springer, Berlin–Heidelberg 1987, 67–77.
- [130] POLL-THE B. T., ROELS F., OGIER H., SCOTTO J., VAMECQ J., SCHUTGENS R. B. H., WANDERS R. J. A., Van ROERMUND C. W. T., Van WIJLAND M. J. A., SCHRAM A. W., TAGER J. M., SAUDUBRAY J. M., A new peroxisomal disorder with enlarged peroxisomes and a specific deficiency of acyl-CoA oxidase (pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy), *Am. J. Human Genet.*, **42**: 422–434, 1988.
- [131] POOLE B., The kinetics of disappearance of labeled leucine from the free leucine pool of rat liver and its effect on the apparent turnover of catalase and other hepatic proteins, *J. Biol. Chem.*, **246**: 6587–6591, 1971.
- [132] POOLE B., HIGASHI T., De DUVE C., The synthesis and turnover of rat liver peroxisomes. III. The size distribution of peroxisomes and the incorporation of new catalase, *J. Cell Biol.*, **45**: 408–415, 1970.
- [133] PRICE V. E., STERLING W. R., TARANTOLA V. A., HARTLEY R. W., RECHCIGL M., The kinetics of catalase synthesis and destruction in vivo, *J. Biol. Chem.*, **237**: 3468–3475, 1962.
- [134] PRYDZ K., KASE B. F., BJÖRKHEM I., PEDERSEN J. I., Formation of chenodeoxycholic acid from 3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholestanic acid by rat liver peroxisomes, *J. Lipid Res.*, **27**: 622–628, 1986.
- [135] RABERT U., VÖLKL A., DEBUCH H., Distribution of alkylglycerone-phosphate synthase in subcellular fractions of rat liver, *Hoppe-Seyler Biol. Chem.*, **367**: 215–222, 1986.
- [136] RACHUBINSKI R. A., FUJIKI Y., MORTENSEN R. M., LAZAROW P. B., Acyl-CoA oxidase and hydratase-dehydrogenase, two enzymes of the peroxisomal β -oxidation system, are synthesized on free polysomes of clofibrate-treated rat liver, *J. Cell. Biol.*, **99**: 2241–2246, 1984.
- [137] REDDY J. K., GOEL S. K., NEMALI M. R., CARRINO J. J., LAFFLER T. G., REDDY M. K., SPERBECK S. J., OSUMI T., HASHIMOTO T., LALWANI N. D., RAO M. S., Transcriptional regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **83**: 1747–1751, 1986.
- [138] REDDY J. K., LALWANI N. D., Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **12**: 1–58, 1983.
- [139] REDDY J. K., RAO M. S., LALWANI N. D., REDDY M. K., NEMALI M. R.,

- ALVARES K., Induction of hepatic peroxisome proliferation by xenobiotics, [w] *Peroxisomes in Biology and Medicine*, red. H. D. Fahimi, H. Sies, Springer, Berlin—Heidelberg 1987, 255–272.
- [140] REDDY J. K., SVOBODA D., Microbodies in experimentally altered cells. VIII. Continuities between microbodies and their possible biological significance, *Lab. Invest.*, **24**: 74–81, 1971.
- [141] — Further evidence that microbodies do not exist as individual entities, *Am. J. Pathol.*, **70**: 421–432, 1973.
- [142] REDDY J. K., WARREN J. R., REDDY M. K., LALWANI N. D., Hepatic and renal effects of peroxisome proliferators. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **386**: 81–110, 1982.
- [143] RHODIN J., Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney, Doctoral Dissertation, Karolinska Institute, 1954.
- [144] RIGATUSO J. L., LEGG P. G., WOOD R. L., Microbody formation in regenerating rat liver, *J. Histochem. Cytochem.*, **18**: 893–900, 1970.
- [145] RODRICKS J. V., TURNBULL D., Interspecies differences in peroxisomes and peroxisome proliferation, *Toxicol. Industr. Health*, **3**: 197–212, 1987.
- [146] ROELS F., GOLDFISCHER S., Cytochemistry of human catalase. The demonstration of hepatic and renal peroxisomes by a high temperature procedure, *J. Histochem. Cytochem.*, **27**: 1471–1477, 1979.
- [147] ROELS F., PAUWELS M., CORNELIS A., KERCKAERT I., Van der SPEK P., GOOVAERTS G., VERSIECK J., GOLDFISCHER S., Peroxisomes (microbodies) in human liver: cytochemical and quantitative studies of 85 biopsies, *J. Histochem. Cytochem.*, **31**: 235–237, 1983.
- [148] ROULLIER C., BERNHARD W., „Microbodies” and the problem of mitochondrial regeneration of liver cells, *J. Biophys. Biochem. Cytol., Suppl.* **2**: 355–359, 1956.
- [149] SANTOS M. J., IMANAKA T., SHIO H., SMALL G. M., LAZAROW P. B., Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome – aberrant organelle, *Science* **239**: 1536–1538, 1988.
- [150] SCHAFFNER F., Intralobular changes in hepatocytes and the electron microscopic mesenchymal response in acute viral hepatitis, *Medicine*, **45**: 547–552, 1966.
- [151] SCHUTGENS R. B. H., HEYMANS H. S. A., WANDERS R. J. A., Van den BOSCH H., TAGER J. M., Proxisomal disorders: a newly recognized group of genetic diseases, *Eur. J. Pediat.*, **144**: 430–440, 1986.
- [152] SCORIN C., SOTO U., NECOCHEA C., LEIGHTON F., Protein phosphorylation in peroxisomes, *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **140**: 188–194, 1986.
- [153] SCOTT P. J., VISENTIN L. P., ALLEN J. M., Enzymatic characteristics of peroxisomes of amphibian and avian liver and kidney, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **168**: 244–264, 1969.
- [154] SHEPERS L., CASTEELS M., VAMECO J., PARMENTIER G., Van VELDHOVEN P., MANNAERTS G. P., β -oxidation of the carboxyl side chain of prostaglandin E_2 in rat liver peroxisomes and mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **263**: 2724–2731, 1988.
- [155] SHIO H., LAZAROW P. B., Relationship between peroxisomes and endoplasmic reticulum investigated by combined catalase and glucose-6-phosphatase cytochemistry, *J. Histochem. Cytochem.*, **29**: 1263–1272, 1981.
- [156] SINGH H., DERWAS N., POULOS A., Very long chain fatty acid β -oxidation by subcellular fractions of normal and Zellweger syndrome skin fibroblasts, *Arch. Biochem. Biophys.*, **257**: 302–314, 1987.
- [157] SINGH I., MOSER A. E., GOLDFISCHER S., MOSER H. W., Lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: Implications for the Zellweger cerebro-hepato-renal syndrome and adrenoleukodystrophy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**: 4203–4207, 1984.

- [158] SMALL G. M., HOCKING T. J., STURDEE A. P., BURDETT K., CONNOCK M. J., Enhancement by dietary clofibrate of peroxisomal palmitoyl-CoA oxidase in kidney and small intestine of albino mice and liver of genetically lean and obese mice, *Life Sci.*, **28**: 1875–1882, 1981.
- [159] SMALL G. M., LAZAROW P. B., Import of the carboxy-terminal portion of acyl-CoA oxidase into peroxisomes of *Candida tropicalis*, *J. Cell Biol.*, **105**: 247–250, 1987.
- [160] STARKE P. E., FERBER J. L., Endogenous defenses against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, **260**: 86–92, 1985.
- [161] STERNLIEB I., Evolution of the hepatic lesion in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration), [w] *Progress in Liver Diseases*, Vol IV, red. H. Popper, F. Schaffner, Grune and Stratton, New York 1972, 511–525.
- [162] STERNLIEB I., QUINTANA N., The peroxisomes of human hepatocytes, *Lab. Invest.*, **36**: 140–149, 1977.
- [163] SUZUKI Y., ORII T., HASHIMOTO T., Biosynthesis of peroxisomal β -oxidation enzymes in infants with Zellweger syndrome, *J. Inher. Metab. Dis.*, **9**: 292–296, 1986.
- [164] SUZUKI Y., ORII T., TAKIGUCHI M., MORI M., HIJIKATA M., HASHIMOTO T., Biosynthesis of membrane polypeptides of rat liver peroxisomes, *J. Biochem.*, **101**: 491–496, 1987.
- [165] SUZUKI Y., SHIMOZAWA N., ORII T., AIKAWA J., TADA K., KUWABARA T., HASHIMOTO T., Biosynthesis of peroxisomal membrane polypeptides in infants with Zellweger syndrome, *J. Inher. Metab. Dis.*, **10**: 297–300, 1987.
- [166] SVOBODA D. J., REDDY J. K., Pathology of the liver in Reye's syndrome, *Lab. Invest.*, **32**: 571–579, 1975.
- [167] TAGER J. M., Van der BEEK W. A. T. H., WANDERS R. J. A., HASHIMOTO T., HEYMANS H. S. A., Van den BOSCH H., SCHUTGENS R. B. H., SCHRAM A. W., Peroxisomal β -oxidation enzyme proteins in the Zellweger syndrome, *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **126**: 1269–1275, 1985.
- [168] TAKADA Y., NOGUCHI T., Increase in hepatic pyruvate (glyoxylate) aminotransferase activity on administration of clofibrate to the rat, *Biochem. Pharmacol.*, **30**: 393–394, 1981.
- [169] THOMPSON S. L., BURROWS R., LAUB R. J., KRISANS S. K., Cholesterol synthesis in rat liver peroxisomes. Conversion of mevalonic acid to cholesterol, *J. Biol. Chem.*, **262**: 17420–17425, 1987.
- [170] TSUKADA H., MOCHIZUKI Y., FUJIWARA S., The nucleoids of rat liver microbodies. Fine structure and enzymes, *J. Cell Biol.*, **28**: 449–460, 1966.
- [171] TSUKADA H., MOCHIZUKI Y., KONISHI T., Morphogenesis and development of microbodies of hepatocytes of rats during pre- and postnatal growth. *J. Cell Biol.*, **37**: 231–243, 1968.
- [172] USUDA N., YOKOTA S., HASHIMOTO T., NAGATA T., Immunocytochemical localization of D-amino acid oxidase in the central clear matrix of rat kidney peroxisomes, *J. Histochem. Cytochem.*, **34**: 1709–1718, 1986.
- [173] VAMECO J., De HOFFMAN E., Van HOOFF F., Mitochondrial and peroxisomal metabolism of glutaryl-CoA, *Eur. J. Biochem.*, **146**: 663–669, 1985.
- [174] Van AMERONGEN A., HELMS J. B., Van der KRIFT T. P., SCHUTGENS R. B. H., WIRTZ K. W. A., Purification of nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) from human liver and its deficiency in livers from patients with cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome, *Biochim. Biophys. Acta*, **919**: 149–155, 1987.
- [175] Van VELDHOFEN P. P., DEBEER L. J., MANNAERTS G. P., Water- and solute-accessible spaces of purified peroxisomes. Evidence that peroxisomes are permeable to NAD^+ , *Biochem. J.*, **210**: 685–693, 1983.
- [176] Van VELDHOFEN P. P., JUST W. W., MANNAERTS G. P., Permeability of the peroxisomal membrane to cofactors of β -oxidation. Evidence for the presence of a pore-forming protein, *J. Biol. Chem.*, **262**: 4310–4318, 1987.

- [177] Van VELDHoven P. P., MANNAERTS G. P., Coenzyme A in purified peroxisomes is not freely soluble in the matrix but firmly bound to a matrix protein, *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **139**: 1195–1201, 1986.
- [178] VEERKAMP J. H., Van MOERKERK H. T. B., Peroxisomal fatty acid oxidation in rat and human tissues. Effect of nutritional state, clofibrate treatment and postnatal development in the rat, *Biochim. Biophys. Acta.*, **875**: 301–310, 1986.
- [179] VÖLKL A., FAHIMI H. D., Isolation and characterization of peroxisomes from the liver of normal untreated rats. *Eur. J. Biochem.*, **149**: 257–267, 1985.
- [180] WAECHTER F., BENTLEY P., BIERI F., STAUBLI W., VÖLKL A., FAHIMI H. D., Epoxide hydrolase activity in isolated peroxisomes of mouse liver, *FEBS Lett.*, **158**: 225–228, 1983.
- [181] WANDERS R. J. A., KOS M., ROEST B., MEIJER A. J., SCHRAKAMP G., HEYMANS H. S. A., TEGELAERS W. H. H., Van den BOSCH H., SCHUTGENS R. B. H., TAGER J. M., Activity of peroxisomal enzymes and intracellular distribution of catalase in Zellweger syndrome, *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **123**: 1054–1061, 1984.
- [182] WEDEL F. P., BERGER E. P., On the quantitative stereo-morphology of microbodies in rat hepatocytes, *J. Ultrastruct. Res.*, **51**: 153–165, 1975.
- [183] WITTRIN G., HORSTMANN H. G., HUNGER J., SCHNIEDER G., The determination of catalase activity in liver tissue, *Klin. Wochenschr.*, **53**: 723–725, 1975.
- [184] YAMADA J., HORIE S., WATANABE T., SUGA T., Participation of peroxisomal beta-oxidation system in the chain-shortening of a xenobiotic acyl compound, *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **125**: 123–128, 1984.
- [185] YAMAMOTO K., FAHIMI H. D., Biogenesis of peroxisomes in regenerating rat liver. I. Sequential changes of catalase and urate oxidase detected by ultrastructural cytochemistry, *Eur. J. Cell Biol.*, **43**: 293–300, 1987.
- [186] — Three-dimensional reconstruction of a peroxisomal reticulum in regenerating rat liver: evidence of interconnections between heterogenous segments, *J. Cell Biol.*, **105**: 713–722, 1987.
- [187] YANG S.-Y., CUEBAS D., SCHULZ H., 3-hydroxyacyl-CoA epimerases of rat liver peroxisomes and *Escherichia coli* function as auxillary enzymes in the β -oxidation of polyunsaturated fatty acids, *J. Biol. Chem.*, **261**: 12238–12243, 1986.
- [188] ZAAR K., ANGERMULLER S., VOLKL A., FAHIMI H. D., Pipecolic acid is oxidized by renal and hepatic peroxisomes. Implications for Zellweger's cerebro-hepato-renal syndrome (CHRS), *Exp. Cell Res.*, **164**: 267–271, 1986.
- [189] ZAAR K., GORGAS K., Peroxisome-endoplasmic reticulum aggregates in the duck uropygial gland, *Eur. J. Cell Biol.*, **38**: 322–327, 1985.
- [190] ZAAR K., HARTING F., FAHIMI H. D., GORGAS K., Peroxisome aggregates forming large stacks in the lipid segment of the canine kidney, *Acta Histochem., Suppl.*, **29**: 165–168, 1984.
- [191] ZAAR K., VOLKL A., FAHIMI H. D., Isolation and characterization of peroxisomes from the renal cortex of beef, sheep and cat, *Eur. J. Cell Biol.*, **40**: 16–24, 1986.
- [192] — Association of isolated bovine kidney cortex peroxisomes with endoplasmic reticulum, *Biochim. Biophys. Acta*, **897**: 135–142, 1987.
- [193] ZOELLER R. A., RAETZ C. R. H., Isolation of animal cell mutants deficient in plasmalogen biosynthesis and peroxisome assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **83**: 5170–5173, 1986.
- [194] ZURZYCKI J., Perokysomy: ich struktura i funkcje metaboliczne, *Post. Biol. Kom.*, **1**: 143–161, 1974.

Otrzymano: 3 sierpnia 1988.

Przyjęto: 1 września 1988.

Adres autora: ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków.

BUDOWA I BIOLOGICZNA ROLA MATRIKS JĄDROWEJ***STRUCTURE AND BIOLOGICAL ROLE OF NUCLEAR MATRIX**

Zofia KILIAŃSKA

Zakład Cytobiochemii, Instytut Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie. Artykuł jest przeglądem danych na temat metod izolowania, ultrastruktury i składu chemicznego matriks jądrowej. Przedstawiono w nim doniesienia dotyczące biologicznej roli tej istotnej struktury jąder komórkowych, przede wszystkim związane z organizacją przestrzenną cząsteczek DNA, ich replikacją i transkrypcją.

Abstract. This article reviews work on the isolation, ultrastructure and chemical composition of the nuclear matrix. It presents the data concerning biological role of this important structure of the cell nuclei, especially for the spatial organization of DNA molecules, their replication and transcription.

Wykaz stosowanych skrótów

cAMP – cykliczny adenzynomonofosforan,
cDNA – komplementarny DNA,
DNA-aza – deoksyrybonukleaza,
EDTA – etylenodiaminotetraoctan,
kpz – kilo par zasad,
LIS – 3,5-dijodosalicylan litu,
m. cz. – masa cząsteczkowa,
NaTT – tetratonian sodu,
pI – punkt izoelektryczny,
PMSF – fluorek fenylometanosulfonowy,
RNA-aza – rybonukleaza,
hnRNA – niejednorodny jądrowy RNA,
rRNA – rybosomalny RNA,

* Referat wygłoszony na III Ogólnopolskiej Konferencji Biologii Komórki, Łódź, 4-5 lipca 1988 r.

Praca wykonana w ramach CPBR 11.5.

snRNA – niskocząsteczkowy jądrowy RNA,

U(1...6)RNA – urydylowe(1...6)RNA,

RNP – rybonukleoproteiny,

SDS – siarczan dodecyłu sodu

WSTĘP

Sposób upakowania długich cząsteczek DNA wewnątrz niewielkiej objętości jąder komórkowych stanowi wciąż fundamentalny problem biologii molekularnej. Organizacja przestrzenna DNA, wymagająca istotnego skrócenia jego długości, musi zabezpieczać podstawowe funkcje związane z jego ekspresją i replikacją. Z badań prowadzonych w ostatnim dziesięcioleciu wynika, że rolę tę w dużym stopniu sprawują tzw. struktury szkieletowe jądra komórkowego [2, 53, 58, 59, 90, 113, 117, 150, 156]. Ten strukturalny zrąb jądra nazywany jest: matriks, macierzą [10, 150, por. 77], interfazowym szkieletem jądra [58, 59, 96, 124] lub w nomenklaturze angielskiej „nuclear cage” [32, 67, 93]. Obecnie lansuje się pogląd, że struktury szkieletowe chromosomów mitotycznych (ang. scaffold; [2, 3, 113] powstają w wyniku przeorganizowania znacznej części białek matriks jąder komórek interfazowych [84, 85, 123, 124].

Pionierskie badania struktur jądrowych o charakterze niechromatynowym pochodzą z lat czterdziestych. W 1942 r. Mayer i Gulick [92], a rok później Dounce [37] wykazali obecność białek jądrowych nierozpuszczalnych w buforach o wysokiej sile jonowej ($> 1M$). Mirsky i Ris [98] wydzielili tzw. resztkowe chromosomy z jąder komórek grasicy cielęcia, po ich wyczerpującej ekstrakcji 0,14 i 2,0M roztworami NaCl. Na przełomie lat pięćdziesiątych pojawiły się pierwsze analizy tak traktowanych jąder komórkowych, dodatkowo trawionych nukleazami, w mikroskopie elektronowym [54, 131, 137, 163]. Uzyskane struktury zachowywały kształt jąder, w których odnajdowano tzw. resztkowe jąderka oraz gąbczastą sieć rybonukleinową, rozpościerającą się od otoczki jądrowej do jąderek.

Termin matriks jądrowa wprowadzili Berezney i Coffey [10] w 1974 r. Określili oni matriks jako resztkową, „pozachromatynową” infrastrukturę jądra, odporną na działanie detergentów, nukleaz oraz wysokich stężeń soli [10, 17, 71]. W obrazie mikroskopowym jąder komórkowych matriks nie jest widoczna, gdyż maskują ją składniki chromatyny i nukleoplazmy. Matriks jądrową budują: warstwa peryferyczna, składająca się z blaszki (lamina) i porów otoczki jądrowej, oraz tzw. resztkowe struktury jąderkowe (matriks jąderkowa) połączone ze sobą przez wewnątrzjądrową sieć włóknisto-ziarnistą [12, 13, 16, 58, 74, 150].

1. METODY IZOLOWANIA MATRIKS JĄDROWEJ

Zasadą większości technik izolowania matriks są ekstrakcje jąder komórkowych niejonowymi detergentami oraz buforami zawierającymi wysokie stężenia NaCl w celu wymycia lipidów i histonów, a także trawienie enzymami nukleolitycznymi w celu usunięcia kwasów nukleinowych.

Klasyczna metoda wydzielenia matriks, zaproponowana przez Berezneya i Coffeya [10], obejmuje:

ekstrakcję jąder 10mM roztworem TrisCl (pH 7,4), zawierającym 0,2mM $MgCl_2$ (usunięcie ok. 75% DNA);

wymycie histonów za pomocą zbuforowanego 2M roztworu NaCl;

odlipidowanie pozostałości jądrowej zbuforowanym 1% roztworem Tritonu X-100;

trawienie tak traktowanych jąder nukleazami (DNA-aza I i RNA-aza; 200 $\mu g/ml$) w 10mM TrisCl (pH 7,4) zawierającym 5mM $MgCl_2$.

W ostatnich publikacjach z laboratorium Berezneya [16, 146] zastosowano modyfikację przedstawionej techniki, polegającą na eliminacji trawienia jąder egzogennymi nukleazami w końcowym etapie preparatyki. Natomiast trawienie, ale endogennymi nukleazami (37°C, 45 min), wprowadzono na początku procedury otrzymywania matriks.

W laboratorium Pogo [120] matriks wydziela się z jąder komórkowych po ich nukleolitycznym trawieniu DNA-azą I i RNA-azą A i odlipidowaniu Tritonem X-100. Większość białek jądrowych ekstrahuje się za pomocą mieszaniny polianionów: siarczan dekstranu – heparyna.

Poważnym zarzutem w stosunku do metod izolowania matriks jądrowej jest stosowanie wysokich stężeń NaCl (używanych zresztą do dzisiaj), z uwagi na możliwość powstawania artefaktów w postaci ślizgania się bądź percypitacji kompleksów replikacyjnych czy transkrypcyjnych, odnajdowanych w tej strukturze [78, 79, 97].

W metodzie opracowanej przez Longa i Ochsa [89], eliminującej ekstrakcję za pomocą wysokich stężeń NaCl oraz trawienie RNA-azą, jądra komórkowe w pierwszej kolejności pozbawia się lipidów przez przemycie zbuforowanymi roztworami Tritonu X-100 i saponiny, a następnie prowadzi się trawienie DNA-azą I w układzie zawierającym jony Mg^{2+} i Ca^{2+} . Pozostałość jądrową ekstrahuje się za pomocą 2mM roztworu EDTA w celu usunięcia chromatyny. Analiza mikroskopowa i biochemiczna tak otrzymanych struktur wykazała obecność blaszki i wewnątrzjądrowej sieci, bogatej w niejednorodny jądrowy RNA (hnRNA; 63%) i niskocząsteczkowy jądrowy RNA (snRNA; 74%). Sieć ta składa się z włókienek o średnicy 5–10 nm z przyczepionymi do nich ziarenkami o średnicy około 15 nm. Struktury otrzymane tą techniką nie zawierają resztkowych jąderek, co zapewne wynika z obecności w środowisku

EDTA i wiązania jonów dwuwartościowych podczas ich wydzielania. Z kolei ich inkubacja w roztworze zawierającym 2mM $MgCl_2$ pozwala na obserwację resztkowych jąderek, co świadczy o tym, że elementy odtwarzające je muszą być w nich obecne.

W laboratorium Laemmliego [97] opracowano ciekawą technikę izolowania matriks, wykorzystującą detergent 3,5-dijodosalicylan litu (LIS) do usunięcia histonów. Detergent ten działa podobnie jak siarczan dodecyłu sodu (SDS), z tą istotną różnicą, że z łatwością można go usunąć w toku preparatyki. Po ekstrakcji histonów, jądra odlipidowuje się digitoniną w obecności trasylołu, a pozostałość jądrową poddaje się trawieniu mieszaniną enzymów restrykcyjnych.

Ultrastruktura i skład chemiczny matriks jądrowej w znacznym stopniu zależą od procedury jej otrzymywania, tj. kolejności ekstrakcji jąder, sposobu usunięcia histonów (NaCl, LIS, siarczan amonu, polianiony: siarczan dekstranu-heparyna), stosowanych detergentów wymywających lipidy (dezoksychohan sodu, Nonidet NP-40, Triton X-100, Tween 40, saponina) oraz enzymów nukleolitycznych (DNA-aza I, mikrokokalna nukleaza, RNA-aza A, restryktazy), a także od obecności jonów dwuwartościowych. Istotne różnice w składzie matriks powodują: eliminacja w procedurze jej izolowania trawienia RNA-azą, blokowanie grup tiolowych oraz umożliwienie powstania wewnątrzcząsteczkowych połączeń białek poprzez mostki dwusiarczkowe [51, 64, 73, 74, 89, 121, 151, 152].

Z laboratorium Kaufmanna [46, 71–74] pochodzi wiele prac dokumentujących zmiany w morfologii i składzie białkowym struktur szkieletowych hepatocytów szczura, uwarunkowane czynnikami preparatywnymi. Okazało się, że przy trawieniu jąder tych komórek DNA-azą I i RNA-azą A, po którym usuwa się większość białek chromatynowych zbuforowanym 1,6M roztworem NaCl (pH 7, 4), pozostałość jądrowa zawiera głównie ziarnisty materiał, otoczony warstwą peryferyczną. Po takich zabiegach w preparatach pozostaje około 18–20% białek jądrowych [71, 73, 74]. Analiza tych białek za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej w żelu poliakrylamidowym wskazuje na ich prosty skład polipeptydowy. W elektroferogramie dominują białka blaszki – laminy A, B i C oraz kompleks polipeptydów w zasadowym regionie żelu o m.c. 60 000–70 000, 100 000 daltonów i powyżej.

Pominięcie trawienia jąder komórkowych za pomocą RNA-azy, przy zachowaniu pozostałych warunków preparatyki, dostarcza obrazu mikroskopowego, w którym oprócz wymienionych już tu podstruktur występują resztkowe jąderka. W składzie chemicznym tak wyodrębnionych preparatów obserwowano około 40% jądrowego RNA, bez istotnych zmian w składzie polipeptydowym. Uważa się, że trawienie nukleazami jąder komórkowych przed ich ekstrakcją wysokimi stężeniami soli (1,6–2,0M NaCl) dostarcza

struktur zawierających głównie warstwę peryferyczną [3, 16, 71], natomiast po tej ekstrakcji – preparatów z bogatą siecią wewnątrzjądrową [21, 52]. Zachowanie składników sieci wewnątrzjądrowej po ekstrakcji może być wynikiem oddzielenia pewnych elementów matriks, ochraniających RNA przed działaniem atakujących go enzymów.

Jądra komórkowe po uprzedniej inkubacji (1 godz.) w obecności 10mM roztworu jodoacetamidu lub N-etylomaleimidu, związków blokujących grupy tiolowe, poddane nukleolitycznemu działaniu DNA-azy I i RNA-azy A oraz ekstrakcji 1,6M roztworem NaCl, w mikroskopie elektronowym przedstawiały sobą „puste” wnętrza otoczone warstwą peryferyczną. Te reszkowe struktury zawierają około 10–15% białek, 3% RNA oraz 1% DNA. W elektroferogramie białek tak otrzymanej matriks występują przede wszystkim laminy A, B i C.

Jeśli jądra hepatocytów inkubowano (1 godz.) w środowisku ułatwiającym powstanie wewnątrzcząsteczkowych mostków S–S (2mM tetrathonian sodu; NaTT) i wydzielano z nich matriks poprzez ich trawienie nukleazami i ekstrakcję 1,6M roztworem NaCl, to otrzymywano struktury szkieletowe zawierające reszkowe jąderka i bogatą wewnątrzjądrową sieć włóknisto-ziarnistą, otoczoną warstwą peryferyczną. W składzie chemicznym tak wyodrębnionej matriks występuje około 30–35% białek jądrowych (brak histonów) oraz 30% RNA. Wydaje się, że działanie czynników utleniających grupy tiolowe (np. NaTT, H_2O_2 , kompleks Cu^{2+} -o-fenantrolina) powoduje stabilizację wewnątrzjądrowej sieci przez wytworzenie wiązań dwusiarczkowych budujących ją białek [46, 74, 120, 121]. W obrazie elektroforetycznym białek tak wyizolowanych struktur dominują laminy A, B i C. Jednakże ilość składników nielaminowych znacznie wzrasta w porównaniu z preparatami matriks pochodzącymi z jąder, które nie były inkubowane wobec NaTT. Na uwagę zasługuje wzrost zawartości komponentów w regionie żelu odpowiadającym m.cz. 32 000–36 000; są to zapewne białka budujące rdzenie cząstek RNP. Według Kaufmanna i wsp. [46], bogaty ilościowo polipeptyd o m.cz. 38 000 i pI około 5,3, odpowiada jąderkowej fosfoproteinie B23, wykrytej w laboratorium Buscha [87].

Efekty działania NaTT przy izolowaniu matriks można odwrócić przez inkubację tej struktury jądrowej (20 min) w środowisku zawierającym duże stężenia czynników redukujących, np. 20mM ditiotritol w zbuforowanym 1M roztworze NaCl. W obrazie mikroskopowym matriks, po takim zabiegu, obserwuje się wyłącznie warstwę peryferyczną. Rozwiązanie to stało się podstawą opracowania metody izolowania blaszki jądrowej [73]. Po odwirowaniu tak potraktowanych preparatów matriks, w osadzie pozostają składniki warstwy peryferycznej, w której głównymi polipeptydami są laminy A, B i C. Natomiast, w płynie nadosadowym odzyskuje się pozostałe składowe

matriks, wśród których przeważają białka o m.cz. 60 000–70 000, różne od lamin, białka rdzeni cząstek RNP oraz fosfoproteina o m.cz. 38 000 [46, 74].

W 1986 r. Smith i wsp. [140] przedstawili dowody immunologiczne i biochemiczne na istnienie matriks jądrowej *in situ*. Badacze ci zwracają uwagę na bezwzględną konieczność stosowania w toku preparatyki matriks inhibitorów proteaz i rybonukleaz. Z ich doświadczeń wynika, że w metodzie izolowania tej struktury, wykorzystującej standardowe warunki podane przez Berezneya [10, 12] oraz obecność inhibitora proteaz – PMSF (1mM), matriks przedstawia wyraźnie zarysowaną warstwę peryferyczną, otaczającą słabo widoczną sieć włóknisto-ziarnistą i resztkowe jąderka. Dopiero wprowadzenie innych inhibitorów proteolitycznych, tj. aprotyniny i leupeptyny oraz kompleksu rybozydów wanadylu – blokującego rozkład RNA, zabezpiecza pełną morfologię matriks, w której poza warstwą peryferyczną uwidocznione są włóknisto-ziarnista sieć RNP, elementy włókniste i ziarniste jąderek oraz ziarnistości interchromatynowe. Na podkreślenie zasługuje fakt dystrybucji wewnątrzjądrowej sieci RNP, elementów jąderek i ziarnistości, praktycznie nie zmienionych w porównaniu z jądrami kontrolnymi.

2. SKŁAD CHEMICZNY

W składzie chemicznym matriks jądrowej dominują białka (73–98%). Ponadto występuje w niej niewielki procent RNA (0,05–1,2%), DNA (0,1–1,2%) i fosfolipidów (0,5–6,9%) [10, 12, 13, 61, 64, 134]. Ostatnio zasygnalizowano o wykryciu w tej strukturze jądra cukrowców [34, 42, 130]. W metodach izolowania matriks, eliminujących trawienie jąder RNA-azą, a także wykorzystujących inhibitory enzymów atakujących RNA, główne

TABELA 1
Skład chemiczny matriks jądrowej różnych komórek

Komórki	Białko	RNA	DNA [%]	Fosfolipidy
Hepatocyty szczura [12]	97,6	1,2	<0,1	1,1
<i>Tetrahymena pyriformis</i> (makrojądra) [61]	96,8	0,8	1,0	1,4
HeLa [64]	92,3	0,05	1,2	6,9
BHK [134]	73	23	1	3

różnice w jej składzie dotyczą ilościowej reprezentacji RNA [12, 134]. Zwraca uwagę znaczna zbieżność w składzie chemicznym matriks izolowanej z odległych ewolucyjnie organizmów, tj. orzęsek *Tetrahymena pyriformis* [61], szczur [10] oraz człowiek [64] (tab. 1).

2.1. BIAŁKA

Białka matriks jądrowej stanowią tzw. białka niehistonowe. Cechuje je kwasowy charakter i stosunek aminokwasów kwaśnych do zasadowych około 1,5. Dominującymi aminokwasami w tych białkach są kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, glicyna, leucyna, oraz hydroksyaminokwasy: seryna i treonina [12, 13]. Białka te wykazują silne powinowactwo do DNA.

2.1.1. BIAŁKA WARSTWY PERYFERYCZNEJ

Najbardziej stabilny składnik matriks reprezentuje blaszka wraz z porami otoczki jądrowej. Blaszkę buduje w miarę jednorodna warstwa rozpościerająca się między wewnętrzną błoną otoczki jądrowej a peryferyczną chromatyną [56, 72]. Jej grubość (20–200 nm) zmienia się w zależności od typu komórek [50, 55, 105]. W niektórych komórkach można blaszkę obserwować dopiero po usunięciu otoczki jądrowej [55]. Blaszkę cechuje prosty skład chemiczny. U ssaków w tej podstrukturze matriks występują trzy polipeptydy, opisywane jako laminy A, B i C, wędrujące w żelu poliakryloamidowym z SDS w przedziale m.c. 65 000–80 000 [1, 55, 72, 81, 83, 132, 143]. Kaufmann i wsp. [72] określili m.c. laminy A, B i C hepatocytów szczura odpowiednio – 69 000, 67 000 i 62 000 daltonów. Laminy stanowią od 25 do 50% białek otoczki jądrowej [1, 83]. Na podstawie analizy map tryptycznych i badań immunologicznych stwierdzono znaczne podobieństwo laminy A i C [41, 55, 56, 83, 143]. Prawdopodobnie lamina C stanowi produkt rozpadu laminy A [132]. Analiza sekwencji cDNA kodujących laminy A i C [105] wykazuje, że mają one identyczną sekwencję, z wyjątkiem dodatkowego odcinka kodującego 133 aminokwasy w C-końcowym fragmencie cząsteczki laminy A. Prawdopodobnie różnice w ekspresji genu tych dwóch białek blaszki są wynikiem odrębności składania ich mRNA.

Lamina B charakteryzuje się pewną odrębnością molekularną w porównaniu z laminą A i C; pozostaje najsilniej związana z wewnętrzną błoną otoczki jądrowej [133]. Laminy A i B reprezentują produkty odmiennych genów [132].

Podczas ogniskowania izoelektrycznego lamina A rozdziela się na cztery składniki, lamina C zaś na trzy, w zakresie pH od 6,8 do 7,2, natomiast lamina B wędruje jako jedno pasmo o pI około 5,7 [72].

Ostatnio odnotowano zaskakujący fakt znacznej homologii sekwencji aminokwasowej lamin i białek filamentów pośrednich [105]. To zjawisko sugeruje, że obydwie grupy białek mogą tworzyć włókienka zorganizowane we włókna czy sieć, powiązane z otoczką jądrową.

Zaobserwowano, że przejściu komórek z interfazy w cykl mitotyczny towarzyszy depolimeryzacja białek blaszki, przebiegająca równoległe z rozpadem otoczki jądrowej i reorganizacją chromatyny w chromosomy. Laminy

ulegają rozproszeniu w cytoplazmie, występując w formie monomerów, które podlegają intensywnej fosforylacji (1,4–2,2 mole fosforanu/mol lamin), której poziom przewyższa 4–7-krotnie średnią wartość typową dla tych białek w jądrze interfazowym (0,27–0,46 mola fosforanu/mol lamin) [110].

W warstwie peryferycznej matriks wykryto również dwie glikoproteiny jądrowe gp188 i gp76/74, które są zapewne charakterystyczne dla porów otoczki jądrowej [47].

2.1.2. BIAŁKA MATRIKS JĄDERKOWEJ

Dotychczas najmniej poznanym komponentem matriks są tzw. resztkowe struktury jądrowe. Można je obserwować w takich strukturach szkieletowych, które izolowano z jąder, z pominięciem ich trawienia RNA-azą lub w obecności jej inhibitorów [14, 21, 22, 71, 140]. Struktura matriks jądrowej pozostaje w ścisłej korelacji z obecnością rodzimych cząsteczek RNP. Z doświadczeń Olsona i wsp. [109] wynika, że matriks jądrowa zawiera około 26 białek, 50% RNA oraz 3,7% DNA, obecnych w kontrolnych jądrach komórek wątrobiaka Novikoffa. W składzie białkowym tej podstruktury matriks dominują polipeptydy o m.cz. 28 000, 37 500, 40 000, 70 000, 72 000, 110 000 i 160 000. Białko o m.cz. 110 000, odpowiadające fosfoproteinie jądrowej C23, opisaną w laboratorium Buscha [87], obserwowali również Long i Ochs [89] w resztkowych jąderkach komórek erytroleukemicznych myszy.

2.1.3. BIAŁKA WEWNĄTRZJĄDROWEJ SIECI WŁÓKNISTO-ZIARNISTEJ

Wciąż mało jest danych na temat składu białkowego dyskusyjnej podstruktury matriks, jaką jest wewnątrzjądrowa sieć włóknisto-ziarnista, której obecność w istotny sposób warunkuje procedura jej otrzymywania (eliminacja trawienia jąder RNA-azą, wprowadzenie czynników utleniających grupy tiolowe, inhibitorów proteaz i rybonukleaz) oraz obecność RNA [25, 46, 48, 71, 114, 121].

W tej podstrukturze matriks wykryto białka tworzące kompleksy z hnRNA oraz z snRNA. Przy zastosowaniu [154] przeciwciał monoklonalnych przeciwko cząstkom rdzeni hnRNP, zaobserwowano w wewnątrzjądrowej sieci matriks komórek HeLa, białka o m.cz. 39 000 (C1) i 41 000 (C2). Z kolei technika immunocytochemicznej lokalizacji antygenów, wykorzystująca przeciwciała monoklonalne przeciwko cząstkom snRNP [140], pozwoliła stwierdzić obecność antygeny Sm o m.cz. 28 000, tworzącego kompleksy z U1, U2, U4, U5 i U6 snRNA oraz składnika o m.cz. 70 000, asocjującego z U1-snRNA [155]. Rola tych białek w połączeniach z snRNA nie jest wyjaśniona. Sugeruje się jednak ich udział w procesie składania RNA, podobnie jak opisanego ostatnio [140] białka o m.cz. 107 000 (p107; pI 8,7–8,8). Na uwagę zasługują doświadczenia Smitha i wsp. [140]. W doświadczeniach tych wykazano, że otrzymywanie matriks wątroby szczura w obecności EDTA, a także trawienie jąder RNA-azą prowadzi do usunięcia z tej struktury białka p107 oraz do zaniku sieci RNP.

Z wieloletnich badań laboratorium Berezneya [11, 15, 138, 145–147], dotyczących udziału matriks jądrowej w procesie replikacji DNA, należy podkreślić zlokalizowanie w wewnątrzjądrowej sieci aktywności podstawowych enzymów kompleksu replikacyjnego, tj. polimerazy DNA typu α , prymazy DNA, 3'-5'egzonukleazy, RNA-azy H i metylazy DNA. W wewnątrzjądrowej sieci włóknisto-ziarnistej wykryto niezależnie w dwóch laboratoriach – Savaljevic [121] i Kaufmanna [46, 74] białko(a) o m.cz. 36 000–38 000, które występuje(a) w matriks tylko wtedy, gdy jej preparatykę prowadzi się w warunkach zapewniających powstawanie mostków dwusiarczkowych (kompleks CuSO_4 -o-fenantrolina, NaTT). Białko(a) to buduje cząstki RNP.

W 1987 r. Feuerstein i Mond [44] opisali w tej podstrukturze matriks limfocytów B myszy białko o m.cz. 40 000 i pI 5,0, nazwane numatryną (ang. numatrin). Aktywacja limfocytów B mitogenami (np. liposacharydy, estry forbolu, przeciwciała) prowadzi do intensywnego wzrostu biosyntezy (5–20-krotnego) numatryny. Produkcja tego białka nasila się już po 60–120 min od podania mitogenów, osiągając najwyższą wartość po 16 godz., oraz spadek do poziomu kontroli po 48 godz. aktywacji. Interesujący pozostaje fakt wysokiej syntezy numatryny w komórkach nowotworowych, wywodzących się z komórek linii B, np. Raji, BAL-17, WEHI-231. Białko to wydaje się regulować wzrost prawidłowych i nowotworowych limfocytów linii B.

2.1.4. BIAŁKA CYTOSZKIELETU A MATRIKS JĄDROWA

Oddzielnego, krótkiego omówienia wymaga dyskusyjny problem występowania białek cytoszkieletu w strukturach szkieletowych jądra komórkowego. Na podstawie techniki cytochemicznej lokalizacji antygenów, z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych przeciwko wimentynie, cytokeratynom [154], a także aktynie [102, 103, 154], wykryto te białka w matriks jądrowej. Wciąż jednak nie wiadomo, czy stanowią one integralny składnik tej struktury jądra, czy też zanieczyszczenia cytoplazmatyczne [25, 45, 105, 142]. Z przekonujących prac laboratorium Uedy [101–103], opartych na biochemicznej i immunologicznej analizie wynika, że aktyna jest składnikiem wewnątrzjądrowej sieci włóknisto-ziarnistej limfocytów prawidłowych i białaczkowych. Aktyna silnie zasocjowana z tą siecią nie ulega trawieniu trypsyną w warunkach, kiedy z matriks uwalnia się ponad 80% jej białek. Białko to pozostaje związane z snRNA [102].

2.1.5. BIAŁKA MATRIKS JĄDROWEJ I RUSZTOWANIA CHROMOSOMÓW (SCAFFOLD)

Bardzo interesujący problem stanowi dynamika przejścia komórek z interfazy w stan mitozy na poziomie struktur szkieletowych. Uważa się, że następuje przeorganizowanie dużej ilości białek matriks w rusztowanie chro-

mosomów. Mechanizm ten jest mało poznany [8, 84, 85, 123, 160]. Istotną rolę odgrywają w nim zapewne modyfikacje posttranslacyjne [25, 115].

Białka szkieletowe (scaffold) stanowią sieć włókien. Sieć ta rozciąga się wzdłuż wnętrza chromosomów, zachowując morfologię par siostrzanych chromatyd. Mogą one występować w dwóch odwracalnych konformacjach, tj. silnie rozluźnionej (forma rozciągnięta) oraz skondensowanej (forma skondensowana) sieci włókien.

Na początku lat osiemdziesiątych opisano [84, 85] dwa białka szkieletu chromosomów komórek HeLa o m.c.z. 170 000 i 135 000, nazwane odpowiednio SC1 i SC2, stanowiące aż około 40% tej struktury. Ostatnio udowodniono, że białko SC2 odpowiada topoizomerazie II [38, 39].

W laboratorium Wanki [115, 116] przeprowadzono porównawczą analizę białek matriks jądrowej i szkieletu chromosomów komórek wątroby krowy. Elektroforeza jednowymiarowa w żelu poliakrylamidowym białek tych struktur wykazała, że podstawowe składniki matriks – laminy A, B i C nie są obecne w szkielecie chromosomalnym, natomiast białka o m.c.z. 37 000 i 83 000 występują przede wszystkim w rusztowaniu chromosomów. Większość pozostałych białek jest wspólna dla obydwu struktur. Wyniki te potwierdzono również techniką elektroforezy dwuwymiarowej [116]. Białka tych struktur rozdzielają się głównie w kwasowym regionie żelu, co wyraźnie obserwowano w elektroferogramach chromosomów metafazowych, w których brak lamin. Komponent o m.c.z. 47 000, widoczny w elektroferogramach białek obydwu struktur, odpowiada ruchliwością elektroforetyczną aktywie cytoplazmatycznej badanych komórek.

2.2. DNA

Właściwość DNA pozostającego w strukturach szkieletowych po wyczerpujących ekstrakcjach roztworami soli o wysokiej sile jonowej oraz po trawieniu nukleazami poznano w niewielkim stopniu. Stanowi on zwykle około 1% jądrowego DNA. Przeprowadzono wiele badań w celu wyjaśnienia natury sekwencji DNA w miejscach jego zakotwiczenia w matriks jądrowej. Matsumoto [91] podał, że około 60% DNA matriks jąder nerki wołu reprezentuje sekwencje satelitarne. Z kolei szkielet interfazowych jąder komórek myszy P815 zawiera DNA, w którym sekwencje o wysokiej powtarzalności stanowią około 40–50% [59]. DNA matriks jąder komórek L myszy, a także chromosomów metafazowych chomika chińskiego jest wzbogacony w sekwencje o średniej powtarzalności [68, 122]. Niektórzy badacze [33, 104, 127] obserwowali obecność sekwencji unikatowych w DNA matriks. Natomiast DNA matriks wątroby szczura i myszy czy chromosomów metafazowych komórek linii DON chomika wydaje się nie wykazywać wzbogacenia w specyficzne klasy sekwencji w porównaniu z całkowitym, jądrowym DNA [7, 14, 111].

W obszernych badaniach grupy Razina [124] obserwowano w obrębie szkieletu jąder interfazowych komórek wysiękowych Ehrlicha obecność dwóch klas DNA, opisywanych jako długie i krótkie fragmenty. Długie fragmenty DNA, zawierające około 10 kpz, bogate w sekwencje satelitarne są odporne na działanie czynników fizykochemicznych i jest ich w jądrze diploidalnym 10^2 . Z kolei krótkie fragmenty DNA, liczące około 140 pz, są bardzo wrażliwe na wpływ czynników środowiskowych. Zaobserwowano je w warunkach stabilizacji struktur szkieletowych przez jony Cu^{2+} (w mniejszym stopniu jony Zn^{2+}). W jądrze diploidalnym jest ich 10^5 . Preparaty matriks wydzielone z komórek wysiękowych myszy, których nie traktowano we wstępnym etapie preparatyki jonami Cu^{2+} , zawierają wyłącznie fragmenty DNA długości 10 kpz.

2.3. RNA

RNA stanowi integralny składnik struktur szkieletowych, szczególnie ważny do utrzymania wewnątrzjądrowej sieci włóknisto-ziarnistej [71, 73, 74, 140]. Zawartość RNA w matriks zależy od sposobu jej wyodrębniania. Pominięcie w procedurze izolowania tej struktury trawienia jąder RNA-azą bądź stosowanie inhibitorów rozkładu RNA dostarcza preparatów, które zawierają około 23% RNA (tab. 1) [134].

Pod koniec lat siedemdziesiątych wykazano na podstawie włączania [^3H]-urydyny, że znaczna część hnRNA reprezentuje składnik szkieletu jąder interfazowych [62, 88, 89, 96]. Okazało się również, że prekursorzy rRNA [61, 96, 107, 109, 140], a także snRNA [89, 101, 155, 157] budują matriks jądrową.

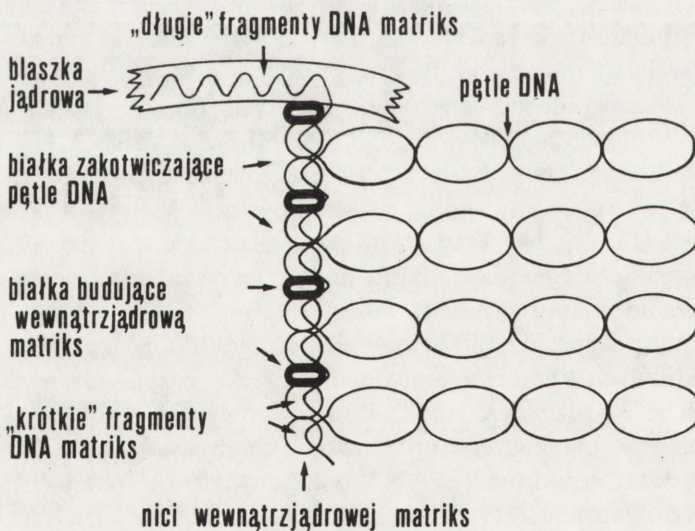
Long i Ochs [89] określili ilościowy udział poszczególnych klas RNA w matriks jąder komórek erytroleukemicznych myszy. W tej strukturze odnaleziono około 65% całkowitego RNA, 60–80% hnRNA, 74% snRNA oraz śladowe ilości rRNA. Badacze ci zanalizowali snRNA matriks w toku elektroforezy w 10% żelu poliakryloamidowym. W tej strukturze jądra występują U1, U2, U3, U4, U5 i U6snRNA. Obecność w matriks U1snRNA, związku pośredniczącego w składaniu prekursorów mRNA, wydaje się mieć istotne znaczenie w tym procesie.

Nordstrom i wsp. [29, 107] zwrócili uwagę na dystrybucję RNA we frakcjach jądrowych komórek jajowodu kurczęcia (rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w 2M roztworze NaCl). Prekursorowy rRNA (ok. 95%) oraz pre mRNA albuminy jaja kurzego oraz owomukoidu wiążą się z matriks tych komórek, podczas gdy dojrzały rRNA odnajduje się we frakcjach jądrowych poza matriks. Natomiast tylko część (50%) dojrzałego mRNA badanych białek pozostaje związana ze szkieletem jądrowym. Wydaje się, że matriks jądrowa stanowi główne miejsce dojrzewania transkryptów DNA, a ponadto bierze udział w ich transporcie na teren cytoplazmy [9, 29, 107, 144, 155].

3. UDZIAŁ MATRIKS JĄDROWEJ W ORGANIZACJI PRZESTRZENNEJ MATERIAŁU GENETYCZNEGO, JEGO REPLIKACJI I TRANSKRYPCJI

Analiza w mikroskopie elektronowym odhistonowanych jąder komórkowych czy chromosomów metafazowych organizmów, począwszy od niskich eukariontów po człowieka [8, 33, 58, 119, 135, 150, 152], dostarcza obrazów pętli (domen) DNA, zakotwiczonych swoimi podstawami w strukturach szkieletowych. Tak umocowane pętle DNA, wybarwione np. bromkiem etydy, można oglądać w mikroskopie jako tzw. *halo* (aureola) [24, 27, 36, 150, 156]. Określono, że pętle DNA człowieka długości około 70 kpz wykazują *halo* o średnicy 13 μm [104]. Długość pętli DNA wydzielonych z organizmów na różnym szczeblu rozwoju ewolucyjnego waha się w zakresie 10–300 kpz [58, 59, 119, 122, 156]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wielkość pętli DNA w jądrze interfazowym jest zbliżona do tej w chromosomach metafazowych [113, 122, 124]. Z licznych doniesień [24, 27, 104, 124, 156] można wnioskować, że długość pętli DNA między dwoma miejscami zakotwiczenia w matriks odpowiada wielkością funkcjonalnym jednostkom materiału genetycznego – replikonom. Uwolnienie pętli DNA następuje w warunkach degradacji struktury matriks, co obserwowano po traktowaniu jej detergentami jonowymi czy roztworem zawierającym 2M NaCl – 5M mocznik [100, 124, 158]. Stąd sugestia, że w wiązaniu pętli DNA do matriks istotną rolę odgrywają wiązania o charakterze jonowym i wodorowe.

Razin i wsp. [124] sugerują, że długie fragmenty DNA matriks oddziałują



Ryc. 1. Model organizacji materiału genetycznego z udziałem składników matriks jądrowej według Razina i wsp. [124]

z blaszką jądrową, krótkie zaś, wrażliwe na wiele czynników fizykochemicznych i wymagające do ich stabilizacji jonów Cu^{2+} , są zaangażowane w infrastrukturę sieci wewnątrzjądrowej i stanowią wraz z jej białkami główne miejsce zakotwiczenia pętli DNA (ryc. 1). Model ten zbliżony jest do wcześniejszej koncepcji grupy Laemmliego [84, 85], dotyczącej dwupoziomowej organizacji włókna chromatynowego w jądrze komórkowym. Zgodnie z nią, pierwszy poziom odpowiada wiązaniu DNA z blaszką, natomiast drugi – z białkami sieci wewnątrzjądrowej.

Wydaje się, że obszary zakotwiczenia pętli DNA nie są przypadkowe. Zwraca się uwagę na rolę fragmentów DNA, bogatych w pary AT [49, 97]. Ostatnio zanalizowano specyficzne sekwencje nukleotydowe w miejscach zakotwiczenia pętli DNA długości 5 kpz, zawierającej zespół pięciu genów histonowych komórek Kc *Drosophila melanogaster* [97]. Zlokalizowano je we fragmencie DNA (657 pz) uwalnianym przez restryktazę EcoR1, który znajduje się w miejscu zakotwiczenia opisywanej pętli, w odcinku łącznikowego DNA, bogatym w pary AT, między genami histonów H1 i H3.

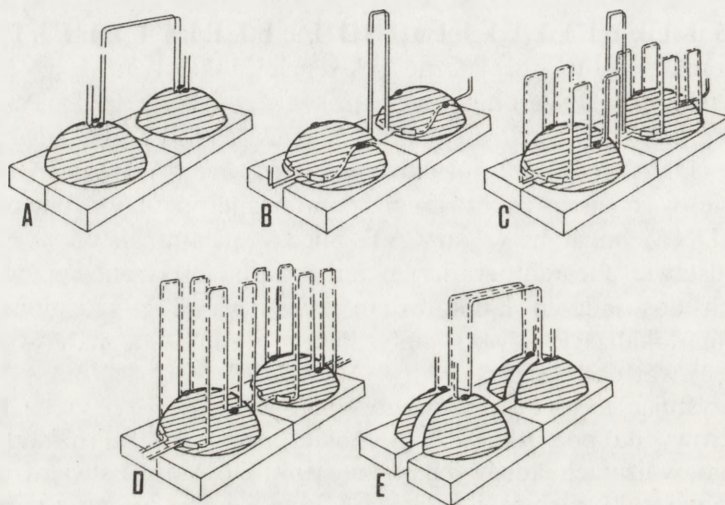
Na podstawie autoradiograficznej mikroskopii elektronowej, w wyniku pionierskich doświadczeń laboratorium Berezneya [11], zademonstrowano preferencyjną lokalizację nowo syntetyzującego się DNA w matriks jądrowej, regenerującej wątroby szczura.

Wykorzystując technikę pulsowego znakowania [^3H]-tymidyną komórek wątroby krowy na początku fazy S, połączoną z analizą rozkładu piętna izotopowego, w lizatach jądrowych po trawieniu DNA-azą I stwierdzono [149, 150] izotop w strukturach szkieletowych chromosomów w czasie mitozy oraz w matriks jądrowej podczas następnej fazy G_1 . Natomiast radioaktywny nukleozyd podany w środkowej czy późnej fazie S rozmieszcza się równomiernie w pętlach DNA. Takie wyniki przemawiają za tym, że piętno izotopowe związane z miejscami inicjacji replikacji pozostaje w DNA, który jest zasocjowany zarówno ze szkieletem chromosomów mitotycznych, jak i matriks jądrową komórek będących w fazie G_1 interfazy.

Na podstawie badań autoradiograficznych wykazano, że włączona pulsowo [^3H]-tymidyna we wczesnej fazie S wiąże się z DNA struktur szkieletowych jądra przez cały cykl komórkowy [5, 27]. Analiza znakowanych fragmentów DNA, zasocjowanych z matriks jąder wątroby krowy po trawieniu nukleazami ujawniła, że wiązanie odbywa się w pobliżu rozgałęzienia widełek replikacyjnych bądź w ich obrębie [35, 36]. Okazuje się, że po wydłużonym okresie znakowania piętno izotopowe może być łatwo usunięte z matriks jądrowej, co przemawia za jego przemieszczaniem się z podstawy pętli do jej wnętrza [35]. Podobne wyniki uzyskane przez kilka ośrodków naukowych [15, 27, 112, 139, 146, 150] sugerują, że replikujący się DNA „przewija się” przez matriks, z którą związany jest kompleks replikacyjny (replisom). Również za pomocą autoradiografii udowodniono, że wkrótce po krótkiej pulsowej inkorporacji [^3H]-tymidyny, prawie całe piętno pojawia się w DNA

matriks jądrowej, a później odnajdowane jest także w *halo* otaczającym pętle DNA [150]. Po zakończeniu replikacji pętli DNA jest ona uwalniana z miejsc wiązania widełek replikacyjnych. Przemawia za tym zwiększone tempo usuwania produktów trawienia DNA-azą I, znakowanych [^3H]-tymidyną fragmentów DNA, zsyntetyzowanych w bardzo późnej fazie S w porównaniu z całkowitym DNA następnej fazy G_2 [5].

W 1987 r. w laboratorium Wanki [150] przedstawiono propozycję modelu replikacji DNA z udziałem matriks (ryc. 2).



Ryc. 2. Model replikacji DNA z udziałem matriks jądrowej według van der Veldena i Wanki [150]

W czasie fazy G_1 włókna wewnątrzjądrowej sieci matriks stanowią szkielet, wzdłuż którego zakotwiczone są kolejne miejsca replikacji w bliskiej odległości (A). Z chwilą inicjacji syntezy DNA, zakotwiczone miejsca inicjacji podwajają się (B), a widełki replikacyjne wkrótce przyłączają się w pozycjach między sąsiadującymi miejscami inicjacji. Replikujące się pętle DNA „przewijają się” przez miejsca zakotwiczenia widełek, które sprawują kontrolę w rozplątaniu podwójnego heliksu DNA (C), miejsce zaś terminacji uwalnia się z matriks, podczas gdy miejsce inicjacji zakotwiczone jest na stałe w tej strukturze jądra [5, 158]. Włókna matriks ulegają duplikacji (E) równocześnie z replikacją zakotwiczonej cząsteczki DNA.

Kolejne dowody podtrzymujące funkcję matriks w procesie replikacji DNA to stwierdzenie asocjacji z tą strukturą fragmentów Okazaki [35] oraz wieloenzymatycznego kompleksu replikacyjnego [146, 147]. Również wykrycie nowo syntetyzującego się DNA wirusów rodziny Popova w matriks jąder komórek ich gospodarza potwierdza rolę tej struktury w procesie replikacji [23, 69]. Na podkreślenie zasługują dane wykrycia w matriks zainfekowanych komórek antygeny T, białka niezbędnego do regulacji replikacji wirusów tej rodziny [23, 63, 65, 69, 143].

Wśród prac dokumentujących zaangażowanie matriks jądrowej organizmów na różnym szczeblu rozwoju ewolucyjnego w syntezę DNA, należy wspomnieć doniesienia wskazujące, że replikacja jest inicjowana wewnątrz pętli DNA, w regionach odległych od miejsc ich zakotwiczenia w matriks [59, 95].

Technika hybrydyzacji kwasów nukleinowych okazała się owocna w stwierdzeniu asocjacji wielu aktywnie transkrybowanych genów z matriks jądrowej, m.in. genu albuminy jaja kurzego [30, 127, 128], β -globuliny [60], vitellogeniny [70], aktyny [66], kolagenu $\alpha 2$ [108], rRNA [76, 141] i genów białek fazy ostrej [20]. Rozmieszczenie miejsc wiązania aktywnych fragmentów genów wydaje się mieć charakter dynamiczny. Molekularne podstawy wzbogacenia tej struktury w aktywne geny są nieznane.

Fakt, że matriks jest również docelowym miejscem wiązania receptorów dla hormonów [6, 75, 80, 82, 118] nie pozostaje zapewne bez znaczenia. W laboratorium Lammliego [86] oraz Razina [125] wykazano w matriks aktywność polimerazy RNA typu β .

Do przedstawionych tu wyników należy dodać, że nie znaleziono korelacji między aktywnością transkrypcyjną genów α -globiny [78, 79] czy białek szoku cieplnego [136] a ich asocjacją z matriks. Geny białek szoku cieplnego są związane z tą strukturą zarówno przed działaniem podwyższonej temperatury, gdy ich transkrypcja nie odbywa się, jak i również w czasie szoku, gdy jej poziom gwałtownie wzrasta.

Istotne wydają się obserwacje Flickingera [49], że DNA zakotwicza się w matriks głównie w obrębie sekwencji bogatych w pary AT. Z kolei wiadomo, że fragmenty DNA bogate w sekwencje AT występują w bezpośrednim sąsiedztwie aktywnych genów, np. genów rRNA i histonów [49, 97]. Należy również zwrócić uwagę na sugestię niektórych badaczy [31, 97, 141], że tylko flankujące sekwencje genów uczestniczą w ich wiązaniu z matriks.

Grupa Razina [126] przedstawiła wyniki świadczące, że wykrycie miejsc wiązania aktywnych genów (np. stałego regionu łańcuchów IgM- c_{μ}) z matriks jąder komórek hybrydomy myszy jest uwarunkowane czynnikami preparatywnymi. Okazało się, że przemycie jąder komórkowych trawionych uprzednio DNA-azą I lub mikrokokalną nukleazą hipotonicznym buforem (bez jonów Mg^{2+}), przed ich ekstrakcją za pomocą 2M roztworu NaCl, niszczy miejsca przyłączenia aktywnych genów do elementów matriks.

UWAGI KOŃCOWE

Tabela 2 jest próbą syntetycznego przedstawienia najważniejszych składników opisanych w matriks jądrowej oraz roli tej struktury w życiu komórek prawidłowych i patologicznych.

W matriks wykryto białka odpowiadające za przestrzenną organizację DNA w postaci pętli. Reprezentują je pozachromatynowe białka niehistonowe o silnym powinowactwie do DNA. W tej strukturze jądra stwierdzono nowo

TABELA 2

Składniki wykryte w matriks jądrowej i rola tej struktury w życiu komórek

	Najważniejsze dane bibliograficzne
Organizacja przestrzenna DNA	
Białka zakotwiczące pętle DNA	2, 3, 16, 32, 33, 53, 58, 59, 84, 85, 90, 97, 104, 113, 117, 124, 135, 150, 156
Replikacja DNA	
Nowo syntetyzujący się DNA	11, 67, 93, 112, 139
Wieloenzymatyczny kompleks replikacyjny:	146
Polimeraza DNA typu α	69, 106, 138, 146, 162
Prymaza DNA	146, 147, 161
3'-5'-egzonukleaza, RNA-aza H, metylaza DNA	146
Polimeraza DNA typu β	106
Topoizomeraza I i II	18, 38, 39, 106
Procesy naprawcze DNA	94, 100
Widelki replikacyjne	35, 36, 112, 145
Fragmenty Okazaki	35
Ekspresja genów	
Aktywne geny: albuminy jaja kurzego	30, 127, 128
β -globiny	60
vitellogeniny	70
aktyny	66
kolagenu $\alpha 2$	108
rRNA	76, 141
białek fazy ostrej	20
hnRNA	89, 96, 107, 120, 151
snRNA	89, 96, 101, 102, 155, 157
Intermediaty procesu składania RNA	9, 29, 107, 129, 140, 155, 157
Receptory hormonów	6, 75, 80, 82, 118
Polimeraza RNA typu β	86, 125
Transformacja nowotworowa	
Produkty onkogenów	40, 43, 153
Antygeny wirusów transformujących	23, 63, 65, 143
Wiązanie kancerogenów	148
Inne	
Wiązanie cząsteczek wirusów	19, 23, 134, 144
Nagromadzenie polimerów	
ADP-rybozy	4, 26, 159
Miejsca akceptorowe dla białek wiążących cAMP	57
Asocjacja fibronektyny	164

syntetyzujący się DNA, enzymy związane z kompleksem replikacyjnym, naprawą DNA [94, 100], a także z relaksacją superhelikalnych pętli DNA [104, 158] oraz widełki replikacyjne i odcinki DNA odpowiadające długością fragmentom Okazaki, co wskazuje na jej zaangażowanie w proces replikacji.

Z matriks wielu zbadanych organizmów asocjują aktywne transkrypcyjnie geny hnRNA, snRNA, intermediaty procesu składania RNA, a także receptory dla wielu hormonów oraz polimeraza RNA typu β , co z kolei sugeruje udział tej struktury jądra w ekspresji informacji genetycznej.

Ukazały się wstępne doniesienia na temat obecności w matriks produktów niektórych onkogenów, np. v-myc, c-myc, v-myb [40, 43, 153], a także związaniu z nią antygenów wirusów transformujących [23, 63, 65, 143], co wyjaśnia jej funkcję w transformacji nowotworowej. Ukazały się prace [19, 134, 144] dotyczące roli tej struktury jądra w wirowiezie.

Matriks jest miejscem nagromadzenia polimerów ADP-rybozy [4, 26, 159], które mogą być wykorzystywane m.in. w procesie naprawy DNA. Zawiera ona również miejsca akceptorowe dla białek wiążących cAMP [57], co zapewne ma znaczenie dla fosforylacji białek jądrowych.

Interesujący wydaje się fakt asocjacji z tą strukturą szkieletową jądra białka stresu – fibronektyny w komórkach HeLa [164].

Przedstawione tu dane dotyczące budowy chemicznej i roli matriks jądrowej obfitują w wiele nie rozwiązanych problemów. Bardzo frapującym zagadnieniem jest poznanie relacji DNA – matriks w jądrach komórek nowotworowych. Na podkreślenie zasługuje doniesienie [148] wskazujące na preferencyjną lokalizację niektórych kancerogenów (np. benzo- α -pirenu, nitrozomocznika) w miejscach zakotwiczenia pętli DNA w matriks jądrowej. Wydaje się, że oddziaływania kancerogeny – struktury szkieletowe jądra nie pozostają bez wpływu na przestrzenną organizację materiału genetycznego, jego powielenie i ekspresję w komórkach, do których wniknął czynnik nowotworowy.

Serdecznie dziękuję pani Monice Radwan za wykonanie rycin oraz mgr Janowi Gierakowi za przygotowanie wydruku pracy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AARONSON R. P., BLOBEL G., Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 1007–1011, 1975.
- [2] ADOLPH K. W., CHENG S. M., LAEMMLI U. K., Role of nonhistone proteins in metaphase chromosome structure, *Cell*, **12**: 805–816, 1977.
- [3] ADOLPH K. W., Organization of chromosomes in HeLa cells: isolation of histone-depleted nuclei and nuclear scaffolds, *J. Cell Sci.*, **42**: 291–304, 1980.
- [4] – Factor influencing ADP-ribosylation differences between chromosomal proteins of interphase and metaphase HeLa cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, **253**: 176–188, 1987.

- [5] AELEN J. M. A., OPSTELTEN R. J. G., WANKA F., Organization of DNA replication in *Physarum polycephalum*. Attachment of origins of replicons and replication to the nuclear matrix, *Nucl. Acids Res.*, **11**: 1181-1195, 1983.
- [6] BARRACK E. R., COFFEY D. S., The specific binding of estrogens and androgens to the nuclear matrix of sex hormone responsive tissues, *J. Biol. Chem.*, **255**: 7265-7275, 1980.
- [7] BASLER J., HASTIE N. D., PIETRAS D., MATSUI S.-I., SANDBERG A. A., BEREZNEY R., Hybridization of nuclear matrix attached deoxyribonucleic acid fragments, *Biochemistry*, **29**: 6921-6929, 1981.
- [8] BEKERS A. G. M., Structural components of the cell nucleus and the organization of chromosomal DNA, Rotterdam: Krips Repro Meppel, 1-95, 1982.
- [9] BEN-ZE'EV A., ALONI Y., Processing of SV40 RNA is associated with the nuclear matrix and is not followed by the accumulation of low-molecular-weight RNA products, *Virology*, **125**: 475-479, 1983.
- [10] BEREZNEY R., COFFEY D. S., Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys., Res. Commun.*, **60**: 1410-1417, 1974.
- [11] — Nuclear protein matrix association with newly synthesized DNA, *Science*, **189**: 291-293, 1975.
- [12] — Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei, *J. Cell Biol.* **73**: 616-637, 1977.
- [13] BEREZNEY R., Dynamic properties of the nuclear matrix [w:] *The Cell Nucleus*, red. H. Busch, t. VII, 413-455, Academic Press, Inc., 1979.
- [14] BEREZNEY R., BUCHHOLTZ L. A., Isolation and characterization of rat liver nuclear matrices containing high molecular weight deoxyribonucleic acid, *Biochemistry*, **20**: 4995-5002, 1981.
- [15] — Dynamic association of replicating DNA fragments with the nuclear matrix of regenerating liver, *Exptl. Cell Res.*, **132**: 1-13, 1981.
- [16] BEREZNEY R., Organization and function of the nuclear matrix [w:] *Chromosomal Nonhistone Proteins*, red. L. S. Hnilica, CRC Press, Boca Raton, t. IV, 119-180, 1984.
- [17] — The nuclear matrix model and RNA replication: an *in vitro* approach for dissecting the role of structure in chromatin function, [w:] *Nuclear Envelope Structure and RNA Maturation*, Liss, A. R., Inc., New York 1985, 99-117.
- [18] BERRIOS M., OSHEROFF N., FISHER P. A., *In situ* localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 4142-4146: 1985.
- [19] BIBOR-HARDY V., POUCHELET M., St-PIERRE E., HERZBERG M., SIMARD R., The nuclear matrix is involved in herpes simplex virogenesis, *Virology*, **121**: 296-306, 1982.
- [20] BIRCH H. E., SCHREIBER G., The association of acute phase protein genes with the nuclear matrix of rat liver during experimental inflammation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **137**: 633-639, 1986.
- [21] BOUVIER D., HUBERT J., SEVE A.-P., BOUTEILLE M., RNA is responsible for the 3-dimensional organisation of nuclear matrix proteins in HeLa cells, *Biol. Cell*, **43**: 143-146, 1982.
- [22] — Structural aspects of intranuclear matrix disintegration upon RNase digestion of HeLa cell nuclei, *Eur. J. Cell Biol.*, **36**: 323-333, 1985.
- [23] BUCLER-WHITE A. J., HUMPHREY G. W., PIGIET V., Association of polyoma T antigen and DNA with the nuclear matrix from lytically infected 3T6 cells, *Cell*, **22**: 37-46, 1980.
- [24] BUONGIORNO-NARDELLI M., MICHALI G., CARRI M. T., MARILLEY M., A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome, *Nature*, **298**: 100-102, 1982.
- [25] CAPCO D. G., WAN K. M., PENMAN S., The nuclear matrix: three dimensional architecture and protein composition, *Cell*, **29**: 847-858, 1982.

- [26] CARDENAS-CORONA M. E., JACOBSON E. L., JACOBSON M. K., Endogeneous polymers of ADP-ribose are associated with the nuclear matrix, *J. Biol. Chem.*, **262**: 14863-14866, 1987.
- [27] CARRI M. T., MICHELI G., GRAZIANO E., PACE T., BUONGIORNO-NARDELLI, M., The relationship between chromosomal origins of replication and the nuclear matrix during the cell cycle, *Exptl. Cell Res.*, **164**: 426-436, 1986.
- [28] CHALY N., BLADON T., SETTERFIELD G., LITTLE J. E., KAPLAN J. G., BROWN D. L., Changes in distribution of nuclear matrix antigens during the mitotic cell cycle, *J. Cell Biol.*, **99**: 661-671, 1984.
- [29] CIEJEK E. M., NORDSTROM J. L., TSAI M.-J., O'MALLEY B. W., Ribonucleic acid precursors are associated with the chick oviduct nuclear matrix, *Biochemistry*, **21**: 4945-4953, 1982.
- [30] CIEJEK E. M., TSAI M.-J., O'MALLEY B. W., Actively transcribed genes are associated with the nuclear matrix, *Nature*, **306**: 607-609, 1983.
- [31] COCKERILL P. N., GARRARD W. T., Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in the region containing topoisomerase II sites, *Cell*, **44**: 273-282, 1986.
- [32] COOK P. R., BRAZELL I. A., JOST E., Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA, *J. Cell Sci.*, **22**: 203-224, 1976.
- [33] COOK P. R., BRAZELL I. A., Mapping sequences in loops of nuclear DNA by their progressive detachment from the nuclear cage, *Nucleic Acid Res.*, **8**: 2895-2906, 1980.
- [34] CZERNOKHVOSTOV V. V., Jadernyj matriks eukariotycznej kletki, *Usp. Sow. Biol.*, **99**: 371-384, 1985.
- [35] DIJKWEL P. A., MULLENDERS L. H. F., WANKA F., Analysis of the attachment of replicating DNA to a nuclear matrix in mammalian interphase nuclei, *Nucl. Acids Res.* **6**: 219-230, 1979.
- [36] DIJKWEL P. A., WENINK P. W., PODDIGHE J., Permanent attachment of replication origins to the nuclear matrix in BHK-cells, *Nucl. Acids Res.*, **14**: 3241-3249, 1986.
- [37] DOUNCE A. L., Enzyme studies on isolated cell nuclei of rat liver, *J. Biol. Chem.*, **147**: 685-691, 1943.
- [38] EARNSHAW W. C., HALLIGAN B., COOKE C. A., HECK M. M. S., LIU L. F., Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosomes, *J. Cell Biol.*, **100**: 1706-1715, 1985.
- [39] EARNSHAW W. C., HECK M. M. S., Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes, *J. Cell Biol.*, **100**: 1716-1725, 1985.
- [40] EISENMAN R. N., TACHIBANA C. Y., ABRAMS H. D., HANN S. R., The v-myc and c-myc encoded proteins are associated with the nuclear matrix, *Mol. Cell Biol.*, **5**: 114-126, 1985.
- [41] ELY S., D'ARCY A., JOST E., Interaction of antibodies against nuclear envelope associated proteins from rat liver nuclei with rodent and human cells, *Exptl. Cell Res.*, **116**: 325-331, 1978.
- [42] ENGELHARDT P., PLAGENS U., ZBARSKY I. B., FILATOVA L. S., Granules 25-30 nm in diameter: Basic constituent of the nuclear matrix chromosomes scaffold, and nuclear envelope, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 6937-6940, 1982.
- [43] EVAN G. I., HANCOCK D. C., Studies on the interaction of human c-myc protein with cell nuclei; p62 c-myc as a member of a discrete subset of nuclear proteins, *Cell*, **43**: 253-261, 1985.
- [44] FEUERSTEIN N., MOND J. J., „Numatrin”, a nuclear matrix protein associated with induction of proliferation in B lymphocytes, *J. Biol. Chem.*, **262**: 11389-11397, 1987.
- [45] FEY E. G., PENMAN S., Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 121-125, 1988.

- [46] FIELDS A. P., KAUFMANN S. H., SHAPER J. H., Analysis of the internal nuclear matrix, *Exptl. Cell Res.*, **164**: 139–153, 1986.
- [47] FILSON A. J., LEWIS A., BLOBEL G., FISHER P. A., Monoclonal antibodies prepared against the major *Drosophila* nuclear matrix – pore complex – lamina glycoprotein bind specifically to the nuclear envelope *in situ*, *J. Biol. Chem.*, **260**: 3164–3172, 1985.
- [48] FISHER P. A., BERRIOS M., BLOBEL G., Isolation and characterization of a proteinaceous subnuclear fraction composed of nuclear matrix, peripheral lamina and nuclear pore complexes from embryos of *Drosophila melanogaster*, *J. Cell Biol.*, **92**: 674–686, 1982.
- [49] FLICKINGER R. A., Localization of AT-rich sequences at the nuclear matrix, *Cell Biol. Int. Rep.*, **10**: 415–420, 1986.
- [50] FRANKE W. W., SCHEER U., KROHNE G., JARASCH E.-D., The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery, *J. Cell Biol.*, **91**: 39s–50s, 1981.
- [51] GALCHEVA-GARGOVA Z., PETROV P., DESSEV G., Effect of chromatin decondensation on the intranuclear matrix, *Eur. J. Cell. Biol.*, **28**: 155–159, 1982.
- [52] GALLINARO H., PUVION E., KISTER P., JACOB M., Nuclear matrix and hn-RNP share a common structural constituent associated with premessenger RNA. *EMBO J.*, **2**: 953–960, 1983.
- [53] GASSER S. M., LAEMMLI U. K., The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site, *EMBO J.*, **5**: 511–518, 1986.
- [54] GEORGIEV G. P., CHENTSOV Y. S., On the structure of cell nuclei: experimental electron microscopic investigation of isolated nuclei, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **132**: 199–202, 1960.
- [55] GERACE L., BLUM A., BLOBEL G., Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex – lamina fraction. Interphase and mitotic distribution, *J. Cell Biol.*, **79**: 546–566, 1978.
- [56] GERACE L., BLOBEL G., Nuclear lamina and the structural organization of the nuclear envelope, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **46**: 967–978, 1982.
- [57] GOUELI S. A., AHMED K., Nuclear matrix as acceptor cAMP-binding proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**: 1083–1088, 1982.
- [58] HANCOCK R., Topological organization of interphase DNA: the nuclear matrix and other skeletal structures, *Biol. Cell*, **46**: 105–122, 1982.
- [59] HANCOCK R., HUGHES H. E., Organisation of DNA in the eukaryotic nucleus, *Biol. Cell*, **44**: 201–212, 1982.
- [60] HENTZEN P. C., RHO J. H., BEKHOR I., Nuclear matrix DNA from chicken erythrocytes contains β -globin gene sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 304–307, 1984.
- [61] HERLAN G., WUNDERLICH F., Isolation of nuclear protein matrix from *Tetrahymena* macronuclei, *Cytobiologie*, **13**: 291–296, 1976.
- [62] HERMAN R., WEYMOUTH L., PENMAN S., Heterogeneous nuclear RNA-protein fibers in chromatin-depleted nuclei, *J. Cell Biol.*, **78**: 663–674, 1978.
- [63] HINZPETER M., DEPPERT W., Analysis of biological and biochemical parameters for chromatin and nuclear matrix association of SV40 large T antigen in transformed cells, *Oncogene*, **1**: 119–129, 1987.
- [64] HODGE R. D., MANCINI P., DAVIS F. M., HEYWOOD P., Nuclear matrix of HeLa S₃ cells, *J. Cell Biol.*, **72**: 194–208, 1977.
- [65] HUMPHREY G. W., PIGIET V., Protein disulfide crosslinking stabilizes a polyoma large T antigen-host protein complex on the nuclear matrix, *Exptl. Cell Res.*, **171**: 122–136, 1987.
- [66] INTRES R., DONADY J. J., A constitutively transcribed actin gene is associated with the nuclear matrix in a *Drosophila* cell line, *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, **21**: 641–648, 1985.
- [67] JACKSON D. A., MCCREADY S. J., COOK P. R., RNA is synthesized at the nuclear cage, *Nature*, **292**: 552–555, 1981.
- [68] JEPPESEN P. G. N., BANKIER A. T., A partial characterization of DNA fragments

- protected from nuclease degradation in histone depleted metaphase chromosomes of the Chinese hamster, *Nucl. Acids Res.*, **7**: 49–67, 1979.
- [69] JONES C., SU R. T., DNA polymerase alpha from the nuclear matrix of cells infected with simian virus 40, *Nucl. Acids Res.*, **10**: 5517–5532, 1982.
- [70] JOST J.-P., SELDRAN M., Association of transcriptionally active vitellogenin II gene with the nuclear matrix of chicken liver, *EMBO J.*, **3**: 2005–2008, 1984.
- [71] KAUFMANN S. H., COFFEY D. S., SHAPER J. H., Considerations in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope, and pore complex lamina, *Exptl. Cell Res.*, **132**: 105–123, 1981.
- [72] KAUFMANN S. H., GIBSON W., SHAPER J. H., Characterization of the major polypeptides of rat liver nuclear envelope, *J. Biol. Chem.*, **258**: 2710–2719, 1983.
- [73] KAUFMANN S. H., SHAPER J. H., A subset of non-histone nuclear proteins reversibly stabilized by the sulfhydryl crosslinking reagent tetrathionate, *Exptl., Cell Res.*, **155**: 477–495, 1984.
- [74] KAUFMANN S. H., FIELDS A. P., SHAPER J. H., The nuclear matrix: Current concepts and unanswered questions, [w:] *Meth. Achiev. Exp. Pathol.*, red. G. Jasmin, R. Simard (Karger, Basel), t. 12, 141–171, 1986.
- [75] KAUFMANN S. H., OKRET S., WIKSTROM A.-C., GUSTAFSSON J.-A., SHAPER J. H., Binding of the glucocorticoid receptor to the rat liver nuclear matrix, *J. Biol. Chem.*, **261**: 11962–11967, 1986.
- [76] KEPPEL F., Transcribed human ribosomal RNA genes are attached to the nuclear matrix, *J. Mol. Biol.*, **187**: 15–21, 1986.
- [77] KILIAŃSKA Z., KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ, L., Matriks jądrowa, *Post. Biochem.*, **24**: 431–442, 1978.
- [78] KIROV N., DJONDJUROV L., TSANEV R., Nuclear matrix and transcriptional activity of the mouse α -globin gene, *J. Mol. Biol.*, **180**: 601–614, 1984.
- [79] KIROV N., TSANEV R., Activated murine α -globin gene is not preferentially associated with the nuclear matrix, *Int. J. Biochem.*, **18**: 155–159, 1986.
- [80] KIRSCH T. M., MILLER-DIENER A., LITWACK G., The nuclear matrix is the site of glucocorticoid receptor complex action in the nucleus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **137**: 640–648, 1986.
- [81] KROHNE G., FRANKE W. W., ELY S., D'ARCY A., JOST E., Localization of a nuclear envelope-associated protein by indirect immunofluorescence microscopy using antibodies against a major polypeptide from rat liver fractions enriched in nuclear envelope-associated material, *Cytobiologie*, **18**: 22–38, 1978.
- [82] KUMARA-SIRI M. H., SHAPIRO L. E., SURKS M. I., Association of the 3,5,3'-triodo-L-thyronine nuclear receptor with the nuclear matrix of cultured growth hormone-producing rat pituitary tumor cells (GC cells), *J. Biol. Chem.*, **261**: 2844–2852, 1986.
- [83] LAM K. S., KASPAR C. B., Electrophoretic analysis of three major nuclear envelope polypeptides, *J. Biol. Chem.*, **254**: 11713–11720, 1979.
- [84] LEBKOWSKI J. S., LAEMMLI U. K., Evidence for two levels of DNA folding in histone-depleted HeLa interphase nuclei, *J. Mol. Biol.*, **156**: 309–324, 1982.
- [85] – Non-histone proteins and the long-range organisation of HeLa interphase DNA, *J. Mol. Biol.*, **156**: 325–344, 1982.
- [86] LEWIS C. D., LEBKOWSKI J. S., DALY A. K., LAEMMLI U. K., Interphase nuclear matrix and metaphase scaffolding structures, *J. Cell Sci. Suppl.*, **1**: 103–122, 1984.
- [87] LISCHWE M. A., SMETANA K., OLSON M. O. J., BUSCH H., Protein C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins, *Life Sci.*, **25**: 701–708, 1979.
- [88] LONG B. H., HUANG C.-Y., POGO A., Isolation and characterization of the nuclear matrix in Friend erythroleukemia cells: chromatin and hnRNA interactions with the nuclear matrix, *Cell*, **18**: 1079–1090, 1979.

- [89] LONG B. H., OCHS R. L., Nuclear matrix, hnRNA and snRNA in Friend erythroleukemia nuclei depleted of chromatin by low ionic strength EDTA, *Biol. Cell*, **48**: 89–98, 1983.
- [90] MARSDEN M. P. F., LAEMMLI U. K., Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model, *Cell*, **17**: 849–858, 1979.
- [91] MATSUMOTO L. H., Enrichment of satellite DNA on the nuclear matrix of bovine cells, *Nature*, **294**: 481–482, 1981.
- [92] MAYER D. T., GULICK A., The nature of the proteins of cellular nuclei, *J. Biol. Chem.*, **146**: 433–440, 1942.
- [93] McCREADY S. J., GODWIN J., MASON D. W., BRAZELL I. A., COOK P. R., DNA is replicated at the nuclear cage, *J. Cell Sci.*, **46**: 365–386, 1980.
- [94] McCREADY S. J., COOK P. R., Lesion induced in DNA by ultraviolet light are repaired at the nuclear cage, *J. Cell Sci.*, **70**: 189–196, 1984.
- [95] McKNIGHT S. L., MILLER O. L., Postreplicative nonribosomal transcription units in *D. melanogaster* embryos, *Cell*, **17**: 551–563, 1979.
- [96] MILLER T. E., HUANG C.-Y., POGO A. O., Rat liver nuclear skeleton and ribonucleoprotein complexes containing hnRNA, *J. Cell Biol.*, **76**: 675–691, 1978.
- [97] MIRKOWITZ J., MIRAULT M. E., LAEMMLI U. K., Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold, *Cell*, **39**: 223–232, 1984.
- [98] MIRSKY A. E., RIS H., The chemical composition of isolated chromosomes, *J. Gen. Physiol.*, **31**: 7–18, 1947.
- [99] MULLENDERS L. H. F., EYGENSTEYN J., BROEN A., WANKA F., Composition and DNA-binding properties of the nuclear matrix proteins from mammalian cell nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **698**: 70–77, 1982.
- [100] MULLENDERS L. H. F., van KESTEREN A. C., BUSSMAN C. J. M., van ZEELAND A. A., NATARAJAN A. T., Preferential repair of nuclear matrix associated DNA in *Xeroderma pigmentosum* complementation group C, *Mutation Res.*, **141**: 75–82, 1984.
- [101] NAKAYASU H., MORI H., UEDA K., Association of small nuclear RNA-protein complex with the nuclear matrix from bovine lymphocytes, *Cell Struct. Funct.*, **7**: 253–262, 1982.
- [102] NAKAYASU H., UEDA K., Small nuclear RNA-protein complex anchors on the actin filaments in bovine lymphocyte nuclear matrix, *Cell. Struct. Funct.*, **9**: 317–325, 1984.
- [103] – Association of rapidly-labelled RNAs with actin in nucleolar matrix from mouse L5178Y cells, *Exptl. Cell Res.*, **160**: 319–330, 1985.
- [104] NELKIN B., PARDOLL D., ROBINSON S., SMALL D., VOGELSTEIN B., Nuclear structure and RNA organization, [w:] *Tumor Cell Heterogeneity*, Acad. Press Inc., 441–457, 1982.
- [105] NEWPORT J. W., FORBES D. J., The nucleus: structure, function, and dynamics, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**: 535–565, 1987.
- [106] NISHIZAWA M., TANABE K., TAKAHASHI T., DNA polymerases and DNA topoisomerases solubilized from nuclear matrices of regenerating rat livers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **124**: 917–923, 1984.
- [107] NORDSTROM J. L., CIEJEK E. M., TSAI M.-J., O'MALLEY B. W., Unprocessed RNA molecules are associated with the nuclear matrix, [w:] *Perspectives on Genes and the Molecular Biology of Cancer*, red. D. L. Robberson, G. F. Saunders, Raven Press, New York 1982, 125–141.
- [108] NOSE K., Characterization of nuclear matrix from cultured normal human fibroblasts, *J. Biochem.*, **99**: 1385–1391, 1986.
- [109] OLSON M. O. J., WALLACE M. O., HERRERA A. H., MARSHALL-CARLSON L., HUNT R. C., Preribosomal ribonucleoprotein particles are a major component of a nucleolar matrix fraction, *Biochemistry*, **25**: 484–491, 1986.

- [110] OTTAVIANO Y., GERACE L., Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis, *J. Biol. Chem.*, **260**: 624-632, 1985.
- [111] PARDOLL D. M., VOGELSTEIN B., Sequence analysis of nuclear matrix associated DNA from rat liver, *Exptl. Cell Res.*, **128**: 466-470, 1980.
- [112] PARDOLL D. M., VOGELSTEIN B., COFFEY D. S., A fixed site of DNA replication in eukaryotic cells, *Cell*, **19**: 527-536, 1980.
- [113] PAULSON J. R., LAEMMLI U. K., The structure of histone-depleted metaphase chromosomes, *Cell*, **12**: 817-828, 1977.
- [114] PETERS K. E., COMINGS D. E., Two-dimensional gel electrophoresis of rat liver nuclear washes, nuclear matrix and hnRNA proteins, *J. Cell Biol.*, **86**: 135-155, 1980.
- [115] PIECK A. C. M., van der VELDEN H. M. W., RIJKEN A. A. M., NEIS J. M., WANKA F., Protein composition of the chromosomal scaffold and interphase nuclear matrix, *Chromosoma*, **91**: 137-144, 1985.
- [116] PIECK A. C. M., RIJKEN A. A. M., WANKA F., Nuclear matrix and chromosome scaffold preparations of in vitro cultured bovine liver cells have two proteins in common, *FEBS Lett.*, **212**: 276-280, 1987.
- [117] PIENTA K. L., COFFEY D. S., A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome, *J. Cell Sci. Suppl.*, **1**: 123-135, 1984.
- [118] PIETRAS R. J., SZEGO C. M., Specific internalization of estrogen and binding to nuclear matrix in isolated uterine cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**: 84-91, 1984.
- [119] PINON R., SALTS Y., Isolation of folded chromosomes from yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 2850-2854, 1977.
- [120] POGO A. O., PROCYK R., Nonhistone proteins and nuclear matrix structures, [w:] *Progress in Nonhistone Protein Research*, red. I. Bekhor, CRC Press Inc., Boca Raton, t. II, 131-149, 1985.
- [121] POZNANOVIC G., SEVALJEVIC L., The retention of core ribonucleoproteins in the nuclear matrix isolated from nuclei treated with the phenantroline-copper complex, *Cell Biol. Int. Rep.*, **10**: 55-63, 1986.
- [122] RAZIN S. V., MANTIEVA V. L., GEORGIEV G. P., The similarity of DNA sequences remaining bound to scaffold upon nuclease treatment of interphase nuclei and metaphase chromosomes, *Nucl. Acids Res.*, **7**: 1713-1735, 1979.
- [123] RAZIN S. V., CHERNOKHVOSTOV V. V., ROODYN A. V., ZBARSKY I. B., GEORGIEV G. P., Proteins tightly bound to DNA in the regions of DNA attachment to the skeletal structures of interphase nuclei and metaphase chromosomes, *Cell*, **27**: 65-73, 1981.
- [124] RAZIN S. V., CHERNOKHVOSTOV V. V., YAROVAYA O. V., GEORGIEV G. P., Organization of the sites for DNA attachment to the nonhistone proteinaceous nuclear skeleton, [w:] *Progress in Nonhistone Protein Research*, red. I. Bekhor, CRC Press, Inc. Boca Raton, t. II, 92-114, 1985.
- [125] RAZIN S. V., YAROVAYA O. V., Initiated complexes of RNA polymerase II are concentrated in the nuclear skeleton associated DNA, *Exptl. Cell Res.*, **158**: 273-275, 1985.
- [126] RAZIN S. V., YAROVAYA O. V., GEORGIEV G. P., Low ionic strength extraction of nuclease-treated nuclei destroys the attachment of transcriptionally active DNA to the nuclear skeleton, *Nucl. Acids Res.*, **13**: 7427-7444, 1985.
- [127] ROBINSON S. I., NELKIN B. D., VOGELSTEIN B., The ovalbumin gene is associated with the nuclear matrix of chicken oviduct cells, *Cell*, **28**: 99-106, 1982.
- [128] ROBINSON S. I., SMALL D., IDZERDA R., McKNIGHT G. S., VOGELSTEIN B., The association of transcriptionally active genes with the nuclear matrix of the chicken oviduct, *Nucl. Acids Res.*, **11**: 5113-5130, 1983.

- [129] ROSS D. A., YEN, R.-W., CHAE, C.-B., Association of globin ribonucleic acid and its precursors with the chicken erythroblast nuclear matrix, *Biochemistry*, **21**: 764–771, 1982.
- [130] SEVALJEVIC L., PETROVIC M., POZNANOVIC G., KONSTANTINOVIC M., On the similarity between the nuclear network and chromatin nonhistone proteins of sea urchin embryos, *Cell. Mol. Biol.*, **27**: 147–157, 1981.
- [131] SHANKAR-NARAYAN K., STEELE W. J., SMETANA K., BUSCH H., Ultrastructural aspects on the ribonucleoprotein network in nuclei of Walker tumor and rat liver, *Exptl. Cell Res.*, **46**: 65–77, 1967.
- [132] SHELTON K. R., HIGGINS L. L., COCHRAN D. L., RUFFOLO J. J., EGGLE P. M., Nuclear lamins of erythrocyte and liver, *J. Biol. Chem.*, **255**: 10978–10983, 1980.
- [133] SHELTON K. R., GUTHRIE V. H., COCHRAN D. L., Oligomeric structure of the major nuclear envelope protein lamin B, *J. Biol. Chem.*, **257**: 4328–4332, 1982.
- [134] SIMARD R., BIBOR-HARDY V., DAGENAIS A., BERNARD M., PINARD M.-F., Role of the nuclear matrix during viral replication, *Meth. Achiev. Exp. Pathol.*, **12**: 172–199, 1986.
- [135] SMALL D., NELKIN B., VOGELSTEIN B., Nonrandom distribution of repeated DNA sequences with respect to supercoiled loops and the nuclear matrix, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 5911–5915, 1982.
- [136] – The association of transcribed genes with the nuclear matrix of *Drosophila* cells during heat shock, *Nucl. Acids Res.*, **13**: 2413–2431, 1985.
- [137] SMETANA K., STEELE W. J., BUSCH H., A nuclear ribonucleoprotein network, *Exptl. Cell Res.*, **31**: 198–201, 1963.
- [138] SMITH H. C., BEREZNEY R., DNA polymerase is tightly bound to the nuclear matrix of actively replicating liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**: 1541–1547, 1980.
- [139] SMITH H. C., PUVION E., BUCHHOLTZ L. A., BEREZNEY R., Spatial distribution of DNA loop attachment and replicational sites in the nuclear matrix, *J. Cell Biol.*, **99**: 1794–1802, 1984.
- [140] SMITH H. C., OCHS R. C., FERNANDEZ E. A., SPECTOR D. L., Macromolecular domains containing nuclear protein p107 and U-snRNP protein p28: further evidence for an *in situ* nuclear matrix, *Mol. Cell. Biochem.*, **70**: 151–168, 1986.
- [141] SMITH H. C., ROTHBLUM L. I., Ribosomal DNA sequences attached to the nuclear matrix, *Biochem. Genet.*, **25**: 863–879, 1987.
- [142] STAUFENBIEL M., DEPPERT W., Intermediate filament systems are collapsed onto the nuclear surface after isolation of nuclei from tissue culture cells, *Exptl. Cell Res.*, **138**: 207–214, 1982.
- [143] STAUFENBIEL M., DEPPERT W., Different structural systems of the nucleus are targets for SV40 large T antigen, *Cell*, **33**: 173–181, 1983.
- [144] TSUTSUI Y., NISHIYAMA Y., YOSHIDA S., MAENO K., HOSHINO M., Role of the nuclear matrix in the growth of herpes simplex virus type 2, *Arch. Virol.*, **71**: 27–38, 1983.
- [145] TUBO R. A., SMITH H. C., BEREZNEY R., The nuclear matrix continues DNA synthesis at *in vivo* replicational forks, *Biochim. Biophys. Acta*, **825**: 326–334, 1985.
- [146] TUBO R. A., BEREZNEY R., Pre-replicative association of multiple replicative enzyme activities with the nuclear matrix during rat liver regeneration, *J. Biol. Chem.*, **262**: 1148–1154, 1987.
- [147] – Nuclear matrix-bound DNA primase, *J. Biol. Chem.*, **262**: 6637–6642, 1987.
- [148] UEYAMA H., MATSUURA T., NOMI S., NAKAYASU H., UEDA K., Binding of benzopyrene to rat liver nuclear matrix, *Life Sci.*, **29**: 655–660, 1981.
- [149] van der VELDEN H. M. W., van WILLIGEN G., WETNELS R. H. W., WANKA F., Attachment of origins of replication to the nuclear matrix and the chromosomal scaffold, *FEBS Lett.*, **171**: 13–16, 1984.

- [150] van der VELDEN H. M. W., WANKA F., The nuclear matrix – its role in the spatial organization and replication of eukaryotic DNA, *Mol. Biol. Rep.*, **12**: 69–77, 1987.
- [151] van EEKELEN C. A. G., van VENROOIJ W. J., HnRNA and its attachment to a nuclear protein matrix, *J. Cell Biol.*, **88**: 544–563, 1981.
- [152] van EEKELEN C. A. G., SALDEN M. H. L., HABETS W. J. A., van de PUTTE L. B. A., van VENROOIJ W. J., On the existence of an internal nuclear protein structure in HeLa cells, *Exptl. Cell Res.*, **141**: 181–190, 1982.
- [153] van STRAATEN J. P., RABBITS T. H., The c-myc protein is associated with the nuclear matrix through specific metal interaction, *Oncogene Res.*, **1**: 221–228, 1987.
- [154] VERHEIJEN R., KUIJPERS H., VOOIJS P., van VENROOIJ W., RAMAEKERS F., Protein composition of nuclear matrix preparations from HeLa cells: an immunochemical approach, *J. Cell Sci.*, **80**: 103–122, 1986.
- [155] VERHEIJEN R., KUIJPERS H., VOOIJS P., van VENROOIJ W., REMAEKERS F., Distribution of the 70K U1 RNA-associated protein during interphase and mitosis, *J. Cell Sci.*, **86**: 173–190, 1986.
- [156] VOGELSTEIN B., PARDOLL D. M., COFFEY D. S., Supercoiled loops and eukaryotic DNA replication, *Cell*, **22**: 79–85, 1980.
- [157] VOGELSTEIN B., HUNT B. F., A subset of small nuclear ribonucleoprotein particle antigens is a component of the nuclear matrix, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**: 1224–1232, 1982.
- [158] WANKA F., PIECK A. C. M., BEKERS A. G. M., MULLENDERS L. H. F., The attachment of replicating DNA to the nuclear matrix, [w:] *The Nuclear Envelope and the Nuclear Matrix*, red G. G. Maul, Alan R. Liss Inc., New York 1982, 199–211.
- [159] WĘSIERSKA-GĄDEK J., SAUERMAN G., Modification of nuclear matrix proteins by ADP-ribosylation, *Eur. J. Biochem.*, **153**: 421–428, 1985.
- [160] WRAY V. P., ELGIN S. C. R., WRAY W., Proteins of metaphase chromosomes and interphase chromatin, *Nucl. Acids Res.*, **8**: 4155–4163, 1980.
- [161] WOOD S. H., COLLINS J. M., Preferential binding of DNA primase to the nuclear matrix in HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **261**: 7119–7122, 1986.
- [162] YAMAMOTO S., TAKAHASHI T., MATSUKAGE A., Tight association of DNA polymerase *a* with granular structures in the nuclear matrix of chick embryo cell: immunocytochemical detection with monoclonal antibody against DNA polymerase *a*, *Cell Struct. Funct.*, **9**: 83–90, 1984.
- [163] ZBARSKY I. B., GEORGIEV G. P., Cytological characteristics of protein and nucleoprotein fractions of cell nuclei, *Biochim. Biophys. Acta.*, **32**: 301–302, 1959.
- [164] ZERLAUTH G., WĘSIERSKA-GĄDEK J., SAUERMAN G., Fibronectin observed in the nuclear matrix of HeLa tumour cells, *J. Cell Sci.*, **89**: 415–421, 1988.

Otrzymano: 29 sierpnia 1988 r.

Przyjęto: 5 września 1988 r.

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

MIEJSCA ŁAMLIWE W GENOMIE CZŁOWIEKA: ZNACZENIE TEORETYCZNE I PRAKTYCZNE

FRAGILE SITES IN HUMAN GENOME: THEORETICAL AND PRACTICAL SIGNIFICANCE

Grzegorz GÓRSKI, Halina ANTOSZ

Samodzielna Pracownia Genetyki Człowieka Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie. Przedstawiono udział dziedzicznych i powszechnych miejsc łamliwych w indukcji przemieszczeń chromosomowych. Zależności między łamliwymi miejscami, nieprzypadkowymi miejscami złamań i przemieszczeń chromosomów w komórkach nowotworowych a lokalizacją protoonkogenów pozwala sugerować molekularny mechanizm kancerogenezy.

Summary. The role of the heritable and common fragile sites in the induction of chromosomal rearrangements was discussed. The correlations among the fragile sites, specific cancer chromosome breakpoints and localization of oncogenes let to speculate the molecular mechanism of cancerogenesis.

Wykaz stosowanych skrótów

- h-fra — dziedziczne miejsce łamliwe (heritable fragile site)
- r-fra — rzadkie miejsce łamliwe (rare fragile site)
- c-fra — konstytutywne lub powszechne miejsce łamliwe (constitutive or common fragile site)
- t — translokacja
- inv — inwersja
- del — delecja
- ter — terminalny lub końcowy
- p — krótkie ramiona chromosomu
- q — długie ramiona chromosomu
- q⁺ — naddatek części ramion długich chromosomu
- ; — rozdzielenie dwóch morfologicznie zmienionych chromosomów przy translokacji zrównoważonej

→	– od – do
MTX	– methotrexate (ametoptyryna)
FdU	– fluorodezoksyurydyna
PHA	– fitohemaglutynina
Ig	– immunoglobulina
V _H	– segment genu kodujący część zmienną łańcucha ciężkiego immunoglobuliny (variable)
D	– segment genu kodujący odcinek superzmienny łańcucha ciężkiego immunoglobuliny (diversity)
J _H	– segment genu kodujący część zrębu łańcucha ciężkiego immunoglobuliny (joining)
V _L	– segment genu kodujący część zmienną łańcucha lekkiego immunoglobuliny
J _L	– segment genu kodujący część zrębu łańcucha lekkiego immunoglobuliny (variable)
PDGF	– płytkowopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor)
EGF	– czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor)
CSF-1	– czynnik pobudzający wytwarzanie kolonii (colony stimulating factor)

Łamliwe miejsca w chromosomach człowieka przez wiele lat uważane były za zwykle zjawisko cytogenetyczne, które pojawia się przypadkowo w hodowli in vitro. Większe zainteresowanie tym zagadnieniem datuje się od chwili, gdy Lubs [49] wykazał, że łamliwość długich ramion chromosomu X jest dziedziczna i towarzyszy temu zjawisku niedorozwój umysłowy. Harvey i wsp. [25] stwierdzili, że łamliwe miejsce w terminalnym segmencie chromosomu X jest cytologicznym markerem upośledzenia umysłowego, sprzężonego z płcią, w postaci klinicznej opisywanej przez Martina i Bell już w 1943 r. [51]. Dało to początek poszukiwaniom łamliwego miejsca Xq27 w przypadkach niedorozwoju umysłowego, jak również poszukiwaniom miejsc łamliwych w innych chromosomach, w przypadkach różnych schorzeń. Hecht i Kaiser-McCaw [27] twierdzą, że łamliwe miejsca są jednym z najciekawszych fenomenów cytogenetycznych. Od 1985 r. pojawiły się pierwsze doniesienia o występowaniu łamliwych miejsc także u innych ssaków [43, 64, 73].

Wyodrębniono dwie duże grupy miejsc łamliwych:

- 1) dziedziczne lub rzadkie (heritable or rare fragile sites = h-fra lub r-fra);
- 2) konstytutywne lub powszechne (constitutive or common fragile sites = c-fra).

Oba typy miejsc łamliwych cechuje swoista, bardzo dokładna, dotycząca tego samego prążka i podprążka, lokalizacja w chromosomach.

Grupa pierwsza ma od 18 [54, 63, 64] do 21 [15] miejsc łamliwych. Występują one rodzinnie, dziedziczają się w sposób mendelowski dominująco

i z wyjątkiem łamliwego miejsca w chromosomie X — fraXq27; w przeważającej większości nie powodują zmian fenotypowych, ani objawów klinicznych [2, 26, 66].

Druga grupa to miejsca łamliwe nabyte, konstytutywne, które można spostrzec przypadkowo. Są one przeważnie następstwem działania czynników fizycznych lub chemicznych, najczęściej mutagenu lub karcinogenu, np. antyfolianu MTX, FdU, i występują często w komórkach nowotworowych. Miejsc tego typu jest dużo, od 72 podanych przez Miro i wsp. [54] i 90 przez Ahuja [2] do 110 indukowanych doświadczalnie i analizowanych przez grupę Yunisa [81]. Coraz większa liczba nowo opisywanych miejsc łamliwych skłoniła jedną z grup badaczy, zajmujących się tym zagadnieniem, do zaproponowania dla tej nowej dyscypliny naukowej nazwy fragilesitologia [2].

1. POWSZECHNE MIEJSCA ŁAMLIWE C-FRA

Yunis i Soreng [80] w 1984 r. wysunęli koncepcję możliwej korelacji między lokalizacją miejsc łamliwych indukowanych *in vitro* mutagenem w hodowanych limfocytach zdrowych osób (inducible fragile sites) a punktami złamań chromosomów w charakterystycznych przemieszczeniach (rearrangement), występujących nieprzypadkowo w komórkach nowotworowych (specific cancer chromosome breakpoints). Dalsze szczegółowe badania tych autorów [81] wykazały, że prawie połowa (50 na 110) miejsc łamliwych indukowanych mutagenem c-fra pokrywa się na mapie chromosomów zróżnicowanych wzorem prążkowym z 67% charakterystycznych punktów złamań określających nowotworową aberrację chromosomową (50 na 75 punktów złamań). Natomiast lokalizacja 72% protoonkogenów (26 na 36 znanych onkogenów) pokrywa się z c-fra (ryc. 1). Zbieżność ta polegała częściowo na umiejscowieniu w obrębie tego samego prążka lub identycznego podprążka.

Yunis i wsp. [81] użyli 16 różnych mutagenów, wzmacniając efekt ich działania kofeiną. Stwierdzili, że różne mutageny użyte razem z kofeiną powodowały około 1200 złamań chromosomów na 100 analizowanych mitoz. Definicję miejsca c-fra uściślono następująco: przyjmując, że każdy z 650 prążków chromosomowych ma tę samą szansę złamania, spodziewana liczba przypadkowych złamań przypadających na dany prążek wynosi 1,8 (przy notowaniu około 1200 złamań wywołanych mutagenem). Jeżeli jednak liczba złamań w tym samym miejscu była co najmniej 5 razy większa w komórkach od 4 osób na 5 badanych lub w komórkach od 6 osób na 8 badanych, to takie miejsca kwalifikowano jako c-fra z prawdopodobieństwem odpowiednio $p = 0,04$ lub $p < 0,0001$. Wyniki tych ostatnich badań wskazały jednocześnie na fakt, że duża liczba miejsc łamliwych w ludzkich chromosomach jest docelowym miejscem działania wielu mutagenów i karcinogenów oraz odwrot-

nie, że zachodzi pewna generalnie wybiórcza lokalizacja uszkodzeń w obrębie chromosomów po zadziałaniu mutagenami i karcinogenami. Przypuszcza się, że duża część c-fra odpowiada miejscom superpodatnej chromatyny (hipersensitive chromatin) aktywnych genów bogatych w guaninę [7, 81]. Wskazuje na to znacznie większa proporcja c-fra po zadziałaniu takimi mutagenami, jak dwumetylosiarczan i aldehyd bromooctowy, których mechanizm działania polega na metylowaniu zasad guanylowych [81].

2. C-FRA A ABERRACJE CHROMOSOMÓW W PROLIFERACJACH NOWOTWOROWYCH B-LIMFOCYTOWYCH

W ostatnich latach poświęcono szczególną uwagę tym różnym aberracjom chromosomowym (jest ich niewiele ponad 10), charakterystycznych dla określonego typu białaczki, w których określone przemieszczenia genów nastąpiły w określonych punktach złamań, przy czym 1 lub 2 punkty złamań pokrywają się z indukowanym doświadczalnie miejscem łamliwym c-fra. Należą do nich: przemieszczenia locus protoonkogenu c-myc, bcl-1, bcl-2 z różnymi loci genów ciężkich i lekkich łańcuchów immunoglobulinowych [1, 8, 12, 13, 68, 71, 72]; przemieszczenie w obrębie locus protoonkogenu H-ets, wszystkie spotykane w komórkach różnego typu chłoniaków B-komórkowych [8, 9, 42], a także w komórkach szpiczaka mnogiego [74]; 4 różne przemieszczenia loci łańcucha alfa i beta receptora antygeny limfocytów T w komórkach białaczek T-limfocytowych [8, 9, 16, 28] oraz najwcześniej wykryte przemieszczenia locus protoonkogenu c-abl i regionu bcr w przewlekłej białaczce szpikowej [30, 31, 35]. Le Beau i Rowley [42, 61] opisały niedawno pęknięcie kompleksu loci genowych interferonu i metalothioneiny w dwóch typach ostrej białaczki mielomonocytovej. Topografia kolejno wymienionych przemieszczeń przedstawia się następująco:

- | | |
|---|---|
| I. Chłoniaki i białaczki B-komórkowe | 1. t/8;14//q24;q32/
2. t/8;22//q24;q11//
3. t/2;8//p11;q24/
4. t/11;14//q13;q32/
5. t/14;18//q32;q21/ |
| II. Rozrosty nowotworowe T-komórkowe | 6. t/8;14//q24;q11/
7. t/7;14//q34;q11/
8. t/7;14//p13;q11/
9. inv/14//q11.2;q32.2/ |
| III. Przewlekła białaczka szpikowa i ostre mielomonocytovej | 10. t/9;22//q34;q11/
11. t/9;11//p22;q23/
12. inv/16//p13;q22/ |

Więcej uwagi poświęcimy badaniom molekularnym ludzkich białaczek limfocytowych, chłoniaków i ich linii komórkowych in vitro. Są to w dużej

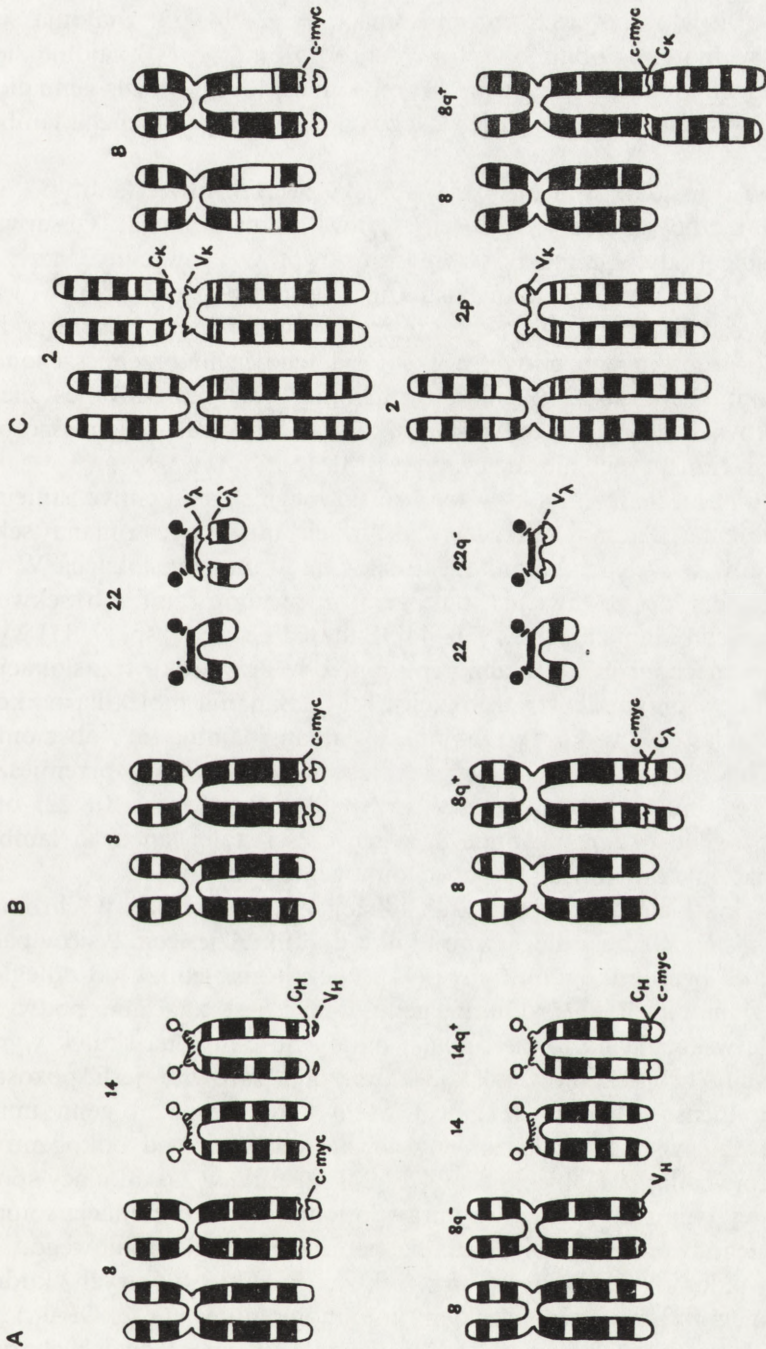
mierze wyniki badań grupy Croce i grupy Yunisa w USA. Przebieg tych badań jest dlatego pouczający, że procesy wzrostu i różnicowania limfocytów (interleukiny, ich receptory, geny strukturalne Ig, geny receptorów antygenów komórki T) zostały szczegółowo zbadane. Zaburzenia tych procesów daje się wykryć na szczeblu molekularnym w zrekombinowanym genomie.

3. BADANIA MOLEKULARNE W CHŁONIAKACH B-KOMÓRKOWYCH

W chłoniaku B-komórkowym z translokacją t/11;14/ miejsce złamania w chromosomie 11 występuje zawsze w prążku q13 (pokrywa się z c-fra), natomiast w chromosomie 14 w q32 (także pokrywa się z c-fra) i obejmuje bezpośrednio locus genu ciężkiego łańcucha immunoglobulinowego [9, 60, 71, 72]. W prążku q13 chromosomu 11 znajduje się locus protoonkogenu bcl-1, którego ekspresję wzmacnia sąsiedztwo genu łańcucha ciężkiego immunoglobuliny, przemieszczonego w wyniku wymiennej translokacji t/11;14/ [9, 71, 72]. Jest to tym bardziej ciekawe, że punkt złamania w chromosomie 11, obserwowany w nowotworach B-komórkowych z tą translokacją t/11;14/, obejmuje bardzo niewielki odcinek DNA zawierający około 3,5 tysiąca par zasad [72]. Dowodzi to, że tego typu translokacja nie jest spowodowana przypadkowym pęknięciem chromosomu w okolicy locus protoonkogenu, lecz złamaniem w specyficznym łańcuchowym miejscu.

W chłoniaku grudkowym (follicular lymphoma) obserwuje się translokację t/14;18/ [68, 69, 78]. W tych przypadkach punkt złamania w chromosomie 18 pokrywa się z c-fra i obejmuje prążek q21, w którym znajduje się locus protoonkogenu bcl-2 [9, 68]. Wynikła z translokacji bliskość locus ciężkiego łańcucha immunoglobulinowego i onkogenu bcl-2 powoduje wzmożoną ekspresję tego ostatniego. Translokację t/14;18/ obok t/8;14/ opisano także w ostrej białaczce limfoblastycznej B-komórkowej B-ALL [9], przy czym interesujący jest fakt, że obydwie wymienione translokacje mogą występować w tych samych komórkach nowotworowych.

Badania hybrydów komórkowych w liniach i klonach komórek chłoniaka Burkitta pozwoliły udowodnić, że obserwowany chromosom 14q+ ma przemieszczony z chromosomu 8 fragment zawierający protoonkogen c-myc [1, 12, 13]. Początkowo sądzono, że translokacja t/8;14/ jest jedynym markerem chłoniaków typu Burkitta. Jednak w ciągu ostatnich lat opisano w tych nowotworach różne translokacje chromosomowe, obejmujące ten sam segment chromosomu 8, przemieszczony albo do krótkiego ramienia chromosomu 2, albo do długiego ramienia chromosomu 22 (ryc. 2) [9, 46]. Translokacja t/8;14/ obserwowana jest u około 75% przypadków chłoniaków typu Burkitta, t/8;22/ u około 16%, a t/2;8/ u około 9% [9]. Za każdym razem jednak, bez względu na rodzaj translokacji, przenoszony jest fragment chromosomu 8q24→qter zawierający protoonkogen c-myc. Dalsze badania nad lokalizacją genów



Ryc. 2

wykazały, że w tych trzech chromosomach, tj. 2, 14, 22, znajdują się geny łańcuchów immunoglobulinowych. W chromosomie 2p11 znajduje się locus genu lekkiego łańcucha kappa, w chromosomie 14q32 – locus genu ciężkiego łańcucha, a w chromosomie 22q11.2 locus genu lekkiego łańcucha lambda [10, 20, 50].

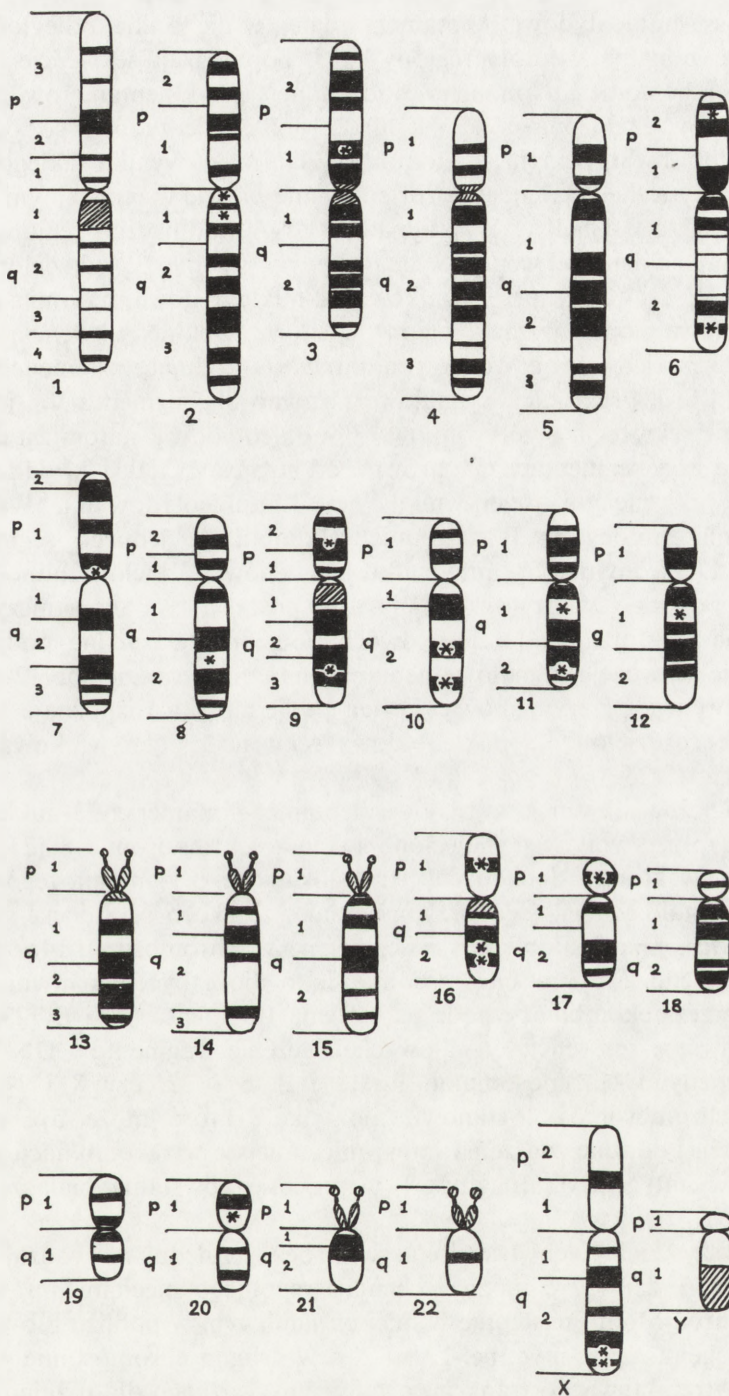
Z tymi translokacjami ma bardzo bliski związek nowy fenotyp komórki, a w ostatecznej konsekwencji jej złośliwa transformacja. Obserwuje się jednocześnie podwyższenie poziomu transkryptów genu *c-myc*, tzw. białko *c-myc* p57 [19]. Wyniki badań Nishikury i wsp. [59] oraz Croce i wsp. [11] wskazują również, że istnieją zasadnicze różnice między ekspresją komórkowego protoonkogenu *c-myc*, a ekspresją tego genu przemieszczonego do chromosomu 2, 14 lub 22. Nienaruszony komórkowy gen *c-myc* jest nieaktywny w całkowicie zróżnicowanych komórkach B, natomiast przemieszczony gen *c-myc* jest transkrypcyjnie aktywny [11, 19, 59].

Na temat mechanizmu aktywacji transkrypcyjnej genu *c-myc* istnieją różne przypuszczenia. Jedną z przyczyn aktywacji może być zmiana sekwencji nukleotydów w sąsiedztwie onkogenu spowodowana translokacją. W wyniku tego dochodzi do zestawienia onkogenu z promotorami lub sekwencjami wzmacniającymi innych genów [36, 44]. Badania Croce i wsp. [9, 11] wykazują nieco inny mechanizm aktywacji genu *c-myc* w przypadku translokacji t/2;8/ i t/8;22/ niż w przypadku translokacji t/8;14/. Badania molekularne komórek z translokacją t/2;8/ wykazały, że punkty złamań znajdują się wobec onkogenu *c-myc* w orientacji 3', a część stała lekkiego łańcucha kappa przemieszcza się do tego regionu [11]. Natomiast w przypadku translokacji t/8;22/ onkogen *c-myc* pozostaje w chromosomie 8, a gen części stałej łańcucha lambda jest przemieszczony do końca 3' wobec onkogenu *c-myc* [19].

We wszystkich tych typach translokacji punkty złamań w chromosomie 8 mogą występować w odległości od kilku do kilkudziesięciu tysięcy par zasad od końca 3' protoonkogonu *c-myc* [11]. Niezależnie jednak od odległości od punktu złamania ilość produktu genu *c-myc* jest znacznie podwyższona. Wyniki te wskazują na to, że funkcja onkogenu *c-myc* na skutek wymiennej translokacji chromosomów zostaje zaburzona zarówno jeśli pozostaje on w swoim locus, jak również nawet wtedy, gdy fragment genu immunoglobulinowego zostaje przyłączony w pewnej odległości od onkogenu *c-myc*.

Ostatnie badania Haluski i wsp. [23, 24] sugerują w zaskakujący sposób, że u podstawy tych translokacji leży prawdopodobnie rekombinacja somatyczna DNA, zachodząca podczas składania genu immunoglobulinowego.

Jak wiadomo, dokładna analiza sekwencji nukleotydowych, kodujących część zmienną łańcuchów ciężkich immunoglobuliny (V_H , D, J_H) i część zmienną łańcuchów lekkich (V_L , J_L), ujawniła obecność dwóch charakterystycznych sekwencji DNA w pobliżu miejsca, gdzie zachodzi rekombinacja. Po stronie 3' regionów V_H i V_L znajdują się zawsze charakterystyczne sekwencje



Ryc. 3

sygnałowe 7-nukleotydowe (heptamer) i dalej, w niewielkiej odległości 9-nukleotydowe (nonamer). Z kolei regiony J_H i J_L poprzedzają sekwencje sygnałowe nonamer i heptamer. Nonamery oddzielone są od heptamerów sekwencją przerywnikową, złożoną z 12 ± 1 lub 23 ± 1 nukleotydów, co odpowiada jednemu lub dwóm pełnym skrętom helisy DNA. W wyniku takiego ułożenia te dwie specyficzne sekwencje są zorientowane prawie w tym samym kierunku w stosunku do osi helisy. W przypadku DNA kodującego regiony V_L i J_L łańcuchów lekkich, sekwencje sygnałowe po stronie 3' oddzielone są od segmentu V_L sekwencją przerywnikową 12-nukleotydową, natomiast sekwencje sygnałowe poprzedzające region J_L są rozdzielone sekwencją przerywnikową 23-nukleotydową. W przypadku DNA kodującego łańcuchy ciężkie (region V_H -D- J_H) sekwencje sygnałowe zarówno dla segmentu V_H , jak i J_H są rozdzielone sekwencją przerywnikową 23-nukleotydową, natomiast sekwencje sygnałowe przy segmentach D zarówno od strony V_H , jak i J_H oddzielone są krótkimi sekwencjami przerywnikowymi 12-nukleotydowymi. W procesie dojrzewania limfocytów B następuje rekombinacja jednego segmentu V_H z jednym D i jednym J_H (w przypadku łańcuchów ciężkich immunoglobulin), przez co powstaje zwarty egzon VDJ. W procesie tym uczestniczy swoista rekombinaza, która składa się z dwóch podjednostek. Jedna podjednostka rozpoznaje sekwencje sygnałowe heptamer-nonamer rozdzielone 12-nukleotydową sekwencją przerywnikową. Druga podjednostka rozpoznaje sekwencje sygnałowe rozdzielone 23-nukleotydową sekwencją przerywnikową. Jest to tzw. reguła 12/23.

Analogiczne sekwencje sygnałowe heptamer-nonamer z 23-nukleotydową sekwencją przerywnikową znaleziono także w chromosomie 8 [23, 24] i to w miejscu, w którym dochodzi do translokacyjnego złamania tego chromosomu. Powstało wobec tego przypuszczenie, że skoro sekwencja sygnałowa podobna do tej, jaką spotykamy w segmencie V_H chromosomu 14q, występuje w pobliżu genu c-myc w chromosomie 8, to może być ona mylnie rozpoznawana przez rekombinazy podczas łączenia fragmentu V_H i D [23, 24, 70]. Rozpoznawanie sekwencji sygnałowych i łączenie fragmentów DNA między dwoma różnymi chromosomami, np. 8 i 2, 8 i 22, czy 8 i 14 zamiast wewnątrzchromosomowo, stanowi „pomyłkę”, która może być podstawą translokacji. Podobne zdarzenia mogą mieć miejsce w rekombinacji genów Ig receptorów antygeny limfocytów T w procesie powstania białaczek T-limfocytowych.

We wszystkich tych translokacjach, bez względu na rodzaj procesu chorobowego, zauważyć można schemat wspólnego mechanizmu. Złamanie jednego chromosomu następuje w miejscu łamliwym w pobliżu lub w obrębie protoonkogenu, np. c-myc, bcl-1, bcl-2, a w drugim chromosomie w pobliżu lub wewnątrz aktywnego transkrypcyjnie genu, ważnego dla różnicowania się danej populacji komórkowej. W wyniku wymiennej translokacji w pobliżu

aktywnego genu, jego promotora lub sekwencji wzmacniającej (enhancer) pojawia się nieaktywny do tej pory, transkrypcyjnie „cichy” onkogen lub jego egzony. To nowe sąsiedztwo najprawdopodobniej jest przyczyną uaktywnienia onkogeny. Produktem onkogenów są białka, które mogą zastępować:

1) peptydy regulujące w warunkach fizjologicznych wzrost komórek, np. produkt onkogeny c-sis – białko p28 strukturalnie i funkcjonalnie podobne do części PDGF (płytkowopochodnego czynnika wzrostu – platelet-derived growth factor) [17, 40, 76, 77];

2) białka regulujące cykl komórkowy, np. produkty onkogenów c-myc i c-fos białka p57 i p55 – regulujące aktywność transkrypcyjną, czy onkogeny c-abl – p150 oraz onkogenów c-H-ras-1, c-K-ras-2, N-ras – białko p21 – wszystkie wpływające na wewnątrzkomórkowe przeniesienie sygnału [3, 12, 13, 22, 33];

3) wreszcie białka o właściwościach receptorów dla czynników wzrostu, np. produkty onkogenów c-erb-B i c-neu – białka p170 i p185 receptor dla EGF (czynnika wzrostu naskórka – epidermal growth factor), czy produkt onkogeny c-fms – białko p170 – receptor dla CSF-1 (czynnika pobudzającego wytwarzanie kolonii – colony stimulating factor) [4, 18, 32, 34, 41, 53].

W komórce z tego typu translokacją stale podwyższony poziom produktów onkogenów przyczynia się do rozregulowania cyklu komórkowego i niekontrolowanej proliferacji prowadzącej do zapoczątkowania procesu nowotworowego.

4. CZY MOŻNA OPISANY MECHANIZM KANCEROGENEZY UOGÓLNIĆ?

Mitelman [55, 56] zestawiał wyniki badań chromosomów 5345 chorych na różne choroby nowotworowe. Dokładna analiza chromosomów pozwoliła stwierdzić, że w przypadkach tych można spotkać dużą liczbę aberracji chromosomowych (od 226 do 318 aberracji). Powstała ona w wyniku stosunkowo niewielkiej liczby punktów złamań chromosomów (od 61 do 68 punktów), co oznacza, że złamania w tych samych punktach chromosomu mogą być przyczyną powstania różnych translokacji, delecji, inwersji itp. Są to punkty, gdzie do złamań chromosomów dochodzi łatwiej niż w innych miejscach chromosomu, tzw. hot spots. 67% tych punktów złamań znajduje się blisko lub w tym samym prążku, w którym znajdują się miejsca łamliwe, indukowane przez czynniki mutagenne, działające z zewnątrz na komórkę, uszkodzające chromosomy w powtarzalnych, często tych samych miejscach, o czym donosiliśmy na początku artykułu na podstawie badań Yunisa i wsp. [80, 81]. Tak wysoka korelacja c-fra indukowanych mutagenami z miejscami złamań charakterystycznymi dla chorób nowotworowych oraz z lokalizacją onkogenów sugeruje, że nie jest to zbieżność przypadkowa.

Godne szczególnej uwagi jest indukowanie przez promieniowanie gamma

(rad) w linii limfocytów pre-B *in vitro* zmiany chromosomowej identycznej z tą, jaką spotykamy w nieziarniczych chłoniakach (non-Hodgkin's lymphoma) – t/11;14//q23;q32.3/, a w limfocytach stymulowanych PHA i potraktowanych czwartego dnia hodowli busulfanem, fluorouracyłem lub radem – znalezienie wielokrotne takich defektów chromosomowych, które trudno odróżnić od znanych aberracji w chromosomach komórek nowotworowych, np. del/3//p14.2p23/ – w raku drobnokomórkowym płuc; del/11//p13p14.2/ – w guzie Wilmsa; del/13//q13.2q21.2/ – w retinoblastoma czy t/10;14//q24;q11.2/ – w białaczce T-limfocytowej [81]. Obserwacja ta stwarza podstawę do zastosowania testu c-fra jako czulego, wykrywającego mutagenne działanie różnych substancji bezpośrednio na komórki ludzkie *in vitro* [81].

Rzuca to pewne światło na znaczenie czynników mutagennych w chromosomowej ewolucji procesu nowotworowego, równocześnie pozwala na sugerowanie wspólnego mechanizmu procesu nowotworowego bez względu na to, czy zapoczątkowany on zostaje przypadkowym „błędem” rekombinazy DNA, czy też działaniem czynników mutagennych.

5. DZIEDZICZNE MIEJSCA ŁAMLIWE h-fra?

Opisano do chwili obecnej 21 h-fra (ryc. 3) [15]. Przeważająca liczba tych miejsc łamliwych nie pokrywa się, ani nie występuje w pobliżu żadnego ze znanych onkogenów oraz genów aktywnych transkrypcyjnie, czy ważnych w procesie różnicowania komórek z wyjątkiem fra11-q11, fra11q23 i fraXq27/ [29, 52]. Być może z tego też powodu dziedziczne miejsca łamliwe, pomimo że mogą być przyczyną aberracji chromosomowych w postaci delecji, translokacji czy figur triradialnych, nie powodują znacznego zaburzenia funkcji komórek i nie są przyczyną pojawienia się jakichkolwiek objawów klinicznych, z wyjątkiem fraXq27, któremu towarzyszy niedorozwój umysłowy [25, 49, 66] i pewne zaburzenia czynności włókien sprężystych, stawiające ten zespół w rzędzie chorób tkanki łącznej [48]. Z tego samego powodu najprawdopodobniej łamliwe miejsca tego typu mogą się dziedziczyć, gdyż nie powodują zmian, które upośledzają funkcję komórki do tego stopnia, że zaburzyłyby jej cykl komórkowy, proliferację, czy zróżnicowanie. Skutki aberracji chromosomowych, pojawiających się w komórkach obarczonych dziedzicznymi miejscami łamliwymi, nie ujawniają się w fenotypie osobników, u których pierwotnie wystąpiły. Są to bowiem zmiany zrównoważone. Przeciwnie jest u ich potomstwa, gdzie dochodzić może do delecji lub translokacji nie zrównoważonej [21, 47, 75].

Jak wynika z przedstawionej dyskusji, dziedziczne, jak również powszechne miejsca łamliwe, poza wspólną nazwą i wyglądem morfologicznym, nie mają ze sobą wiele wspólnego, a konsekwencje ich występowania są dramatycznie różne. Nie oznacza to jednak, że mechanizm powstawania obu rodzajów miejsc łamliwych nie może być, przynajmniej dla części tych miejsc, podobny

lub identyczny. Również identyczny mechanizm może być przyczyną aberracji chromosomowych, pojawiających się w następstwie wystąpienia obu typów miejsc łamliwych. Nic nie wiadomo na razie o tym, czy w pobliżu h-fra znajdują się sekwencje podobne do sekwencji sygnałowych dla rekombinazy DNA, które mogłyby „zmylić” ten enzym, i czy tego typu sekwencje są powtarzalne w genomie. Na możliwość powstania dziedzicznego łamliwego miejsca w chromosomie X w następstwie działania rekombinazy DNA wskazuje praca Loesch [48]. Przyczyną tego może być zachodzący w trakcie mejozy crossing over, polegający na wymianie submikroskopowej ilości DNA między chromosomami X i Y. Na taką możliwość wskazuje podobieństwo sekwencji homologicznych w krótkich i długich ramionach chromosomów X i Y [5, 37]. Odchylenia w fenotypie dermatoglifów u osobników obojga płci sugerują bowiem pewien nadmiar dawki genów Y u kobiet, bądź deficyt dawki genów X u mężczyzn, zmieniający w niektórych szczegółach wzór listewek skórnych [48].

Wiele prac wskazuje na to, że właśnie łamliwe miejsca były przyczyną ewolucyjnych zmian chromosomów [39, 54, 64]. Niektórzy dopatrują się istnienia „łamliwych miejsc” już u *Drosophila* [39]. Wykazano na przykład, że chromosom nr 8 u goryla powstał przez pericentryczną inwersję /p21.2q22.1/ chromosomu 8, typowego dla szympansa i człowieka [45, 79]. W jednym z punktów złamania wywołującego tę inwersję znajduje się dziedziczne miejsce łamliwe h-fra 8q22.1, które wykryto u człowieka, szympansa i goryla [54]. Również 14 innych miejsc łamliwych (h-fra i c-fra) włączonych jest w ewolucyjne zmiany chromosomów [54]. Co więcej, udowodniono, że miejsca te są ewolucyjnie chronione [64.]

Podsumowując, miejsca łamliwe zarówno dziedziczne, jak i powszechne pojawiają się losowo w komórkach, być może na skutek indukcji różnymi czynnikami środowiskowymi. Miejsce łamliwe samo w sobie nie jest przyczyną powstania objawów chorobowych, jest to natomiast miejsce „rekombinogenne” [39], „miejsce gorące” [14, 58, 67], miejsce o superpodatnej chromatynie [7, 81], wreszcie miejsce powodujące zwiększenie częstości wymiany chromatyd siostrzanych [38]. Tego typu miejsce prędzej czy później będzie prawdopodobnie przyczyną nieprzypadkowej aberracji chromosomowej [6, 57, 62, 65]. Dalsze losy komórki „obarczonej” miejscem łamliwym zależą najprawdopodobniej od aktywności genów sąsiadujących oraz od rodzaju powstałej aberracji chromosomu. W następstwie aberracji dojść może bowiem do przegrupowania aktywnych genów w inne miejsce, uaktywnienie transkrypcyjnie cichych genów lub zahamowanie transkrypcyjnie aktywnych, a w końcu powstanie nowego „hybrydowego” genu. Tego typu zmiany mogą się zdarzyć we wczesnym etapie karcinogenezy, zapoczątkować chorobę dziedziczną, również mogą obdarzyć komórkę, czy linię komórkową nowymi cechami, które pozwolą im wejść na kolejny szczebel „drabiny ewolucyjnej”.

Autorzy serdecznie dziękują prof. dr hab. Danucie Rożynkowej za inspirację do napisania tej pracy oraz cenne uwagi w trakcie jej przygotowywania.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAMS J. M., GERONDAKIS S., WEBB E., CORCORAN C. M., CORY S., Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation to an immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 1982–1986, 1983.
- [2] AHUJA Y. R., Introducing a new term: fragilesitology, Abstracts 7th International Congress of Human Genetics, Berlin, **I**: 39, 1986.
- [3] BARKER P. E., RABIN M., WATSON M., BREG W. R., RUDDLE F. H., VERMA I. M., Human c-„fos” oncogene mapped within chromosomal region 14q21–q31, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 5826–5830, 1984.
- [4] BEN-NERIAH Y., DALEY G. G., MES-MANON A. M., WILTE O. N., BALTIMORE D., The chronic myelogenous leukemia – specific p210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene, *Science*, **233**: 212–214, 1986.
- [5] BURGOYNE P. S., Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals, *Hum. Genet.*, **61**: 85–90, 1982.
- [6] CASPERSSON T., HAGLUND U., LINDELL B., ZECH L., Radiation induced non-random chromosome breakage, *Exp. Cell Res.*, **75**: 541–543, 1972.
- [7] CHANDLEY A. C., McBEATH S., DNase I hypersensitive sites along the XY bivalent at meiosis in man include the XpYp pairing region, *Cytogenet. Cell Genet.*, **44**: 22–31, 1987.
- [8] CROCE C. M., ERIKSON J., TSUJIMOTO Y., NOWELL P. C., Molecular basis of human B- and T-cell neoplasia, *Adv. Viral Oncology*, **7**: 35–51, 1986.
- [9] CROCE C. M., NOWELL P. C., Molecular genetics of human B cell neoplasia, *Adv. Immunol.*, **38**: 245–274, 1986.
- [10] CROCE C. M., SHANDER M., MARTINIS J., CICUREL L., D'ANCONA G. G., DOLBY T. W., KOPROWSKI H., Chromosomal location of the human immunoglobulin heavy chain genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 3416–3419, 1979.
- [11] CROCE C. M., THIERFELDER, W., ERIKSON J., NISHIKURA K., FINAN J., LENOIR G. M., NOWELL P. C., Transcriptional activation of an unrearranged and untranslocated c-myc oncogene by translocation of a C λ locus in Burkitt lymphoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 6922–6926, 1983.
- [12] DALLA-FAVERA R., BREGNI M., ERIKSON J., PATTERSON D., GALLO R. C., CROCE C. M., Assignment of the human c-myc oncogene to the region of chromosome 8 which is translocated in Burkitt lymphoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7824–7825, 1982.
- [13] DALLA-FAVERA R., MARTINOTTI S., GALLO R. C., ERIKSON J., CROCE C. M., Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene in human differentiated B cell lymphomas, *Science*, **219**: 963–967, 1983.
- [14] DAVIES K. E., Molecular genetics of the human X chromosome, *J. Genet.*, **22**: 243–249, 1985.
- [15] de la CHAPELLE A., BERGER R., Reports of the committee on chromosome rearrangements in neoplasia and on fragile sites, *Cytogenet. Cell Genet.*, **37**: 274–311, 1984.
- [16] DENNY C. T., YOSHIKAI Y., MAK T. W., SMITH S. O., HOLLIS G. F., KIRSCH J. R., A chromosome 14 inversion in a T cell lymphoma is caused by site-specific recombination between immunoglobulin and T-cell receptor loci, *Nature*, **320**: 549–551, 1986.

- [17] DOLITTLE 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.
- [18] 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.
- [19] ERIKSON J., AR-RUSHDI A., DRWINGA H. D., NOWELL P. C., CROCE C. M., Transcriptional activation of the translocated c-myc on to gene in Burkitt lymphoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 820–824, 1983.
- [20] ERIKSON J., MARTINIS J., CROCE C. M., Assignment of the genes for human λ immunoglobulin chains to chromosome 22, *Nature*, **294**: 173–175, 1981.
- [21] GARCIA-SAGREDO J. M., SAN ROMAN C., GALLEGO-GOMEZ M. E., LIEDO G., Fragile chromosome 16q22 cause a balanced translocation at the same point, *Hum. Genet.*, **65**: 211–213, 1983.
- [22] 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.
- [23] HALUSKA F. G., FINVER S., TSUJIMOTO Y., CROCE C. M., The t/8;14/ chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results from mistakes in V-D-J joining, *Nature*, **324**: 158–161, 1986.
- [24] HALUSKA F. S., TSUJIMOTO Y., CROCE C. M., The t/8;14/ chromosome translocation of the Burkitt lymphoma cell line Daudi occurred during immunoglobulin gene rearrangement and involved heavy chain diversity region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6835–6839, 1987.
- [25] HARVEY J., JUDGE C., WIENER S., Familial X-linked mental retardation with an X chromosome abnormality, *J. Med. Genet.*, **14**: 46–50, 1977.
- [26] HECHT F., KAISER-McCAW, B., The importance of being fragile site, *Am. J. Hum. Genet.*, **31**: 223–225, 1979.
- [27] – Inducing fragile sites to express themselves, *Am. J. Hum. Genet.*, **32**: 626–627, 1980.
- [28] HECHT F., MORGAN R., HECHT B. K. M., SMITH S. D., Common region on chromosome 14 in T cell leukaemia and lymphoma, *Science*, **226**: 1445–1447, 1984.
- [29] HEIM S., BILLSTRÖM R., KRISTOFFERSON U., MANDAHL N., STRÖMBECK N., MITELMAN F., Variant Ph translocations in chronic myeloid leukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **18**: 215–227, 1985.
- [30] HEISTERKAMP N., GROFFEN J., STEPHENSON J. R., SPURR N. K., GOODFELLOW P. H., SOLOMON E., CARRITT B., BODMER W. F., Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes, *Nature*, **299**: 747–750, 1982.
- [31] HEISTERKAMP N., STEPHENSON J. R., HOUSEN P. F., GROFFEN J., KLEIN A., BARTRAM C. R., GROSVELD G., Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelocytic leukaemia, *Nature*, **306**: 239–242, 1983.
- [32] HUEBNER K., ISOBE M., CROCE C. M., GOLDE D. W., KANFMAN 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.
- [33] KAMATA T., FERAMISCO J. R., Epidermal growth factor stimulates guanine nucleotide binding activity and phosphorylation of „ras” oncogene proteins, *Nature*, **310**: 147–150, 1984.
- [34] KELLY K., Growth factor short-circuited, *Nature*, **317**: 398, 1985.
- [35] KLEIN A., Van KESSEL A. C., GROSVELD G., BARTRAM C. R., HAGEMEIJER A., BOOTSMA D., SPURR N. K., HEISTERKAMP N., GROFFEN J., STEPHENSON J. R., A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocyte leukaemia, *Nature*, **300**: 765–767, 1982.

- [36] KLEIN G., Specific chromosomal translocation and the genesis of B-cell derived tumors in mice and men, *Cell*, **32**: 311–315, 1983.
- [37] KOENIG M., MOISAN J. P., HEILIG R., MANDEL J. L., Homologies between X and Y chromosomes detected by DNA probes: localization and evolution, *Nucl. Acids Res.*, **13**: 5485–5501, 1985.
- [38] LACA Z., BRANKOVIC S., Some characteristics of fra/Xq/ lymphocytes, Abstracts 7th International Congress of Human Genetics, Berlin, **II**: 219, 1986.
- [39] LAIRD C., JAFFE E., KARPEN G., LAMB M., NELSON R., Fragile sites in human chromosomes as regions of late-replicating DNA, *TIG*, **3**: 274–281, 1987.
- [40] LEAL F., WILLIAMS L. T., ROBBINS K. C., AARONSON S. A., Evidence that the v-sis gene product transforms by interaction with the receptor for platelet-derived growth factor, *Science*, **230**: 327–330, 1985.
- [41] LeBEAU M. M., PETTENATI M. J., DIAZ M. O., WESTBROOK C. A., LARSON R. A., SHERR C. J., ROWLEY J. D., Evidence for the involvement of GM-CSF, CSF-1 and FMS in the deletion of 5q in myeloid disorders, Abstracts 7th International Congress of Human Genetics, Berlin, **II**: 584, 1986.
- [42] LeBEAU M. M., ROWLEY J. D., Chromosomal abnormalities in leukemia and lymphoma: clinical and biological significance, *Adv. Hum. Genet.*, **15**: 1–54, 1986.
- [43] LEDBETTER D. H., LEDBETTER S. A., NUSSBAUM R. L., Implications of fragile X expression in normal males for the nature of the mutation, *Nature*, **324**: 161–163, 1986.
- [44] LEDER P., BATTEY J., LENOIR G., MAULDING G., MURPHY W., POTTER H., STEWART T., TAUB R., Translocations among antibody genes in human cancer, *Science*, **222**: 765–767, 1983.
- [45] LEJEUNE J., DUTRILLAUX B., RETHORE M. O., PRIEUR M., Comparaison de la structure fine des chromatides d'Homo sapiens et de Pan troglodytes, *Chromosoma*, **43**: 423–444, 1973.
- [46] LENOIR G. M., PREUD'HOME J. L., BERNHEIM A., BERGER R., Correlation between immunoglobulin light chain expression and variant translocation in Burkitt's lymphoma, *Nature*, **298**: 474–476, 1982.
- [47] LIN C. C., LOWRY R., SNYDER F. F., Interstitial deletion for a region in the long arm of chromosome 16, *Hum. Genet.*, **65**: 134–138, 1983.
- [48] LOESCH D. Z., Dermatoglyphic findings in fragile X syndrome: a causal hypothesis points to X-Y interchange, *Ann. Hum. Genet.* 1986 (w druku).
- [49] LUBS H. A., A marker X chromosome, *Am. J. Hum. Genet.*, **21**: 231–244, 1969.
- [50] MALCOLM S., BARTON P., MURPHY C., Localization of human immunoglobulin light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by in situ hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 4957–4980, 1982.
- [51] MARTIN J. P., BELL J., A pedigree of mental defect showing sex-linkage, *J. Neurol. Psychiatr.*, **6**: 154–157, 1943.
- [52] MATTEI M. G., NOGUCHI T., BIRG F., N'GUYEN C., PASSAGE E., BIRNBAUM D., MATTEI J. F., Oncogene mcf₂ and fra/X//q27-q28/, Abstracts 7th International Congress of Human Genetics, Berlin, **II**: 550, 1986.
- [53] McLAUGHLIN J., CHIANESE E., WITTE O. N., In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the p210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6558–6562, 1987.
- [54] MIRO R., CLEMENTE I. C., FUSTER C., EGOZCUE J., Fragile sites, chromosome evolution, and human neoplasia, *Hum. Genet.*, **75**: 345–349, 1987.
- [55] MITELMAN F., Clustering of breakpoints to specific chromosomal regions in human neoplasia. A survey of 5345 cases, *Hereditas*, **104**: 113–119, 1986.
- [56] – Clustering of chromosomal breakpoints in neoplasia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **19**: 67–71, 1986.

- [57] NAKAGOME Y., CHIYO H., Nonrandom distribution of exchange points in patients with structural rearrangements, *Am. J. Hum. Genet.*, **28**: 31–41, 1976.
- [58] NING L., YE W., XIANTING Z., Human chromosome hot points. V. The effect of four nucleosides on chromosomes in folate free medium, *Hum. Genet.*, **74**: 101–103, 1986.
- [59] NISHIKURA K., AR-RUSHDI A., ERIKSON J., WATT R., ROLVERA G., CROCE C. M., Differential expression of the translocated and the untranslocated c-myc gene in Burkitt lymphoma, *Science*, **222**: 390–393, 1983.
- [60] NOWELL P. C., SHANKEY T. V., FINAN J., GUERRY D., BESA E., Proliferation, differentiation and cytogenetics of chronic leukemia B lymphocytes cultured with mitomycin treated normal cells, *Blood*, **57**: 444–451, 1981.
- [61] ROWLEY J. D., LeBEAU M. M., WESTBROOK C. A., SHIMA E., McKEITHAN T., DIAZ M. O., Genetic analysis of chromosomal breakpoints in human acute leukaemia, Abstracts 7th International Congress of Human Genetics, Berlin, **1**: 39, 1986.
- [62] ROŻYŃKOWA D., STĘPIEŃ J., KOWALEWSKI J., NOWAKOWSKI A., Nonrandom chromosome rearrangements in 27 cases of human myeloid leukemia, *Hum. Genet.*, **39**: 293–301, 1977.
- [63] SCHMID M., FEICHTINGER W., JEBBERGER A., KÖHLER J., LANGE R., The fragile site /16/q22/. I. Induction by AT-specific DNA-ligands and population frequency, *Hum. Genet.*, **74**: 67–73, 1986.
- [64] SCHMID M., OTT G., HAAF T., SCHERES J. M. J. C., Evolutionary conservation of fragile sites induced by 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine in man, gorilla, and chimpanzee, *Hum. Genet.*, **71**: 342–350, 1985.
- [65] STOLL C., Nonrandom distribution of exchange points in patients with reciprocal translocations, *Hum. Genet.*, **56**: 89–93, 1980.
- [66] SUTHERLAND G. R., Heritable fragile sites on human chromosomes. I. Fractors affecting expression in lymphocytes culture, *Am. J. Hum. Genet.*, **31**: 125–135, 1979.
- [67] SZABO P., PURRELLO M., ROCCHI M., Cytological mapping of the human G-6-PD gene distally to the fragile X site suggests a high rate of meiotic recombination across this site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 7855–7859, 1984.
- [68] TSUJIMOTO Y., COSSMAN J., JAFFE E., CROCE C. M., Involvement of bcl-2 gene in human follicular lymphoma, *Science*, **228**: 1440–1443, 1985.
- [69] TSUJIMOTO Y., FINGER L. R., YUNIS J., NOWELL P. C., CROCE C. M., Cloning of the chromosome breakpoint in neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation, *Science*, **226**: 1097–1099, 1984.
- [70] TSUJIMOTO Y., GORHAM J., COSSMAN J., JAFFE E., CROCE C. M., The t(14;18) chromosome translocation involved in B cell neoplasms results from mistakes in V-D-J joining, *Science*, **229**: 1390–1393, 1985.
- [71] TSUJIMOTO Y., JAFFE E., COSSMAN J., GORHAM J., NOWELL P. C., CROCE C. M., Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation, *Nature*, **315**: 340–343, 1985.
- [72] TSUJIMOTO Y., YUNIS J., ONORATO-SHOWE L., ERIKSON J., NOWELL P. C., CROCE C. M., Molecular cloning of the chromosomal breakpoints of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation, *Science*, **224**: 1403–1406, 1984.
- [73] UCHIDA J. A., FREEMAN V. C. P., BASRUR P. K., The fragile X in cattle, *Am. J. Hum. Genet.*, **22**: 557–562, 1986.
- [74] Van den BERGHE H., PARLOIR C., GOSSEYE S., ENGLEBIENNE V., CORNU G., SOKAL G., Variant translocation in Burkitt lymphoma, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **1**: 9–14, 1979.
- [75] VOULLAIRE L. E., WEBB G. G., LEVERSHA M. A., Chromosome deletion at 11q23 in an abnormal child from a family with inherited fragility at 11q23, *Hum. Genet.*, **76**: 202–204, 1987.

- [76] 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 p28 „sis” of simian sarcoma virus, *Nature*, **304**: 35–39, 1983.
- [77] WEISS R., The apparent identify of „sis” with PDGF is the first example of an oncogene representing a previously defined growth factor, *Nature*, **304**: 12, 1983.
- [78] YUNIS J., The chromosomal basis of human neoplasia, *Science*, **221**: 227–236, 1983.
- [79] YUNIS J., PARKASH O., The origin of man: A chromosomal pictorial legacy, *Science*, **215**: 1525–1530, 1982.
- [80] YUNIS J., SORENG A. L., Constitutive fragile sites and cancer, *Science*, **226**: 1199–1204, 1984.
- [81] YUNIS J. J., SORENG A. L., BOWE A. E., Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens, *Oncogene*, **1**: 59–69, 1987.

III OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA BIOLOGII KOMÓRKI STRESZCZENIE KOMUNIKATÓW

Łódź, 4-5 lipca 1988 r.

Zamieszczamy część materiałów przedstawionych na III Ogólnopolskiej Konferencji Biologii Komórki, która odbyła się 4-5 lipca 1988 r. w Łodzi

Redakcja

IMMUNOFLUORESCENCJA TUBULINY I AKTYNY W MEJOTYCZNYCH KOMÓRKACH ROŚLIN WYŻSZYCH

Józef Bednara

Zakład Anatomii i Cytologii Roślin Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, al. Akademicka 19,
20-033 Lublin

Posługując się poliklonalną antytubuliną i monoklonalną antyaktyną badano rozmieszczenie fluorescencji tubuliny i aktyny w megasporogenezie *Gasteria verrucosa* i *Chamaenerion angustifolium*, w sporogenezie *Equisetum hyemale* oraz rozmieszczenie aktyny w mikrosporogenezie *Gasteria verrucosa*. W żadnym z mejocytów nie znaleziono preprofazowego pierścienia mikrotubul i mikrofilamentów; pierścień taki jest właściwy komórkom rozpoczynającym mitozę.

We wczesnoprofazowych mejocytach tubulina jest homogennie rozproszona w cytoplazmie, nieco później jest jej więcej w pobliżu jądra komórkowego. Podczas metafazy i anafazy znajduje się głównie w obrębie wrzeciona podziałowego. W I i II telofazie silnie fluoryzują także wiązki mikrotubul fragmoplastu, rozbudowujące się od środka komórki ku brzegom. W II telofazie wokół jąder tworzą się strefy radialnie ułożonych mikrotubul, a później mikrotubule są także w miejscach, gdzie zakładają się przegrody pierwotne między komórkami tetrazy.

Aktyna pojawia się w późnej profazie jako grube, rozgałęzione wiązki, leżące głównie przy ścianach mejocytów. W metafazie, anafazie i telofazie fluorescencja aktyny związana jest głównie z wrzecionem, w II telofazie zaś skupia się przy przegrodach pierwotnych i przy zewnętrznych ścianach tetrazy.

BŁONA OTRZEWNOWA IN VITRO – ZMIANY ZDOLNOŚCI TRANSPORTOWYCH WYWOŁANE METOTREKSATEM (MTX)

Krystyna Czyżewska, Jan Knapowski

Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego,
60-781 Poznań, ul. Święcickiego 6

Przyjmuje się, iż cytotoksyczne działanie MTX związane jest z hamowaniem aktywności reduktazy dihydrofolianowej. Wcześniejsze analizy, z zastosowaniem wielokomórkowego modelu błonowego, sugerowały oddziaływanie tego leku na poziomie błony komórkowej poprzez zmianę jej właściwości transportowych (Czyżewska K., Knapowski J., Transperitoneal transport of methotrexate in vitro. Arch. Immunol. Therap. Exp., **35**, 161–167, 1987). W celu zweryfikowania tej hipotezy podjęto dalsze badania dotyczące wpływu MTX na przetrzewny transport związków o zróżnicowanej masie cząsteczkowej. Otrzewną izolowano z przedniej ściany brzucha królików i umieszczano w zmodyfikowanej komorze Ussinga. Analizowano dwukierunkowy transport mocznika, kwasu moczowego, inuliny oraz albuminy w warunkach kontrolnych (45 min), a także jego zmiany wywołane działaniem MTX (dalsze 45 min). Stwierdzono, iż w tym czasie MTX obniżał obukierunkowy transfer mocznika i kwasu moczowego średnio o około 35%, nie wpływał natomiast na transport inuliny. Odmiennie rezultaty obserwowano w przypadku albuminy: MTX podwyższał, średnio o około 35%, wielkości transportu skierowanego z mezotelialnej do śródmiąższowej strony błony. Zmiany tego parametru w kierunku przeciwnym były nieistotne statystycznie. W rezultacie pojawił się transport wypadkowy, skierowany z mezotelialnej do śródmiąższowej strony błony otrzewnowej. Wynosił on średnio $4,3 \cdot 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Uzyskane rezultaty potwierdzają hipotezę o błonowym kierunku działania MTX w obrębie błony otrzewnowej. Działanie to mogłoby obejmować zarówno transport bierny (niespecyficzny), jak i aktywny (specyficzny). Nie wykluczone, że wspomniane oddziaływanie ma związek z cytotoksycznym efektem tego analogu kwasu foliowego.

ULTRASTRUKTURA MEJOCYTÓW I TAPETUM W MIKROSPOROGENEZIE *NYMPHAEA*

Ewa Duda

Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19,
20-033 Lublin

Podczas mejozy w mikrosporocytach *Nymphaea alba* L. zmienia się struktura i rozmieszczenie organeli. We wczesnej I profazie komórki mejotyczne ulegają polaryzacji — organele (plastydy i mitochondria) grupują się po jednej stronie jądra komórkowego. Następnie grupa organeli rozprasza się, ale pod koniec I profazy wszystkie plastydy i mitochondria zbierają się w nowy agregat położony obok jądra. Agregat ten po I telofazie zmienia kształt i w postaci płytki zajmuje równikową płaszczyznę dwujądrowej komórki. W płytce tej podczas interkinezy różnicują się warstwy: środkowa mitochondrialna i zewnętrzne plastydowe. Warstwy te wkrótce znikają, ale płytka utrzymuje się do końca II telofazy. Po II telofazie warstwy organeli powstałe z przekształcenia się płytki rozgraniczają cztery jednojądrowe obszary przyszłych komórek tetrady. W tych warstwach zakładają się przegrody pierwotne.

Plastydy od wczesnej I profazy do późnej II telofazy zawierają ziarna skrobi.

Równocześnie z I profazą i metafazą odbywają się mitozy w tapetum oraz zmienia się ultrastruktura następujących organeli: plastydów, mitochondriów i ER. Część plastydów ulega deformacji i hydrolizie, ER przybiera formę koncentrycznych układów, a w cytoplazmie zjawiają się liczne wakuole.

ZMIANY MORFOLOGII ŚLEDZIONY KUMAKÓW GÓRSKICH *BOMBINA VARIEGATA*
PRZETRZYMYWANYCH W LABORATORIUM

Józef Dulak, Barbara Płytycz

Zakład Anatomii Porównawczej, Instytut Zoologii UJ, ul. M. Karasia 6, 30-060 Kraków

Celem eksperymentu było zbadanie zmian morfologicznych, towarzyszących obserwowanemu uprzednio spadkowi masy śledziony kumaków przetrzymywanych w laboratorium (Płytycz i wsp., *Folia Biol.*, **34**: 85, 1986). Średnia masa śledziony dorosłych kumaków górskich złowionych na początku lipca wynosiła 16,0 mg, a złowionych w połowie września — 17,7 mg, natomiast średnia masa śledziony zwierząt przetrzymywanych w dobrych

warunkach laboratoryjnych od lipca do września spadła do 11,6 mg, od lipca do grudnia – do 6,8 mg, a od lipca do kwietnia następnego roku – do 5,2 mg. Średnia masa śledziony kumaków złowionych pod koniec kwietnia wynosiła natomiast 14,0 mg. W porównaniu ze zwierzętami badanymi wkrótce po złowieniu, u kumaków przetrzymywanych w laboratorium zmniejszyła się liczba limfocytów w miazdze białej i zanikały skupienia tych komórek wokół naczyń krwionośnych w miazdze białej. Równocześnie zwiększyła się ilość tkanki łącznej na terenie miazgi białej i wyraźniejsza stała się łącznotkankowa strefa graniczna miazgi białej i czerwonej. W miazdze czerwonej wzrosła liczba i rozmiary centrów melanomakrofagowych. Przyczyną zmian może być stres oraz zmniejszona stymulacja antygenowa w laboratorium w porównaniu ze środowiskiem naturalnym kumaków.

KLASYFIKACJA WŁÓKIEN MIĘŚNIOWYCH KOŃCZYNY PRZEDNIEJ ŻĄBY NA PODSTAWIE AKTYWNOŚCI ICH ATP-AZY AKTOMIOZYNOWEJ

Jadwiga Faber, Bożena Zawadowska

Zakład Cytologii i Histologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Przeprowadzono charakterystykę włókien mięśniowych występujących w mięśniach kończyny przedniej żaby trawnej *Rana temporaria*. Do badań użyto 5 samców pochodzących z okolic Krakowa, odłowionych w okresie wiosenno-letnim. Mięśnie – *extensor carpi radialis caput superius* (ECRsup), *flexor antibrachii lateralis superficialis caput inferius* (FALSinf), *flexor carpi radialis* (FCR), *flexor carpi ulnaris* (FCU), *anconaeus caput medialis* (ANmed), *anconaeus caput scapularis* (ANscap) oraz *anconaeus caput profundum* (ANprof) wycinano natychmiast po zabiciu zwierzęcia, a następnie zamrażano w izopentanie chłodzonym ciekłym azotem. Reakcje przeprowadzono na skrawkach seryjnych grubości około 10 μm , krojonych w kriostacie w temperaturze około -25°C . Podstawowym kryterium charakteryzującym włókna mięśniowe była aktywność ich ATP-azy aktomiozynowej po zasadowej i kwaśnej preinkubacji, przeprowadzona według metody Gutha i Samahy (Exp. Neurol. 1970, 28, 365) zmodyfikowanej przez Johnstona i in. (Can. J. Zool. 1974, 52, 871). Wyniki uzyskane w tej reakcji pozwalają określić szybkość skurczu włókna mięśniowego, a mianowicie włókna, których ATP-aza aktomiozynowa jest aktywna po preinkubacji zasadowej, uważane są za szybko kurczące się, podczas gdy włókna posiadające ATP-azę nieaktywną po zasadowej preinkubacji, a aktywną po kwaśnej, są włóknami wolnymi (Burke i in., Science 1971, 174, 709.; J. Physiol 1973, 234, 723.; Peter i in., Biochemistry 1972, 11, 2627). W badanych mięśniach stwierdzono obecność

5 typów włókien mięśniowych. Włókna wykazujące aktywność ATP-azową po zasadowej preinkubacji (pH 10,4) określono jako włókna typu II, w przeciwieństwie do włókien typu I, posiadających ATP-azę nieodporną na tę preinkubację. Po tym wstępnym zróżnicowaniu włókien na typy I i II zastosowano 3 preinkubacje kwaśne (pH 3,9; 4,2; 4,4), na których podstawie podzielono włókna typu II na podtypy IIA, IIB i IIC. Stwierdzono, że rozmieszczenie poszczególnych typów i aktywności ich ATP-azy aktomiozynowej różnią się w poszczególnych badanych mięśniach.

Oprócz opisanych 4 typów włókien fazowych, w badanych mięśniach stwierdzono obecność zupełnie odmiennego typu włókien mięśniowych, a mianowicie włókien tonicznych. Ich ATP-aza jest aktywna w środowisku kwaśnym o pH 3,9 i nieaktywna w środowisku zasadowym o pH 10,4. Stwierdzono jednak pewną aktywność ATP-azy tych włókien po preinkubacji w silnie zasadowym płynie preinkubacyjnym o pH 10,8.

Oprócz określenia aktywności ATP-azowej włókien mięśniowych zbadano także typ ich metabolizmu na podstawie reakcji na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (SDH). Zakresy aktywności tego enzymu pokrywają się w dużym stopniu dla włókien należących do różnych typów ATP-azowych. Na podstawie wykonanych badań nie stwierdzono wyraźnej korelacji między typem włókna, zdefiniowanym na podstawie aktywności ATP-azy aktomiozynowej, a jego profilem metabolicznym.

PORÓWNANIE DZIAŁANIA MONO- I BIS-AMONIOWYCH PÓCHODNYCH ESTRÓW GLICYNY NA PROCES DESORPCJI JONÓW WAPNIOWYCH Z BŁONY LIPOSOMÓW LECYTYNOWYCH

Andrzej Fogt, Janina Kuczera, Stanisław Witek*

Katedra Fizyki i Biofizyki, Akademia Rolnicza, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław

*Instytut Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych, Politechnika Wrocławska, ul. Łukasiewicza 2, 50-377 Wrocław

W pracy badano wpływ 2 grup związków biologicznie aktywnych na wielkość stałej szybkości procesu desorpcji jonów wapniowych z błony liposomów lecytynowych. Pierwszą grupę związków stanowił homologiczny szereg pochodnych tetrametyloetyleno-diaminy o liczbie atomów węgla w łańcuchu alkilowym $n = 8, 10, 12, 14$, drugą homologiczny szereg pochodnych estrów trimetyloglicyny dla $n = 8, 10, 12, 14$. Otrzymane wyniki wskazują na zależność aktywności obu grup związków od długości ich łańcuchów alkilowych w cząsteczkach. Porównanie działania związków z obu grup o tej samej długości łańcuchów alkilowych prowadzi do wniosku, że związki posiadające po 2 łańcuchy w cząsteczce mają większą aktywność.

ZAHAMOWANIE WZROSTU I ŚMIERĆ KOMÓREK A USZKODZENIA PREFORMOWANEGO I NOWO SYNTETYZOWANEGO DNA W WYNIKU KRÓTKOTRWAŁEGO DZIAŁANIA ANALOGU FOLANU NA LIMFOBLASTY L5178Y IN VITRO

Barbara Gołos, Janina Malec

Zakład Biochemii Instytutu Hematologii, ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa

W poszukiwaniu zależności między cytotoksycznością krótkotrwałego działania inhibitora reduktazy dwuhydrofolanowej – metotreksatu (MTX) a powstawaniem pęknięć nici DNA badano odpowiedź komórek na 1–3-godzinne działanie tego związku w stężeniach 0,5–0,05–0,005 mM w hodowlach bez inhibitora reparacji DNA lub z jego dodatkiem (kofeina).

Stwierdzono, że działanie MTX powodowało w okresie postinkubacji bez cytostatyku zahamowanie wzrostu i wzmożone obumieranie komórek. Nasilenie tych efektów było zależne od stężenia cytostatyku. Obecność kofeiny w czasie działania MTX i w czasie postinkubacji potęgowała cytotoksyczne działanie cytostatyku. W tych samych warunkach doświadczalnych stwierdzono metodą analizy na hydroksyapatycie zwiększenie proporcji DNA jednopasmowego zarówno w DNA preformowanym, jak w nowo syntetyzowanym. Efekt ten był również zależny od obecności kofeiny.

Uzyskane wyniki sugerują, że w wyniku ostrego działania MTX na komórki in vitro mogą powstawać pęknięcia nici DNA preformowanego i nowo syntetyzowanego. Pęknięcia te są normalnie przynajmniej częściowo reperowane. Zredukowanie wydajności procesu reparacji DNA przez obecność kofeiny powoduje ujawnienie tych uszkodzeń. Znajduje to swoje odzwierciedlenie we wzmożonej cytotoksyczności MTX w obecności inhibitora reparacji DNA.

OCZYSZCZANIE I CHARAKTERYSTYKA DNA – ZALEŻNEJ POLIMERAZY II RNA Z BYDŁĘCEJ KORY NADNERCZY*

Edward J. Gorzelańczyk, Wiesław H. Trzeciak

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

Badano DNA – zależną jądrową polimerazę II RNA (pol II RNA) z kory nadnerczy. Polimerazy RNA wyizolowano za pomocą sorpcji na Poliminie P i elucji 0,4 M roztworem siarczanu amonu i oczyszczano na kolumnie

* Pracę finansowano z programu A.M. V-9-1.

DEAE-Sephadex A-25 w gradiencie ciągłym siarczanu amonu. Preparat rozdzieliał się na trzy główne frakcje białkowe eluujące się siarczanem amonu o stężeniach 0,16, 0,22 i 0,3 M, odpowiadające pol RNA I, II i III. Polimerazy identyfikowane przez pomiar ^3H -CTP wbudowanego do łańcucha polirybonukleotydowego w układzie programowanym DNA z grasicy cielęcej, w nieobecności i obecności *alfa* amanityny, a także na podstawie analizy podjednostek za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Stwierdzono optymalną aktywność transkrypcyjną pol II RNA w stężeniach Mg^{2+} – 10 mM oraz Mn^{2+} – 0,75 mM. W optymalnych stężeniach Mg^{2+} i Mn^{2+} jony Zn^{2+} stymulowały aktywność pol II RNA około trzykrotnie.

REAKTYWNE ZACHOWANIE ASTROCYTÓW W MÓZGU SZCZURA USZKODZONYM W RÓŻNYCH STADIACH ROZWOJU POSTNATALNEGO. BADANIA IMMUNOCYTOCHEMICZNE I AUTORADIOGRAFICZNE*

Krzysztof Janeczko

Zakład Neuroanatomii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. M. Karasia 6,
30-060 Kraków

Badano przebieg reakcji astrocytów na uszkodzenie półkuli mózgu u szczurów nowo narodzonych i 30-dniowych. W tym celu wykrywano immunocytochemicznie komórki zawierające *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) oraz znakowano przy użyciu ^3H -tymidyny autoradiograficznie komórki dzielące się. Następnie, w rejonie uszkodzenia, rejestrowano rozmieszczenie komórek podwójnie znakowanych i porównywano wyniki pochodzące z obydwu grup wiekowych.

U szczurów nowo narodzonych wykryto strefy wzrostu liczby znakowanych komórek GFAP-pozytywnych. Strefy te uznano za rezultat reaktywnych podziałów astrocytów.

U szczurów 30-dniowych liczne reaktywne podziały astrocytów zaczynają się już po 2 godz. od wykonania uszkodzenia. Wszystkie komórki typu neuroektodermalnego, dzielące się w tym czasie, znajdują się jednak w znacznej odległości od brzegu lezji. Mimo to, po 40-dniowym okresie przeżycia, wywodzące się z nich GFAP-pozytywne komórki potomne formują skupisko w samym centrum lezji. Fakt ten świadczy o zdolności astrocytów do migracji ku miejscu uszkodzenia.

* Praca wykonana w ramach CPBR 11.7.U.17.02.10.

STRUKTURA GENOMU U *ALLIUM MONTANUM*: DYSTRYBUCJA HETEROCHROMATYNY W OBRĘBIE CHROMOSOMÓW I ICH UPORZĄDKOWANIE W INTERFAZIE

Andrzej Joachimiak¹, Józef Krawczyk², Andrzej Kornaś²

¹ Zakład Cytologii i Embriologii Roślin UJ, 31-044 Kraków, ul. Grodzka 52

² Zakład Botaniki WSP, 31-054 Kraków, ul. Podbrzezie 3

Badania tetraploidalnego ($2n = 32$) *Allium montanum* metodą prążków C wykazały, iż jest on przypuszczalnie autotetraploidem. W jego kariotypie wyróżniono bowiem 4 prawie identyczne pod względem morfologii i dystrybucji heterochromatyny kompleksy chromosomów. Zawierają one stosunkowo dużo heterochromatyny rozlokowanej telomerycznie, interkalarnie i w obrębie centromerów. Wykazano, iż lokalizacja heterochromatyny w genomach *A. montanum* jest nieprzypadkowa, co potwierdza mechanistyczny model rozprzestrzeniania się heterochromatyny w obrębie genomu oraz hipotezę nieprzypadkowego ułożenia chromosomów w jądrze interfazowym.

ZMIANY POPULACJI TYMOCYTÓW POD WPLYWEM WZROSTU NOWOTWORU U MYSZY

Maciej Kawalec*, Jerzy Kawiak*, Tomasz Skórski*, Zygmunt Pojda**

* Zakład Cytofizjologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, ul. Marymoncka 99

** Zakład Hematologii Radiacyjnej, W. I. H. i E., Warszawa, ul. Kozielska 4

Komórki mysiej białaczki limfatycznej L 1210 (10^6 komórek) podawano i.p. syngenicznym (DBA/2) lub semisyngenicznym (CDF_1) myszom. Po 7 dniach wzrostu nowotworu obserwowano zmniejszenie liczby tymocytów (o około 50%) oraz zmniejszenie tymocytów $Lyt\ 2^+$ od około 80% w kontroli do około 60% w grupie doświadczalnej. Zawartość tymocytów $Thy\ 1,2^+$ (około 90%) i $L3T4^+$ (około 55%) nie ulegała zmianie. Podobne zjawisko obserwowano gdy komórki białaczki umieszczano w komorach dyfuzyjnych, które wszczepiano następnie do jamy otrzewnej. Dane te sugerują, że zmiany w populacji tymocytów następują pod wpływem czynnika wydzielanego przez komórki białaczki.

OTRZYMYWANIE IMMUNOGENNYCH KOMÓREK NOWOTWOROWYCH ZA POMOCĄ CYKLOFOSFAMIDU

Maciej Kawalec, Tomasz Skórski, Grażyna Hoser

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

Badano immunogenność traktowanych cyklofosfamidem mysich komórek nowotworowych u syngenicznych lub semisyngenicznych myszy. Większość myszy immunizowanych modyfikowanymi cyklofosfamidem komórkami raka Ehrlicha, białaczki L 1210 lub mięsaka AA przeżywała podanie letalnej dawki odpowiednich niemodyfikowanych komórek nowotworowych. Komórki plazmacytoma RPC-5 i MOPC 104E oraz białaczki L 5178Y były mniej immunogenne, a mięsaka L-1 nie wykazywały immunogenności.

IMMUNOTERAPEUTYCZNE WŁASNOŚCI KOMÓREK MYSIEJ BIAŁACZKI L 1210 TRAKTOWANYCH MAFOSFAMIDEM (ASTA Z 7654)

Maciej Kawalec, Tomasz Skórski, Jerzy Kawiak

Zakład Cytofizjologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa,
ul. Marymoncka 99

Myszy Balb/c × DBA/2 F₁ zaszczepione i.p. 10 komórkami limfatycznej białaczki L 1210 (w dniu 0) poddawano chemioimmunoterapii. Otrzymywały one w dniu +8 cyklofosfamid i.p. w dawce 100 mg/kg oraz w dniach 0, +3, +6, +9, +12 immunogenne komórki L 1210 traktowane in vitro mafosfamidem (L1210-Maf). Komórki L 1210-Maf podawano dootrzewnowo (10^6 lub 10^7) lub dootrzewnowo i podskórnie ($5 \cdot 10^6 + 5 \cdot 10^6$). Myszy zaszczepione białaczką i nie leczone ginęły w 100%, natomiast około 5% przeżywało po podaniu wyłącznie cyklofosfamidu, a około 30% – po podaniu cyklofosfamidu i komórek L 1210-Maf i.p. Najlepsze rezultaty (54% wyleczonych myszy) osiągnęto, gdy stosowano cyklofosfamid i.p. i komórki L 1210-Maf jednocześnie s.c. i i.p. Związki modyfikujące odpowiedź immunologiczną (levamisol, BCG, bestatyna) w użytych dawkach nie poprawiały wyników chemioimmunoterapii. Skuteczność chemioimmunoterapii zależy od zastosowania komórek L 1210-Maf i cyklofosfamidu, który nie tylko zwalnia wzrost nowotworu, lecz może także nasilać antynowotworową odpowiedź immunologiczną.

RECEPTORY ESTRU FORBOLU W KOMÓRKACH KOSTNYCH MYSZY ZDROWYCH
I *Hyp*

J. Kawiak, B. Ecarot-Charrier*, F. H. Glorieux*

Zakład Cytofizjologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa,
ul. Marymoncka 99

* Szpital Shrinersów, Montreal, Kanada

Kinaza białkowa C specyficznie wiąże estry forbolu będące promotorami nowotworu i aktywatorami samej kinazy. Sprawdzone wiązanie [³H]-dwumaślanu forbolu przez komórki kości calvariae myszy hodowane *in vitro*. Komórki pochodziły od myszy C57BL/6J zdrowych lub z dziedziczną krzywicą sprzężoną z chromosomem X (myszy *Hyp*). Wyniki przeliczano na DNA komórek.

Stała dysocjacji (K_D) estru forbolu określona wykresem Scatcharda była wyższa dla komórek myszy *Hyp* niż myszy zdrowych, a również w komórkach *Hyp* więcej było miejsc wiążących forbol. Ponieważ kinaza C uczestniczy w transdukcji sygnałów do komórki, wnioskowano więc, że ten układ jest zmieniony w komórkach kostnych myszy *Hyp*.

EFFECT OF BIS-AMMONIUM QUATERNARY SALTS ON THE RED
BLOOD CELLS

H. Kleszczyńska, M. Kilian, S. Przystalski, S. Witek*

Department of Physics and Biophysics, Agricultural Academy, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław,
Poland

* Institute of Organic and Polymer Technology, Technical University, ul. Łukasiewicza 2,
50-371 Wrocław, Poland

The investigations were concerned with five compounds belonging to quaternary ammonium salts differing between each other in the alkyl chain length and thus also in their hemolytic activity. Their hemolytic activity was the greater the longer was the alkyl chain of the studied compound. For estimated maximum concentrations of the investigated salts, that did not

caused hemolysis yet, no clear change was found in the peneration rate of sulphate ions through the membrane of red blood cells modified by those compounds.

POLIMORFIZM HETEROCHROMATYNY W GENOMACH PIĘCIU ODMIAN
JĘCZMIENIA (*HORDEUM VULGARE* L.)

Marian Kобрzyński

WSP, Instytut Biologii, 31-054 Kraków, ul. Podbrzezie 3

Przeprowadzone badania cytologiczne dotyczyły kariologii pięciu hodowanych w Polsce odmian jęczmienia: Aramir, Diva, Grit, Polon i Menuet.

Materiał badano metodą Feulgena i prążków C. Badane odmiany mają somatyczną liczbę chromosomów $2n = 14$. Podobieństwa dotyczyły również morfologii chromosomów, tj. lokalizacji centromeru, występowania tylko heterochromatyny centromerycznej i interkalarnej. Różnice między odmianami odnosiły się do ilości heterochromatyny i lokalizacji prążków interkalarnych w chromosomach. Szczególnie bogaty w heterochromatynę jest chromosom czwarty i wraz z chromosomem drugim wykazuje największy polimorfizm między badanymi odmianami. Kariotypy odmian Polon i Menuet wykazują duże podobieństwo, pozostałe trzy odmiany tworzą odrębną grupę. Ilość heterochromatyny zmniejsza się u kolejno wymienionych odmian Polon = Menuet > Grit > Diva > Aramir.

Stwierdzono polimorfizm chromosomowy między odmianami świadczy o tym, że zmiany w ilości i lokalizacji heterochromatyny odgrywają rolę w ewolucji kariotypu *Hordeum vulgare* L.

DZIAŁANIE SYNTETYCZNYCH PYRETOIDÓW NA *PARAMECIUM PRIMAURELIA*

Zofia Komala

Zakład Zoologii Systematycznej i Doświadczalnej PAN, ul. Sławkowska 17, 31-016 Kraków

Paramecium jako przedstawiciel środowiska wodnego, narażonego na skażenie pestycydami, stanowi dogodny materiał testowy¹ do badania stopnia toksyczności tych związków i ich wpływu na potomstwo przeżywających

¹ Komala Z., Bull. Environ. Contam. Toxicol. 28, 660 (1982).

osobników uzyskany drogą autogamii, i wegetatywną. Materiałem badań były pantofelki z homogenicznej hodowli, w zsynchronizowanym stadium cyklu życiowego (dojrzałe do koniugacji), należące do jednego z 2 typów koniugacyjnych. Badano roztwory insektycydów pyretroidowych Cymbush 25 EC i Ambush 25 EC o różnej koncentracji substancji czynnych cypermetryny i permetryny. Uzyskane wyniki wskazują, że badane insektycydy nie powodowały zaburzeń mechanizmu podziału komórkowego i anomalii morfologicznych, jak to miało miejsce w przypadku innych pestycydów, jak Gesagard² i Cartap, testowanych na pantofelkach.

DŁUGOŚĆ OKRESU MIĘDZYAUTOGAMICZNEGO W ZESPOLE BLIŹNIACZYCH GATUNKÓW *PARAMECIUM AURELIA*

Halina Kościuszko, Małgorzata Prajer

Zakład Zoologii Systematycznej i Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk, ul. Sławkowska 17,
31-016 Kraków

Badania przeprowadzono na poautogamicznych klonach wyprowadzonych z 25 szczepów standardowych, należących do 15 gatunków zespołu *Paramecium aurelia*. Długość okresu międzyautogamicznego badano w liniach codziennego izolowania w standardowych warunkach hodowli. Do określenia okresu międzyautogamicznego przyjęto średnią z liczby podziałów między trzema kolejnymi autogamiami.

Rozpiętość okresu między autogamiami wynosiła od 12 do 53 podziałów, przy czym jego długość wykazywała zależność od wielkości komórek badanych gatunków. I tak gatunki o małych wymiarach komórek charakteryzowały się średnią liczbą podziałów wynoszącą 22. Gatunki o komórkach średniej wielkości wymagały przeciętnie 28 podziałów do wystąpienia masowej autogamii, natomiast u gatunków o dużych komórkach autogamia pojawiała się dopiero po 34 podziałach. Od tej prawidłowości istnieją nieliczne odstępstwa. Wyniki opracowano statystycznie.

² Komala Z., Folia Biol. (Kraków), 23, 231-243 (1975).

ADHEZYJNE ODDZIAŁYWANIE KOMÓREK Z PODŁOŻAMI O MODYFIKOWANEJ HYDROFILNOŚCI

Hanna M. Kowalczyńska, Jarosław Kamiński

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

Instytut Chemii Przemysłowej, Zakład Lekkiej Syntezy Organicznej, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa

Badano adhezję komórek L 1210 do podłoża kopolimerowych o modyfikowanej hydrofilności. Kopolimery styren–metakrylan metylu różniły się ilościowym stosunkiem merów. Modyfikacje hydrofilności podłoża uzyskano przez wprowadzenie grup sulfonowych do merów styrenu w reakcji sulfonowania gazowym SO_3 . Hydrofilność powierzchni oceniano metodą pomiaru kąta zwilżania. Stwierdzono, że adhezyjne oddziaływanie komórek zależy od hydrofilności podłoża i od czasu oddziaływania komórek z podłożem.

POLIMORFIZM SEGMENTÓW HETEROCHROMATYNOWYCH U *ALLIUM VINEALE*Józef Krawczyk¹, Andrzej Kornaś¹, Andrzej Joachimiak²¹ Zakład Botaniki WSP, 31-054 Kraków, ul. Podbrzezie 3² Zakład Cytologii i Embriologii Roślin UJ, 31-044 Kraków, ul. Grodzka 52

Allium vineale jest tetraploidem o liczbie chromosomów $2n = 32$. Badania chromosomów metodą prążków C wykazały, że jest to gatunek alotetraploidalny. Chromosomy *A. vineale* zawierają bardzo dużo heterochromatyny telomerowej i interkalarniej, ponadto niewielką ilość heterochromatyny centromerowej. Różne rośliny w obrębie jednej populacji mogą się różnić udziałem heterochromatyny w kariotypie (od 31 do 38%). Szczególną zmienność wykazują segmenty heterochromatyny telomerowej. Przeanalizowano także zmienność poszczególnych typów chromosomowych pod tym względem.

WPLYW ALKILOSULFONIANÓW NA AKTYWNOŚĆ DZIAŁANIA CHLORKU DODECYLOOKSYMETYLENO-MORFOLINIOWEGO NA PROCES DESORPCJI JONÓW WAPNIA Z BŁON LIPOSOMÓW LECYTYNOWYCH

J. Kuczera, A. Fogt, K. Kubica, S. Przystalski, S. Witek*, I. Pluciński*

Katedra Fizyki i Biofizyki, Akademia Rolnicza, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław

* Instytut Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych, Politechnika Wrocławska, ul. Łukasiewicza 2, 50-377 Wrocław

W pracy badano wpływ kompleksów alkilosulfonianów o liczbie atomów węgla w łańcuchu alkilowym $n = 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14$ z chlorkiem dodecylooksymetyleno-morfoliniowym na wartość względnej stałej szybkości desorpcji

jonów wapnia z błon liposomów lecytynowych. Analogiczne pomiary przeprowadzono z liposomami modyfikowanymi oddzielnie chlorkiem dodecyloksymetyleno-morfoliniowym i homologicznym szeregiem alkilosulfonianów.

Otrzymane wyniki wskazują na silną zależność stałej szybkości procesu desorpcji jonów wapnia od stężenia oraz od długości łańcucha alkilowego anionu w kompleksie. Kompleksy o łańcuchu alkilowym sulfonianu zawierającym mniej niż 10 atomów węgla zwiększają kilkakrotnie efektywność działania chlorku dodecyloksymetyleno-morfoliniowego.

Przedyskutowano efektywność ich działania ze względu na kształt i polarność cząsteczek.

TERMINALNE KOMPLEKSY SYNTEZY CELULOZY

Krystyna Kudlicka

Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Makrocząsteczkowe, liniowe struktury połączone z błoną cytoplazmatyczną (komórkową) są opisywane jako terminalne kompleksy syntetyzujące mikrofibryle celulozy. Dotychczasowe badania nad morfologią tych struktur oparte były na metodzie freeze-fracture. W pracy tej terminalne kompleksy były identyfikowane i charakteryzowane w mikroskopie elektronowym na materiale utrwalonym w aldehydzie glutarowym. Na przekrojach ściany komórkowej glonu *Boergerenia forbesii* (Harvey Feldmann) terminalne kompleksy bardzo ściśle przypominają rozmiarami (około 600 nm długości, 30 nm szerokości i 35 nm grubości) i rozmieszczeniem takie same struktury uwidocznione metodą freeze-fracture. W sąsiedztwie wewnętrznej warstwy ściany komórkowej terminalne kompleksy są połączone z nowo syntetyzowanymi mikrofibrylami celulozy. W pobliżu terminalnych kompleksów od strony cytoplazmatycznej znajdowano liczne polisomy, pęcherzyki i mikrotubule (Kudlicka K, Wardrop A., Itoch T., Brown R. M. Jr., *Protoplasma*, **136**: 96–103, 1987).

Inny rodzaj kompleksów, nazywanych kompleksami stacjonarnymi, obserwowano w otocze *Acetobacter xylinum*. Kompleksy te związane są z mikrofibrylami celulozy wychodzącymi z komórki w postaci długich pasm.

AKTYWNOŚĆ MITOTYCZNA KOMÓREK GRASICY ŻABY TRAWNEJ *RANA TEMPORARIA* W CYKLU ROCZNYMBarbara Płytycz¹, J. Dulak¹, J. Bigaj², K. Janeczko³¹ Zakład Anatomii Porównawczej, Instytut Zoologii UJ, ul. M. Karasia 6, 30-060 Kraków² Pracownia Mikroskopii Elektronowej AR, Kraków³ Zakład Neuroanatomii UJ, Kraków

Grasica żab trawnych *Rana temporaria* podlega bardzo wyraźnym, cyklicznym zmianom rocznym (Płytycz i Bigaj, Thymus, 5: 327, 1983). Latem podzielona jest wyraźnie na bogatą w limfocyty korę i nabłonkowy rdzeń. Strefa korowa praktycznie zanika podczas hibernacji, a narząd ten obfituje wówczas w komórki wydzielnicze i cysty. Odbudowa części korowej następuje wiosną, głównie po zakończeniu okresu godowego. Zmianom tym towarzyszy wysoce zróżnicowana aktywność mitotyczna, szacowana na podstawie autoradiograficznego wykrywania komórek z wbudowaną do jądra tymidyną znaczoną trytem. W okresie hibernacji nieliczne komórki syntetyzujące DNA rozproszone są w centrum narządu. Wiosną ich liczba gwałtownie wzrasta głównie w strefie podkapsularnej, osiągając maksimum w maju, gdy znaczone trytem komórki występują w znacznej liczbie w części korowej i są również dość liczne w rdzeniu narządu. Proliferacja komórek stopniowo słabnie latem i jesienią.

PRÓBA IZOLACJI Z NERKI GŁOWOWEJ PSTRĄGA TĘCZOWEGO *SALMO GAIRDNERI*, LEUKOCYTÓW ZDOLNYCH DO CHEMILUMINESCENCJIBarbara Płytycz¹, G. M. Flory, Irja Galvan, Ch. J. Bayne

Department of Zoology, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA

¹ Zakład Anatomii Porównawczej, Instytut Zoologii UJ, ul. M. Karasia 6, 30-060 Kraków

Podjęto próbę izolacji z nerki głowowej pstrąga tęczowego populacji leukocytów zdolnych do wzmocnionej luminogenem chemiluminescencji (CL), towarzyszącej wytwarzaniu wysoce reaktywnych rodników tlenowych o silnych właściwościach bakteriobójczych. Spośród czterech prązków uzyskanych podczas wirowania zawiesiny w ciągłym gradiencie roztworu *Percollu* (Bayne, Vet. Immunol. Immunopathol., 12: 141, 1986), bardzo silną reakcję CL

indukowaną przez PMA (Phorbol Myristate Acetate) obserwowano jedynie w komórkach odzyskanych z prążka drugiego. Zarówno obserwacje morfologiczne, jak i analiza z zastosowaniem cytometrii przepływowej dowiodły jednak, że prążek ten nie jest homogenny i zawiera populacje dużych komórek ziarnistych (heterofili i monocytów/makrofagów) oraz populację drobnych komórek (limfocytów). Limfocyty dominowały wśród komórek prążka trzeciego, wykazujących znikomą reakcję CL. Trwają próby izolacji z prążka drugiego dużych komórek ziarnistych, odpowiedzialnych za zjawisko chemiluminescencji.

CHROMOSOMY *PARAMECIUM JENNINGSI* (CILIOPHORA, PROTISTA)

Ewa Przyboś

Zakład Zoologii Systematycznej i Doświadczalnej, PAN, 31-016 Kraków, ul. Sławkowska 17

Chromosomy *Paramecium jenningsi* badano stosując nową metodę¹ (Jurand, Przyboś, 1984; Przyboś, 1986) analizy 0,5 µm skrawków dzielących się pantofelków utrwalonych i zatopionych jak do mikroskopii elektronowej, ale po zabarwieniu błękitem toluidyny, badanych w mikroskopie świetlnym. Diploidalną liczbę chromosomów określano w poszczególnym mikrojądrze będącym w anafazie mitozy przez dodanie chromosomów z wszystkich kolejnych skrawków tego mikrojądra. Przy zastosowaniu tej metody, bardziej precyzyjnej niż stosowana poprzednio analiza preparatów gniecionych, stwierdzono kariologiczne zróżnicowanie szczepów *P. jenningsi* w obrębie jednego genetycznego gatunku.

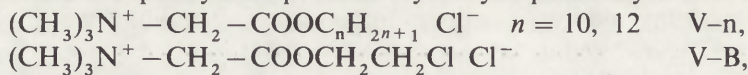
WYZNACZANIE WSPÓŁCZYNNIKÓW PODZIAŁU WYBRANYCH SOLI ESTRÓW GLICYNY MIĘDZY FAZĄ WODNĄ I LIPIDOWĄ

B. Roszak, A. Maciąg, S. Przystalski, S. Witek*

Katedra Fizyki i Biofizyki, Akademia Rolnicza, Wrocław

* Instytut Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych, Politechnika Wrocławska

Wyznaczono współczynniki podziału wybranych pochodnych estrów glicyny:



między fazą wodną i lipidową (liposomy).

¹ Jurand A., Przyboś E., Folia Biol. (Kraków), **32**: 295-300, 1984; Przyboś E., Folia Biol. (Kraków), **34**: 133-160, 1986.

Liposomy formowano z lecytyny jaja kurzego.

Pomiary wykonano dla dwóch różnych stężeń lecytyny, tj. 31, 8 i 9,4 mg/ml. Ponadto dla każdego stężenia lecytyny wykonano pomiary dla dwóch różnych stężeń badanych związków.

Molowy współczynnik podziału obliczano ze wzoru

$$K = \frac{\frac{n_z}{n_l}}{\frac{n_w}{n_{H_2O}}}$$

gdzie n_z – ilość moli związku w fazie lipidowej, n_l – ilość moli fazy lipidowej, n_w – ilość związku w fazie wodnej, n_{H_2O} – ilość moli wody.

Przyjęto, że stężenie związku w fazie wodnej jest równe stężeniu jonów chlorkowych w roztworze. Stężenie jonów chlorkowych określano przez pomiar siły elektromotorycznej ogniwa.

Stwierdzono, że związek V-B nie wbudowuje się do błony lipidowej, oraz że współczynnik podziału zależy od stężenia badanego związku i jest wyższy dla związków o dłuższym łańcuchu alifatycznym.

EFFECT OF SELECTED AMMONIUM SALTS ON PROPERTIES OF BLMs

J. Sarapuk, S. Przestalski, S. Witek*

Department of Physics and Biophysics, Agricultural Academy, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland

* Institut of Organic and Polymer Technology, Technical University, ul. Łukasiewicza 2, 50-371 Wrocław, Poland

The effect has been studied of a series of biologically active quaternary ammonium salts (AS) of chemical formula $(CH_3)_3N^+CH_2OR$ on flat biomolecular lipid membranes (BLM) formed of the total phospholipid fraction of bovine erythrocytes. The respective compounds of the series differed in their alkyl chain length. The aim of the study was find the critical concentration (CC) that destroyed the BLM. The effectiveness of BLM destruction was found to increase with increasing alkyl chain length of the AS, the difference in critical concentrations between salts with shortest chain ($R = C_4H_9$) and salts with longest chain ($R = C_{18}H_{37}$) being about two orders of magnitude. It seems however, that the salt with $R = C_{14}H_{29}$ exhibits maximum interaction with the model membranes studied, this showing itself in a slightly lower critical concentration. The results obtained correlate well with biological tests performed on *Alternaria tenuis* and *Botritis cinerea* fungi.

CYTOTOKSYCZNE KONSEKWENCJE PRZEDŁUŻONEGO ZAHAMOWANIA
SYNTEZY DNA PRZEZ ZWIĄZKI PRZECIWNOWOTWOROWE O CHARAKTERZE
ANTYMETABOLITÓW

Jadwiga Sawecka, Janina Malec

Zakład Biochemii Instytutu Hematologii, 00-957 Warszawa, ul. Chocimska 5

Zahamowanie syntezy DNA z zachowaniem syntezy białek prowadzi do stopniowego zaburzenia równowagi białko/DNA oraz patologicznego wzrostu wielkości komórek (wzrost nie zrównoważony). Według ostatnio sformułowanej hipotezy towarzyszy temu pobudzenie syntezy, akumulacja i wyciek hydrolaz komórkowych. Udział endonukleaz w tym procesie może powodować częściowo reperowane uszkodzenia DNA. Zahamowanie reperacji DNA prowadzi do ujawnienia tych uszkodzeń (Chem.-Biol. Interact. **57**, 315, 1986; **60**, 47, 1986).

Celem naszej pracy było zbadanie zależności między stopniem zahamowania syntezy DNA i proliferacji komórek, ich obumieraniem oraz przyrostem aktywności kwaśnej DN-azy a stopniem uszkodzenia DNA. Efekty te porównywano w komórkach L5178Y poddanych w ciągu 48 godz. działaniu hydroksymocznika (HU) lub metotreksatu (MTX) w hodowlach bez inhibitora reperacji DNA lub z jego dodatkiem (kofeina).

Uzyskane wyniki wykazały, że HU w stężeniach 0,1 – 0,05 – 0,02 mM powodował zależne od dawki zahamowanie proliferacji komórek i syntezy DNA, wzrost liczby komórek martwych oraz autolizy preformowanego DNA. Elektroforeza na agarozie DNA lizatów komórkowych wskazywała na wczesną stopniową fragmentację preformowanego DNA. Efekty te pogłębiały się w obecności kofeiny. Aktywność wewnątrzkomórkowej DN-azy stopniowo wzrastała, przy czym efekt ten był wyraźniej widoczny w komórkach inkubowanych w 0,05 niż w 0,1 mM HU. Równocześnie komórki te wykazywały największą wrażliwość na obecność kofeiny.

W komórkach poddanych działaniu 0,001 – 0,0001 – 0,00001 MTX obserwowano również zależność efektów cytotoksycznych od obecności kofeiny, chociaż była ona mniej wyraźnie zaznaczona niż w HU. Stosowane dawki MTX były jednak zbyt wysokie lub zbyt niskie, aby spowodować wyraźne zróżnicowanie stopnia wzrostu nie zrównoważonego w ciągu 48 godz.

Reasumując dotychczasowe wyniki oceniamy jako zgodne z naszą roboczą hipotezą o istnieniu zależności między stopniem wzrostu nie zrównoważonego a stopniem uszkodzenia DNA.

THE PINOCYTOSIS IN AMOEBEA PROTEUS INDUCED BY SUBTHRESHOLD
CONCENTRATION OF HEPARIN

Lucyna Grębecka, Wanda Kłopotcka

Department of Cell Biology, Nencki Institute of Experimental Biology, 02-093 Warszawa,
ul. Pasteura 3, Poland

The formation of pseudopodia with channels is the typical response of amoebae to the pinocytotic inducers. The motionless pinocytotic rosettes are formed only when the concentration of an inducer is high enough for channel formation. The application of heparin in the subthreshold concentration limits the response of amoeba to the formation of rosettes with short pseudopodia devoid of pinocytotic channels. Dissection of such a rosette provokes arising of local pinocytotic activity and transient recovery of locomotion. The pinocytotic channels are formed always near the wound — at the uroidal poles of migrating halves. The microoperation may be considered as a very mechanical stimulus, which complements the insufficient contractile effect of the subthreshold heparin on the cell cortex around the wound.

THE PINOCYTOSIS IN THE THERMIC HYALOSPHERES OF AMOEBEA PROTEUS
AND CAFFEINE-INDUCED MICROPLASMODIA OF PHYSARUM POLYCEPHALUM

Andrzej Grębecki, Joanna Kołodziejczyk, Ewa M. Kwiatkowska

Department of Cell Biology, Nencki Institute of Experimental Biology, 02-093 Warszawa.
Pasteura 3, Poland.

The spherical, non-locomotive forms of *Amoeba proteus* and *Physarum polycephalum*, which have been produced, respectively, either by heat shock or incubation of caffeine solutions, are characterized by very large (up to 50µm) peripheral ring of transparent hyaloplasm. That creates favourable optical conditions for investigating in the light microscope the course and mechanism of pinocytosis. The pinocytosis is spontaneously manifested by such cell models, or may induced in them as well by the classical inducers (NaCl, KCl, heparin) as by local anaesthetics (ethanol, benzamid, DMSO). In both model systems the pinocytosis is produced as a cyclic phenomenon, i.e., the invagi-

nation of channels and/or separation of endosomes are continuously repeated at regular time intervals (5–15 sec., usually) by the same active spots on the cell surface. Involvement of the submembrane contractile layer of microfilaments in the invagination and inward transport of the surface material could be, in these two models, put in evidence in vivo by cinematography and videorecording.

THE INFLUENCE OF AMPHIPHILIC DERIVATIVES OF GLYCINE ESTERS ON THE ELECTRICAL PROPERTIES OF CHARACEAE CELLS MEMBRANES

T. Janas*, Z. Trela, S. Przystalski, S. Witek**

Department of Physics and Biophysics, Agricultural Academy, Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland

*Department of Applied Mathematics and Informatics, Higher College of Engineering, Zielona Góra, Poland

**Institute of Organic and Polymer Technology, Technical University of Wrocław, Wrocław, Poland

The effect of amphiphilic derivatives of glycine esters of the formula $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COOC}_n\text{H}_{2n+1}\text{Cl}^-$, $n = 10, 12, 14, 16$ ($V-n$) on electrical properties of *Nitellopsis obtusa* plasmalemma was studied. The microelectrode technique was used to elucidate the influence of the compounds on the membrane resting potential, the light – induced membrane hyperpolarization and the conductance of the plasmalemma.

These compounds caused a decrease in the potential difference between vacuole and external medium and simultaneous increase in electric conductance. The effects depend on the length of the alkyl chain (n) and the concentration of the ammonium salts. The light – induced hyperpolarization was suppressed by the ammonium salts.

It is suggested that the studied ammonium salts inhibit electrogenic proton pump in the plasmalemma and enhance the passive efflux of Cl^- ions from the alge cell.

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 PBK XIII Oddział w Warszawie nr 370044-1195-139-11. 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 prenumeraty 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 Rozpoznania 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

A. MIGDALSKA, Komórki LAK (Lymphokine Activated Killer Cells): charakterystyka i rola w terapii nowotworów	1
J. A. LITWIN, Peroksysomy komórek zwierzęcych	19
Z. KILIAŃSKA, Budowa i biologiczna rola matriks jądrowej	61
G. GÓRSKI, H. ANTOSZ, Miejsca łamliwe w genomie człowieka: znaczenie teoretyczne i praktyczne	87
III Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki (Łódź, 4-5 lipca 1988). Streszczenie komunikatów	105