

## HYBRIDOCYTOCHEMISTRY – STATE OF THE ART

M. VAN DER PLOEG

Dept. Cytochemistry and Cytometry, Medical Faculty, Leiden University

*Streszczenie.* Opracowano wiele dobrych i czułych procedur hybrydocytochemicznych, które mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce lekarskiej i rozwiązywaniu problemów naukowych. Wspomniane metody pozwalają na szybkie wykrywanie swoistych sekwencji kwasów nukleinowych ze stosunkowo dużą czułością i w dobrze zachowanym morfologicznie chromosomie, komórce czy tkance. Metody te wraz z innymi cytologicznymi i cytochemicznymi procedurami zwiększają możliwości wczesnej i dokładnej diagnozy zaburzeń cytotenetycznych, onkologicznych i zakażeń wirusowych. Dalsze udoskonalenia obecnych technik znakowania i rozwój innych modyfikacji sond (Agrawal et al. 1986; Al-Hakim and Hull 1986; Jirikowsky et al. 1989) oraz optymalizacja sposobów przeprowadzania testów wraz z enzymatycznym, fluorescencyjnym bądź elektronimikroskopowym wykrywaniem sond pozwolą w przyszłości na szersze wykorzystanie tych technik w diagnostyce i badaniach biomedycznych.

Hybridocytochemistry is based upon the fact that a single strand of a gene (a specific part of a nucleic acid) under the right conditions can reanneal (= hybridize) with its complementary strand.

Hybridocytochemistry is a rather young branch of cytochemistry. When published for the first time by Pardue and Gall (1969), John et al. (1969) and Buongiorno-Nardelli and Amaldi (1970), it was named *in situ hybridization*, to distinguish this procedure from the method, developed by Spiegelman (1961), to obtain hybridization of complementary strands of nucleic acids in a test tube. Because the method is not performed *in situ*, but on microscopic slides or in cell suspensions, more recently the name "hybridocytochemistry" in concordance with e.g. immunocytochemistry, has been coined for this elegant analytical procedure. In the original method, the probes were labeled with radio-isotopes, so as to enable visualization of the resulting hybrid by autoradiography (Steffensen 1977). The radioactive hybridocytochemistry at present has reached a very high sensitivity, i.e. DNA sequences of a few

---

A summary of presentations given in Warsaw, Poznan and Cracow in December 1988.

hundred base pairs in length can be localized in metaphase chromosome or electron microscopic preparations by autoradiography after in situ hybridization with specific probes after a relatively short exposure time (Harper et al. 1981, Hutchison et al. 1982). Detection of low copy number mRNA molecules in individual cells by radioactive labeled probes has also been described (Harper et al. 1986) and the applicability of chemically synthesized oligodeoxyribonucleotides with better accessibility to cellular mRNAs can be mentioned as a relatively recent development for the radioactive hybridocytochemical localization of mRNA (for a review see Coghlan et al. 1985). In spite of this sensitivity, application of these radioactive hybridization procedures has been restricted to research laboratories, mainly by the inconveniences due to radioactive labeling.

Because of the time-consuming procedure that asked for a number of safety measures, and the low resolution obtainable with such probes at that time, about 1975 investigations were started to introduce fluorochromes as labels. Rudkin and Stollar (1977) were the first to publish a fluorescent hybridocytochemical method, employing antibodies specific against RNA.DNA hybrids. After hybridization of 5S ribosomal RNA genes on *Drosophila* polytene chromosomes with an RNA probe, they applied a rabbit-derived antibody against DNA.RNA duplexes for the detection of the specific hybrids. The anti-DNA.RNA antibody was visualized by a second fluorochrome-labeled antibody against rabbit immunoglobulins. Because it proved difficult to raise antibodies against DNA.RNA (Van Prooijen-Knegt et al. 1982), others started to introduce fluorochromes into the probe. Initially the probe was labeled itself (Bauman et al. 1980) by oxidation of the 3' end of RNA probes, reacting the resulting aldehyde groups with hydrazine and using the free amino group obtained in this way to bind tetramethyl-rhodamine or fluorescein isothiocyanate. The method worked, e.g. for the detection of kinetoplast DNA in the insect *Crithidia luciliae* and also for the localization of the 5S ribosomal RNA genes in *Drosophila melanogaster*. The advantage of the method is the fact that only one incubation is necessary — it is a direct method — which implies a relatively low background; the disadvantage seemed that the number of fluorochromes introduced in this way was too low to allow detection of small targets. The method, however, like the other procedures discussed hereafter, shows the advantages of stability of probes (in comparison with the limited functional half-life of  $^{32}\text{P}$ - or  $^{35}\text{S}$ -labeled probes), high topological resolution, fast procedures, and no radio-isotope waste.

Renz and Kurz (1984) published a method to label nucleic acid probes with an enzyme, but this procedure is not optimal either with respect to sensitivity. Recently, however, Dirks et al. (1989b) used the direct labeling of oligonucleotide probes with FITC to detect mRNA of the egg-laying hormone in caudodorsal cells of the pond snail *Lymnea stagnalis* obtaining a high sensitivity in their preliminary results.

In the methods which at this moment are used most frequently, a hapten group is introduced into the probes (Langer et al. 1981; Landegent et al. 1984; Sverdlov et al. 1974) or the hybrid (Hopman et al. 1986b), so that after the hybridization, a labeled antibody can detect the specific hybrid in the microscopic preparation, to visualise it by an immuno-fluorescence, -enzyme, or -gold reaction. Several of the modification chemicals are commercially available, so that — now that the number of specific nucleic acid probes is steadily growing — the method becomes more and more interesting for fundamental and diagnostic biomedical purposes. Further improvement in labeling methods, assay formats and enzymic or fluorescent detection procedures, should allow for wider application of nucleic acid hybridization reactions in diagnostic microbiology and basic research in infectious disease, cytogenetics and oncology. Such developments might markedly improve the care of patients with infectious diseases and allow a better understanding of the epidemiology and pathophysiology of such infections. The study of the connection between specific chromosome abnormalities and some forms of cancer or congenital defects may also benefit from these molecular diagnostic methods.

In the following, five indirect labeling methods which are used frequently to obtain haptenization of probes, will be described, as well as some applications already in use. Finally some suggestions will be given to indicate potential fields of development for this analytical method.

#### BIOTINATION OF PROBES

Biotinated nucleic acid probes can be produced following the procedure developed by Ward and co-workers (Langer et al. 1981) using biotin-containing nucleotide triphosphate analogues of cytidine (attached covalently to the C-5 position of the pyrimidine ring through an allylamine linker arm) and nick translation, or the random priming method. One of the early applications of in situ hybridization with probes labeled following this method, was also the mapping of certain genes on polytene chromosomes of *Drosophila* (Langer-Safer et al. 1982). The length of the linker arm is critical for the proper exposure of the biotin moiety in the hybrid (Brigati et al. 1983).

Other procedures have been developed to introduce the biotin by use of a photo-activatable analogue of biotin (Forster et al. 1985) or through a (chemical) transamination reaction (Viscidi et al. 1986). The detection of the probes after hybridization is mediated by (strept) avidin or anti-biotin-antibodies, coupled to fluorochromes or enzymes. Pinkel et al. (1986b) developed a procedure to amplify the fluorescence intensity of the specific hybridization signal, using biotinated goat anti-avidin, followed by an additional layer of avidin. Up to three layers of avidin could be used.

## ACETYLAMINOFLUORENE (AAF) AS A LABEL FOR NUCLEIC ACID PROBES

This haptization procedure is based on the fact that acetoxy-AAF reacts under mild conditions covalently with the C-8 of guanosine residues in DNA or RNA. The resulting AAF-modified probe can be detected after the in situ hybridization reaction via anti-AAF antibodies. DNA as well as RNA, double- or single-stranded, can be readily labeled in this way (Landegent et al. 1984; Tchen et al. 1984). The relative concentrations of nucleic acid and activated AAF determine the extent of the haptization of the probe. When coupled to a protein carrier, AAF-guanosine is a strong immunogen, so that poly- or monoclonal anti-AAF antibodies are easily obtainable. The first detection of a small single copy sequence by non-isotopic hybridocytochemistry, was performed with this method, using AAF-modified DNA probes to localize part of the human thyroglobulin gene (Landegent et al. 1985).

## DIGOXIGENIN LABELING OF PROBES

Recently, Boehringer (Mannheim, FRG) has introduced a labeling procedure, using similar chemistry as for the modification of (d)UTP with biotin, applying the hapten digoxigenin at the C-5 position of dUTP. Digoxigenin is incorporated in DNA by nick translation or primer extension.

## SULFONATION/TRANSAMINATION OF PROBES

Bisulfite reacts reversibly with the C-5—C-6 double bond of cytidine residues in DNA to give 5,6-dihydroxycytidine-6-sulfonate. The reversibility of the reaction does not allow the isolation of the modified probe, however, when in a subsequent reaction nucleophiles like *o*-methoxyhydroxylamine are used to convert the cytidines, one obtains stable reaction products like — in this example — N4-methoxy-5,6-dihydroxycytidine-6-sulfonate (Morimoto et al. 1987). As the transamination will change the NH<sub>2</sub> group of cytidine which is involved in the Watson-Crick base-pairing, there is quite a negative effect on the stability of the modified duplexes. In practice, however, the effect is not of such an order that it influences the specificity of the hybridization reaction. The modified probes can — after the hybridization procedure — be detected following different procedures. One may use antibodies against the transaminated cytidine nucleotide, but it is also possible to apply a hapten in the transaminating compound. The first approach has been used by Organics (Israel) which commercialized the procedure. The other approach, using biotin as the hapten, has been described by Viscidi et al. (1986) and by Reisfeld et al. (1987).

## THE MERCURY MODIFICATION

This method is different from the previous ones in so far that the hapten is introduced after the hybridization procedure. The nucleic acid probe (DNA or RNA, double- or single-stranded) is only mercurated at the C-5 position of

the pyrimidines, which has the advantage that the hybridization efficiency and specificity will be hardly effected. The mercurated probe is used for the hybridization procedure, after which it is rendered immunochemically detectable by a reaction with a compound that on one side carries a sulfhydryl group that assures a firm binding to the probe-bound mercury, and on the other terminus carries the hapten group (Hopman et al. 1986b). The chemical structure of the SH-hapten ligand was found to be of great importance for the result of the visualization reaction. Trinitrophenol, biotin and fluorescein, have been used as hapten groups.

#### SENSITIVITY

All the described modification procedures have in common that the presence of the hapten does not affect the hybridization properties of the probes to an appreciable extent at the modification degrees commonly used (1–10% of all nucleotides). Furthermore, in principle one can not say that one modification procedure results in better recognizable probes than another: all modifications result in probes with comparable hybridization efficiencies. Differences in hybridization and visualization results, if present, most probably are due to differences in pretreatment of the microscopic preparation (Raap et al. 1986), the avidity of the primary or secondary antibodies, or the signal amplification systems used. Originally, only large targets could be detected, like repetitive DNA sequences (Cook and Hindley, 1979; Burk et al. 1985; Willard, 1985; Devilee et al. 1986; Moyzis et al. 1987) ranging from 100 kilobasepairs up to a few megabases. Among these original targets were the ribosomal RNA genes on the acrocentric human chromosomes, the alpha-satellite DNA's on centromeres and the repetitive sequences on the long arm of the Y chromosome (Manuelidis et al. 1982; Pinkel et al. 1986a).

Refinement of the procedure with regard to new and more sensitive labeling methods, better incubation protocols, signal amplification procedures, ultimately led to the detectability of single copy gene sequences. In absolute units, single copy gene sequences as small as 2.5 kb can now be easily localized in chromosome or cell preparations (Garson et al. 1987; Ambros et al. 1987a, 1987b; Lawrence et al. 1988; Cherif et al. 1989). The most recent development with respect to the detection of numerical or structural chromosome aberrations came with the availability of chromosome specific libraries as probes (composite probes) containing up to a few thousand individual probe sequences, which can hybridize (or "paint") individual chromosomes over their total length, simplifying the identification of structural aberrations in metaphase figures (Cremer et al. 1988; Pinkel et al. 1988).

#### MULTIPLE SIMULTANEOUS HYBRIDIZATIONS

Since several reliable independent probe labeling procedures are now available, it has become feasible to perform multiple simultaneous hybri-

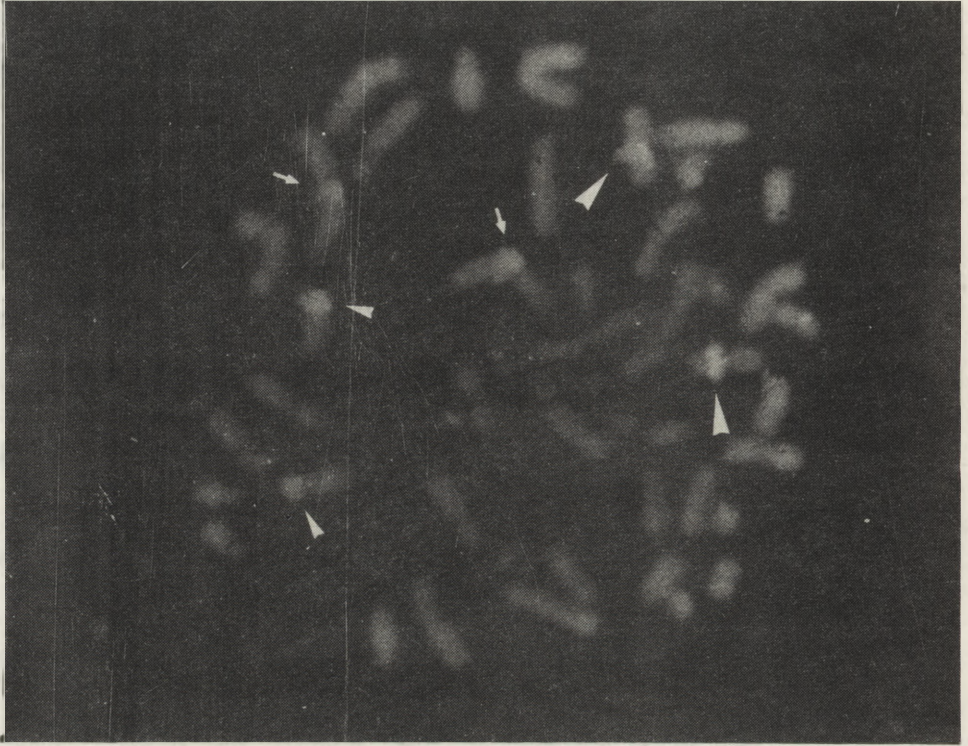


Fig. 1. Fluorescent image of a human metaphase spread after in situ hybridization with probes specific for the centromeric regions of chromosomes nr 1, ( $\uparrow$ , red, TRITC); chromosomes nr 9, ( $\blacktriangle$ , green, FITC); and chromosomes nr 15, ( $\blacktriangle$ , green, FITC). DAPI was used as a blue counterstain for total human DNA (from Department of Cytochemistry and Cytometry)

dization, applying different fluorochromes to recognize the individual target sequences in the preparation (Hopman et al. 1986a; Nederlof et al. 1989a). By use of the right probes and hybridization conditions, it is now possible to visualize four different pairs of chromosomes in one metaphase spread or interphase nucleus (Nederlof et al. 1989b). The probes are labeled with AAF, biotin, digoxigenin, and double-labeled with AAF and biotin; as the fluorochromes, fluorescein isothiocyanate, tetramethylrhodamine isothiocyanate, and amino methyl coumarin acetic acid (AMCA), a recently developed blue fluorochrome (Nederlof et al. 1989a), are used. The fourth target is detected by the fact that it shows both red and green fluorescence when properly excited.

#### NON-ISOTOPIC HYBRIDOCYTOCHEMISTRY IN SUSPENSION

Trask et al. (1985) were the first to report in situ hybridization to nuclei in suspension. They hybridized mouse satellite DNA to mouse thymocyte

nuclei and measured the resulting probe-related fluorescence on a flow cytometer. In a follow-up paper the detection of specific chromosomes within human cell line nuclei was described (Trask et al. 1988).

Since the morphology of nuclei hybridized in suspension is well-preserved, hybridization to nuclei in suspension also opened the way to investigate the three dimensional localizations of specific chromosomes in interphase nuclei. Already a hundred years ago speculations have been made about specific chromosome domains and alignment of chromosomes within interphase nuclei (Rabl 1885; Hubert and Bourgeois 1986). Since then, many studies following different approaches have been performed to unravel such compartmentalization if present. The introduction of optical sectioning and 3-dimensional computer analysis (Agard and Sedat 1983; Borden and Manuelidis 1982; Brakenhoff et al. 1985) allows to study the spatial organization of fluorescent signals obtained by in situ hybridization with chromosome specific probes at the resolution level of the light microscope, which is potentially tenths of a micrometer (Manuelidis 1985; Schardin et al. 1985; Lawrence et al. 1988; Pinkel et al. 1988; Cremer et al. 1988; Van Dekken et al. 1989). The rapid progress in the fields of microscopy and computer modelling will show to be of tremendous value in this field of research.

#### APPLICATIONS OF HYBRIDOCYTOCHEMISTRY

The development of nonradioactive hybridocytochemical methods has taken away most of the obstacles to wider application of this procedure as a research and diagnostic tool (Van der Ploeg and Raap 1988; Raap et al. 1989). Hybridocytochemistry will be of importance for the detection of viruses which for various reasons are difficult to detect otherwise (Unger et al. 1986). In vitro cultivation of parvo, human papilloma and Epstein-Barr virus, for instance, is not possible and cannot be applied as a diagnostic procedure. The cultivation of human cytomegalovirus is difficult – sometimes impossible, due to the application of anti-viral drugs – and consuming too much time, to be of diagnostic value (Schrier et al. 1985; McDougall et al. 1986; Raap et al. 1988; Jiwa et al. 1989). Several investigations have recently been published showing that at this moment already papilloma virus in various cancers, parvo virus in fetal erythema infectiosum, herpes simplex in herpes encephalitis, and JC virus in progressive multifocal encephalitis can be identified (Burns et al. 1985; Boerman et al. 1989; Aksamit et al. 1985; Nakamura et al. 1985; Salimans et al. 1989). Sixbey et al. (1984) used biotin-labeled probes to detect Epstein-Barr virus in oropharyngeal epithelial cells. The technique has become operational in routine diagnostic settings to check for cytomegalovirus infection in immunodeficient (transplant) patients (Loning et al. 1986; Myerson et al. 1984; Raap et al. 1988; Jiwa et al. 1989). Partly due to the fact that virus-infected cells

in pathological tissues most often contain high copy numbers of that virus, the specific hybrid signal in those cells is clearly recognizable.

One advantage of the application of hybridocytochemistry with a peroxidase-DAB end product in viral diagnosis is the fact that screening of the preparations can be done at low magnification because it is not necessary to look for morphologic changes in cells that otherwise have the same colors as the non-infected tissue. Once a cell or cell cluster different in color has detected, one only has to check and discriminate at higher magnification for possible artefacts. This fact facilitates the detection of numbers of cells as small as one in a million, and lends itself to automation procedures (Jiwa et al. 1988, 1989).

Furthermore, this approach may become a key diagnostic aid and the method of preference for the detection of the expression of oncogenes and other cancer-related genes, although the detection of gene transcripts (mRNAs) with these methods at present is still largely unexplored.

As described above, localization of genes using repetitive sequences specific for certain regions of metaphase chromosomes, is possible in metaphase spreads, but also in interphase nuclei (Landegent et al. 1985, 1986; Cremer et al. 1986, 1988; Wachtler et al. 1986; Devilee et al. 1988; Hopman et al. 1989; Hutchison et al. 1982; Ambros et al. 1987). Van Dekken et al. (1989b) used this technique recently to detect host cells following sex-mismatched bone marrow transplantation. Using a Y-chromosome specific probe, Y-bearing cells were monitored in blood and bone marrow samples from patients with hemopoietic malignancies a sex-mismatched bone marrow transplantation. The sensitivity of this method is in the order of 0.1% Y-bearing nuclei in male recipients, transplanted with female marrow. In female recipients of male marrow, the detection of low numbers of non-Y-bearing nuclei is less sensitive, but in all cases investigated the results of the hybridocytochemical procedure was as sensitive or better than those of the routinely applied cytological or cytogenetic tests. The technique is applicable to the identification of species-specific chromosomes in somatic cell hybrids using total genomic DNA (of that species) as the probe, or repetitive sequences (Durnam et al. 1985; Pinkel et al. 1986).

Amplification of genes in cell suspensions (in vivo, or in vitro – under specific culturing conditions) can be analysed quantitatively by combination of hybridocytochemistry of cells in suspension and flow cytometry, but also be traced back to the individual chromosomes involved. By application of double hybridocytochemistry and probes specific for both species of a somatic cell hybrid, subtle chromosomal translocations have been detected (Hopman et al. 1986a).

Because karyotyping in metaphase preparations – depending on the cell sample – can be rather cumbersome or impossible, a very interesting application of fluorescence hybridocytochemistry for oncology and cytogenetics is the rapid identification of (parts of) chromosomes in interphase cells



of solid tumors and chorion villi (Burns et al. 1985; Manuelidis and Ward 1984; Cremer et al. 1986; Hopman et al. 1988; Lichter et al. 1988; Arnoldus et al. 1989). The investigation of chromosome aberrations in interphase nuclei – called interphase cytogenetics – proved to be of great importance to cancer research and cytogenetics. Also it should be possible to ‘band’ metaphase chromosomes by in situ hybridization with sub-sets of the above-mentioned composite probes. It is to be expected that such a chromosome-banding would be better recognizable even in less optimal metaphase spreads, and that such a procedure should improve the karyotyping of metaphase chromosomes.

#### mRNA DETECTION

In the field of mRNA detection, the radioactive hybridocytochemical procedures are still superior to non-isotopic hybridocytochemistry with respect to sensitivity (Angerer et al. 1985; McCabe et al. 1986). Numerous studies regarding the autoradiographic localization of mRNA sequences by in situ hybridization have been published (see for a review Coghlan et al. 1985), but so far only a few deal with the detection and localization of mRNA by non-isotopic hybridocytochemistry (Singer and Ward 1982; Izumi et al. 1988; Bresser and Evinger-Hodges 1987; Ayer-Le Lievre et al. 1989). This is partly due to technical difficulties, which necessitate special precautions to decrease the loss of the RNA sequences during fixation and hybridization incubations (Lawrence and Singer 1985). Synthetic probes have recently been explored for non-isotopic hybridocytochemical detection of peptide mRNA molecules in brain tissue (Dirks et al. 1989a), and seem to provide promising results.

#### CONCLUSIONS

Several reliable and sensitive nonradioactive hybridocytochemistry procedures have been developed and can be applied as diagnostic and research tools. The methods allow rapid detection of specific nucleic acid sequences in morphologically well-preserved chromosome, cell, and tissue preparations, with a relatively high sensitivity. The availability of these methods, in addition to other cytologic and cytochemical procedures, improves the possibilities of early and accurate diagnosis of cytogenetic, viral, and oncological aberrations. Further improvement of the existing labeling techniques, the development of other probe modifications (Agrawal et al. 1986; Al-Hakim and Hull 1986; Jirikowsky et al. 1989), and optimization of the assay formats and enzymic, fluorescent or E.M. detection techniques, should allow for an even wider application of these methods in diagnostic and basic biomedical research fields.

## REFERENCES

- AGARD D. A., SEDAT J. W. (1983) Three-dimensional architecture of a polytene nucleus, *Nature*, **302**: 676-681.
- AGRAWAL S., CHRISTODOULOW C., GAIT M. J. (1986) Efficient methods for attaching non-radioactive labels to the 5' ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides, *Nucl. Acids Res.*, **14**: 6227-6245.
- AKSAMIT A. J., MOURRAIN P., SEVER J. L., MAO E. O. (1985) Progressive multifocal leukoencephalopathy: investigation of three cases using in situ hybridization with JC virus biotinylated probes, *Ann. Neurol.*, **18**: 490-496.
- AL-HAKIM A. H., HULL R. (1986) Studies towards the development of chemically synthesized non-radioactive biotinylated nucleic acid hybridization probes, *Nucl. Acid Res.*, **14**: 9965-9976.
- AMBROS P. F., BARTRAM C. R., HAAS O. A., KARLIC H., GADNER H. (1987a) Non-isotopic in situ hybridization for mapping oncogenic sequences. [In:] Neth R., Gallo R. C., Greaveo M. F., Janka G., (eds) *Modern trends in human leukemia*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- AMBROS P. F., KARLIC H. I. (1987b) Chromosomal insertion of human papillomavirus 18 sequences in Hela cells detected by nonisotopic in situ hybridization and reflection contrast microscopy, *Human Genet.*, **77**: 251-254.
- ANGERER R. C., COX K. H., ANGERER L. M. N. (1985) In situ hybridization to cellular RNAs, *Genetic Engineering*, **7**: 43-65.
- ARNOLDUS E. P. J., PETERS A. C. B., BOTS G. T. A. M., RAAP A. K., VAN DER PLOEG M. (1989) Somatic pairing of chromosome 1 centromeres in interphase nuclei of human cerebellum, *Hum. Genet.*, (submitted).
- AYER-LE LIEVRE C., EBENDAL T., OLSON L., SEIGER A., PERSSON H. (1989) Detection of nerve growth factor and its mRNA by separate and combined immunohistochemistry and in situ hybridization in mouse salivary glands, *Histochem. J.*, **21**: 1-7.
- BAUMAN J. G. J., WIEGANT J., BORST P., VAN DUIJN P. (1980) A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome labeled RNA, *Exp. Cell Res.*, **128**: 485-490.
- BOERMAN R. H., ARNOLDUS E. P. J., RAAP A. K., PETERS A. C. B., TER SCHEGGET J., VAN DER PLOEG M. (1989) Diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy by hybridization techniques, *J. Clin. Pathol.*, **42**: 153-161.
- BORDEN J., MANUELIDIS L. (1982) Movement of the X chromosome in epilepsy *Science* **242**: 1687-1691.
- BRAKENHOFF G. J., VAN DER VOORT H. T. M., VAN SPRONSEN E. A., LINNEMANS W. A. M., NANNINGA N. (1985) Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy. *Nature* **317**: 748-749.
- BRESSER J., EVINGER-HODGES M. J. (1987) Comparison and optimization of in situ hybridization procedures yielding rapid, sensitive mRNA detections, *Gene Anal. Techn.*, **4**: 89-104.
- BRIGATI D. J., MYERSON D., LEARY J. J., SPALHOLZ B., TRAVIS S. Z., FONG C. K. Y., HSIUNG G. D., WARD D. C. (1983) Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization procedures, *Virology*, **126**: 32-50.
- BUONGIORNO-NARDELLI N., AMALDI T. (1970) Autoradiographic detection of molecular hybrids between RNA and DNA in tissue sections, *Nature*, **225**: 946-948.
- BURK R., SZABO P., O'BRIEN S., NASH W., YU L., SMITH K. (1985) Organization and chromosomal specificity of autosomal homologs of human Y chromosome repeated DNA, *Chromosoma (Berlin)*, **92**: 225-233.

- BURNS J., CHAN V. T. W., JONASSON J. A., FLEMING K. A., TAYLOR S., MCGEE J. O'D. (1985) Sensitive system for visualizing biotinylated DNA probes hybridized in situ: rapid sex determination of intact cells, *J. Clin. Pathol.*, **38**: 1085-1092.
- CHERIF D., BERNARD O., BERGER R. (1989) Detection of single-copy genes by nonisotopic in situ hybridization on human chromosomes, *Hum. Genet.*, **81**: 358-362.
- COGHLAN J. P., ALDRED P., HARALAMBRIDIS J., NIALL H. D., PENSCHOW J. D., TREGEAR G. W. (1985) Hybridization histochemistry, *Ann. Biochem.*, **149**: 1-28.
- COOK H. J., HINDLEY J. (1979) Cloning of human satellite III DNA: different components are on different chromosomes, *Nucl. Acids Res.*, **6**: 3177-3197.
- CREMER T., LANDEGENT J., BRUECKNER A., SCHOLL H. P., SCHARDIN M., HAGER H. D., DEVILEE P., PEARSON P., VAN DER PLOEG M. (1986) Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84, *Hum. Genet.*, **74**: 346-352.
- CREMER T., LICHTER P., BORDEN J., WARD D. C., MANUELIDIS L. (1988) Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes, *Hum. Genet.*, **80**: 235-246.
- DEVILEE P., CREMER T., SLAGBOOM P., BAKKER E., SCHOLL H. P., HAGER H. D., STEVENSON A. F. G., CORNELISSE C. J., PEARSON P. L. (1986) Two subsets of human alphoid repetitive DNA show distinct preferential localization in the pericentromeric heterochromatin of chromosome 13, 21, 18, *Cytogenet. Cell Genet.*, **41**: 193-201.
- DEVILEE P., THERRY R. F., KIEVITS T., KOLLURI R., HOPMAN A. H. N., WILLARD H. F., PEARSON P. L., CORNELISSE C. J. (1988) Detection of chromosome aneuploidy in interphase nuclei from human primary breast tumors using chromosome-specific repetitive DNA probes, *Cancer Res.*, **48**: 5825-5830.
- DIRKS R. W., RAAP A. K., VAN MINNEN J., VREUGDENHIL E., SMIT A. B., VAN DER PLOEG M. (1989a) Detection of mRNA molecules coding for neuropeptide hormones of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by radioactive and non-radioactive in situ hybridization: a model study for mRNA detection, *J. Histochem. Cytochem.*, **37**: 7-14.
- DIRKS et al. (1989b) in preparation.
- DURNAM D. M., GELINAS R. E., MYERSON D. (1985) Detection of species chromosomes in somatic cell hybrids, *Som. Cell Mol. Gen.*, **11**: 571-577.
- FORSTER A. C., MCINNES J. L., SKINGLE D. C., SYMONS R. H. (1985) Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin, *Nucl. Acids Res.*, **13**: 745-761.
- GARSON J. A., VAN DEN BERGHE J. A., KEMSHEAD J. T. (1987) Novel non-isotopic in situ hybridization technique detects small (1 kb) unique sequences in routinely G-banded human chromosomes: fine mapping of N-myc and beta-NGF genes, *Nucl. Acids Res.*, **15**: 4761-4770.
- HARPER M.E., ULLRICH A., SAUNDERS G. F. (1981) Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11, *Chromosoma (Berlin)*, **83**: 431-439.
- HARPER M. E., MARSELLE L. M., GALLO R. C., WONG-STAHN F. (1986) Detection of lymphocytes expressing human T-lymphocytic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **83**: 772-776.
- HOPMAN A. H. N., RAAP A. K., LANDEGENT J. E., WIEGANT J., BOERMAN R. H., VAN DER PLOEG M. (1988a) Non-radioactive in situ hybridization. [In:] Van Leeuwen F. W., Buijs R. M., Pool C. W., Pach O., (eds). *Molecular Neuroanatomy*, Elsevier, Amsterdam, 43-68.
- HOPMAN A. H. N., RAMAEKERS F. C. S., RAAP A. K., BECK J. L. M., DEVILEE P., VAN DER PLOEG M., VOOIJS G. P. (1988b) In situ hybridization as a tool to study numerical

- chromosome aberrations in solid bladder tumors, *Histochemistry*, **89**: 307-316.
- HOPMAN A. H. N., SMEETS W. G. B., MOESKER O., BECK J. L. M., VOOIJS G. P., RAMAEKERS F. C. S. (1989) Detection of chromosome 1 and 18 aberrations in bladder cancer by in situ hybridization. A comparison with flow cytometric data, (submitted).
- HOPMAN A. H. N., WIEGANT J., RAAP A. K., LANDEGENT J. E., VAN DER PLOEG M., VAN DUIJN P. (1986a) Bi-color detection of two target DNAs by non-radioactive in situ hybridization, *Histochemistry*, **85**: 1-4.
- HOPMAN A. H. N., WIEGANT J., TESSER G. I., VAN DUIJN P. (1986b) A non-radioactive in situ hybridization method based on mercuroated nucleic acid probes and sulfhydryl-hapten ligands, *Nucl. Acids Res.*, **14**: 6471-6488.
- HUBERT J., BOURGEOIS C. A. (1986) The nuclear skeleton and the spatial arrangement of chromosomes in the interphase nucleus of vertebrate somatic cells, *Hum. Genet.*, **74**: 1-15.
- HUTCHISON N. J., LANGER P. R., WARD D. C., HAMKALO B. A. (1982) In situ hybridization at the electron microscope level: Hybrid detection by auto-radiography and colloidal gold, *J. Cell Biol.*, **95**: 609-618.
- IZUMI S.-I., MORIUCHI T., KOJI T., TANNO M., TERASHIMA K., IGUCHI K., MOCHIZUKI T., YANAIHARA C., YANAIHARA N., ABA K., NAKANE P. K. (1988) Localization of c-Myc in HL-60 cells, neoplastic and normal tissues: an immunohistochemical and in situ hybridization study, *Acta Histochem. Cytochem.*, **21**: 327-342.
- JIRIKOWSKI G. F., RAMALHO-ORTIGAO J. F., LINDL T., SELIGER H. (1989) Immunocytochemistry of 5-bromo-2'-deoxyuridine labelled oligonucleotide probes, *Histochemistry*, **91**: 51-53.
- JIWA N. M., VAN GEMERT G., RAAP A. K., VAN DE RIJKE F., MULDER A., LENS P. F., SALIMANS M. M. M., ZWAAN F. E., VAN DORP W., VAN DER PLOEG M. (1989a) Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leucocytes of viraemic transplant recipients by the polymerase chain reaction, *Transplantation*, (in press).
- JIWA N. M., RAAP A. K., THE T. H., VAN DER PLOEG M., PLOEM J. S. (1988) Rapid image cytometry for the automated detection of low frequency white blood cells of transplantation patients expressing human cytomegalovirus immediate early antigen, *Cytometry Suppl.*, **2**: 31.
- JIWA N. M., RAAP A. K., VAN DE RIJKE F. M., MULDER A., WEENING J. J., ZWAAN F. E., THE T. H., VAN DER PLOEG M. (1989b) Detection of human cytomegalovirus antigens and DNA in formaldehyde fixed material of bone marrow transplant patients, *J. Clin. Pathol.*, (in press).
- JOHN H., BIRNSTIEL M. L., JONES K. (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level, *Nature*, **223**: 582-587.
- LANDEGENT J. E., JANSEN IN DE VAL N., BAAN R. A., HOEIJMAKERS J. H. J., VAN DER PLOEG M. (1984) 2-Acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences, *Exp. Cell Res.*, **153**: 61-72.
- LANDEGENT J. E., JANSEN IN DE WAL N., VAN OMMEN G. J. B., BAAS F., DE VIJLDER J. J. M., VAN DUIJN P., VAN DER PLOEG M. (1985) Chromosomal localization of a unique gene by non-autoradiographic in situ hybridization, *Nature*, **317**: 175-177.
- LANDEGENT J. E., JANSEN IN DE WAL N., FISSER-GROEN Y. M., BAKKER E., VAN DER PLOEG M., PEARSON P. L. (1986) Fine mapping of the Huntingdon disease linked D4S10 locus by non-radioactive in situ hybridization, *Hum. Genet.*, **73**: 354-357.
- LANGER P. R., WALDROP A. A., WARD D. C. (1981) Enzymatic synthesis of biotin labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **78**: 6633-6637.
- LANGER-SAFER P. R., LEVINE M., WARD D. C. (1982) Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **79**: 4381-4385.
- LAWRENCE J. B., SINGER R. H. (1985) Quantitative analysis of in situ hybridization methods for the detection of actin gene expression, *Nucl. Acids Res.*, **13**: 1777-1799.

- LAWRENCE J. B., VILNAVE C. A., SINGER R. H. (1988) Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line, *Cell*, **52**: 51–61.
- LICHTER P., CREMER T., BORDEN J., MANUELIDIS L., WARD D. C. (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries, *Hum. Genet.*, **80**: 224–234.
- LONING T., MILDE K., FOSS H. D. (1986) In situ hybridization for the detection of cytomegalovirus (CMV) infection. Application of biotinylated CMV-DNA probes on paraffin embedded specimen, *Cell*, **45**: 407–415.
- MANUELIDIS L. (1985) Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization, *Hum. Genet.*, **71**: 288–293.
- MANUELIDIS L., LANGER-SAFER P. R., WARD D. C. (1982) High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes, *J. Cell Biol.*, **95**: 619–625.
- MANUELIDIS L., WARD D. C. (1984) Chromosomal and nuclear distribution of the Hind III 1.9-kb human DNA repeat segment, *Chromosoma (Berlin)*, **91**: 28–38.
- MCCABE J. T., MORRELL J. I., RICHTER D., PFAFF D. W. (1986) Localization of neuroendocrinologically relevant RNA in brain by in situ hybridization, *Frontiers in Neuroendocrinology*, **9**: 149–167.
- MCDUGALL J. K., MYERSON D., BECKMAN A. M., (1986) Detection of viral DNA and RNA by in situ hybridization, *J. Histochem. Cytochem.*, **34**: 33–38.
- MORIMOTO H., MONDEN T., SHIMANO T., HIGASHIYAMA M., TOMITA N., MUROTA-NI M., MATSURA N., OKUDA H., MORI T. (1987) Use of sulfonated probes for in situ detection of amylase mRNA in formalin-fixed paraffin sections of human pancreas and submaxillary gland, *Lab. Invest.*, **57**: 737–741.
- MOYZIS R. K., ALBRIGHT K. L., BARTHOLDI M. F., CRAM L. S., DEAVEN L. L., HILDEBRAND C. E., JOSTE N. E., LONGMIRE J. L., MEYNE J., SCHWARZACHER-ROBINSON T. (1987) Human chromosome-specific repetitive DNA sequences: novel marker for genetic analysis, *Chromosoma (Berlin)*, **95**: 375–386.
- MYERSON D., HACKMAN R. C., NELSON J. A., WARD D. C., MCDUGALL J. K. (1984) Widespread occurrence of histologically occult cytomegalovirus, *Hum. Pathol.*, **15**: 430–439.
- NAKAMURA S., TOURTELOTTE W. W., SHAPSHAK P., DARVISH M. (1985) Patient with progressive multifocal leukoencephalopathy by in situ hybridization using isotopic and biotinylated probes, *No To Shinkei*, **37**: 359–364.
- NEDERLOF P. M., VAN DER FLIER S., RAAP A. K., TANKE H. J., VAN DER PLOEG M., KORNIPS F., GERAEDTS J. P. M. (1989b) Detection of chromosome aberrations in interphase tumor nuclei by non-radioactive in situ hybridization, *Cancer Genet. Cytogenet.*, (submitted).
- NEDERLOF P. M., ROBINSON D., ABUKNESHA R., WIEGANT J., HOPMAN A. H. N., TANKE H. J., RAAP A. K. (1989a) Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences, *Cytometry*, **10**: 20–27.
- PARDUE M. L., GALL J. G. (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **64**: 600–604.
- PINKEL D., GRAY J. W., TRASK B., VAN DEN ENGH G., FUSCOE J., VAN DEKKEN H. (1986a) Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **51**: 151–157.
- PINKEL D., LANDEGENT J., COLLINS C., FUSCOE R., SEGRAVES J., LUCAS J., GRAY J. W. (1988) Fluorescence in situ hybridization with human chromosome specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **85**: 9138–9142.

- PINKEL D., STRAUME T., GRAY J. W. (1986b) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **83**: 2934-2938.
- RAAP A. K., HOPMAN A. H. N., VAN DER PLOEG M. (1989) Hapten labeling of nucleic acid probes for DNA in situ hybridization. [In:] Bullock G., Petrusz P., (eds) *Techniques in immunocytochemistry*, vol III, Acad. Press, (in press).
- RAAP A. K., GEELLEN J. L., VAN DER MEER J. W. M., VAN DE RIJKE F. M., VAN DE BOOGAART P., VAN DER PLOEG M. (1988) Non-radioactive in situ hybridization for the detection of cytomegalovirus infections, *Histochemistry*, **88**: 367-374.
- RAAP A. K., MARIJNEN J. G. J., VAN DER PLOEG M. (1986) Denaturation, renaturation, and loss of DNA during in situ hybridization procedures, *Cytometry*, **7**: 235-242.
- RABL C. (1885) [In:] *Über Zellteilung. Morphologisches Jahrbuch*, **10**: 214-330.
- REISFELD A., ROTHENBURG J. M., BAYER E. A., WILCHEK M. (1987) Non-radioactive hybridization probes prepared by the reaction of biotin hydrazide with DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**: 519-526.
- RENZ M., KURZ C. (1984) A colorimetric method for DNA hybridization, *Nucl. Acids Res.*, **12**: 3435-3444.
- RUDKIN G. T., STOLLAR B. D. (1977) High resolution detection of DNA:RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence, *Nature*, **265**: 472-473.
- SALIMANS M. M. M., HOLSAPPEL S., VAN DERIJKE F. M., JIWA N. M., RAAP A. K., WEILAND H. T. (1989) Rapid detection of human parvovirus B19 DNA by dot-hybridization and the polymerase chain reaction, *J. Virol. Methods*, **23**: 19-28.
- SCHARDIN M., CREMER T., HAGER H. D., LANG M. (1985) Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories, *Hum. Genet.*, **71**: 282-287.
- SCHRIER R. D., NELSON J. A., OLDSTONE M. B. A. (1985) Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection, *Science*, **230**: 1048-1051.
- SINGER J. B., WARD D. C. (1982) Actin expression visualized in chicken muscle tissue culture by using in situ hybridization with a biotinylated nucleotide analog, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **79**: 3331-3335.
- SIXBEY J. W., NEDRUD J. G., RAAB-TRAUB N., HANES R. A., PAGANO J. S. (1984) Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells, *N. Engl. J. Med.*, **310**: 1225-1230.
- SPIEGELMAN S. (1964) Hybrid nucleic acids, *Sci. Amer*, **210** (5): 48-56.
- STEFFENSEN D. M., (1977) Human gene localization. [In:] J. J. Yunis (ed.) *Molecular structure of human chromosomes*, Acad. Press NY SF London, 59-88.
- SVERDLOV E. D., MONASTYRSKAYA G. S., GUSKOVA L. I., LEVITAN T. L., SCHEICHENKO V. I., BUDOWSKY E. I. (1974) Modification of cytidine residues with a bisulfite-O-methylhydroxylamine mixture, *Biochim. Biophys. Acta*, **340**: 153-165.
- TCHEN P., FUCHS R. P. P., SAGE E., LING M. (1984) Chemically modified nucleic acid immunodetectable probes in hybridization experiments, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **81**: 3466-3470.
- TRASK B., VAN DEN ENGH G., LANDEGENT J., JANSEN IN DE WAL N., VAN DER PLOEG M. (1985) Detection of DNA sequences in nuclei in suspension by in situ hybridization and dual beam flow cytometry, *Science*, **230**: 1401-1403.
- TRASK B., VAN DEN ENGH G., PINKEL D., MULLIKIN J., WALDMAN F., VAN DEKKEN H., GRAY J. (1988) Fluorescence in situ hybridization to interphase cell nuclei in suspension allows flow cytometric analysis of chromosome content and microscopic analysis of nuclear organization, *Hum. Genet.*, **78**: 251-259.
- UNGER E. R., BUDGEON L. R., MYERSON D., BRIGATI D. J. (1986) Viral diagnosis by in situ hybridization, *Amer. J. Surg. Pathol.*, **10**: 1-8.

- VAN DEKKEN (1989a), in preparation.
- VAN DEKKEN H., HAGENBEEK A., BAUMAN J. G. J. (1989b) Detection of host cells by fluorescent in situ hybridization with a Y-chromosome specific probe following sex-mismatched bone marrow transplantation, (submitted).
- VAN DER PLOEG M., RAAP A. K. (1988) In situ hybridization: an overview. [In:] Goerttler K., Feichter G. E., Witte S., (eds) *New Frontiers in Cytology*, Springer Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 13–21.
- VAN PROOIJEN-KNEGT A. C., VAN HOEK J. F. M., BAUMAN J. G. J., VAN DUIJN P., WOOL I. G., VAN DER PLOEG M. (1982) In situ hybridization of DNA sequences in human metaphase chromosomes visualized by an indirect fluorescent immunocytochemical procedure, *Exp. Cell Res.*, **141**: 397–407.
- VISCIDI R. P., CONNELLY C. J., YOLKEN R. H. (1986) Novel chemical method for the preparation of nucleic acids for non-isotopic hybridization, *J. Clin. Microbiol.*, **23**: 311–317.
- WACHTLER F., HOPMAN A. H. N., WIEGANT J., SCHWARZACHER H. G. (1986) On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei: Studies with a new, non-radiographic in situ hybridization method, *Exp. Cell Res.*, **167**: 227–240.
- WILLARD H. (1985) Chromosome-specific organization of the human alpha satellite DNA, *Am. J. Hum. Genet.*, **37**: 524–532.

*Otrzymano: 5 maja 1989 r.*

*Przyjęto: 6 czerwca 1989 r.*

*Adres autora: Wassenaarseweg 72, 2300RA Leiden, The Netherlands.*





## BIAŁACZKA O MIESZANYM FENOTYPIE

## „MIXED” PHENOTYPE LEUKEMIA

Zofia Monika RUPNIEWSKA, Małgorzata KOWAL

Klinika Hematologii AM w Lublinie

*Streszczenie.* W ostatnich latach, dzięki wprowadzeniu nowych technik, takich jak badania fenotypów immunologicznych komórek, analiza wzorów prążkowych chromosomów i badania molekularne DNA pozwalające na ustalenie rearanzacji klonalnej genów immunoglobulinowych i genów receptora komórki T, możliwe stało się dość precyzyjne rozpoznawanie i klasyfikowanie ostrych białaczek. Techniki te ujawniły jednak, że w pewnej części skądinąd typowych ostrych białaczek występuje „przemieszanie” markerów charakteryzujących linię różnicowania mieloidalnego i limfoidalnego, względnie linii komórek B i T. Dla przypadków tych zarezerwowano nazwę białaczki o mieszanym fenotypie.

Szczególnym wariantem jest białaczka z translokacją  $t(4;11)(q21;q23)$ , w której występuje ekspresja markerów charakteryzujących zarówno wczesne rozwojowo limfocyty B, jak i monoblasty. Równoczesna ekspresja markerów dwu różnych linii różnicowania sugeruje, że białaczka z  $t(4;11)$  pochodzi z komórki macierzystej zdolnej do różnicowania się zarówno w limfocyty B, jak i monocyty-makrofagi. W wariacie tym wykryto translokację protoonkogeny *c-ets-1* z 11q23 do 4q21.

Obecnie przyjmuje się, że krytycznym następstwem translokacji chromosomowych jest fuzja dwu segmentów chromosomowych, z których jeden jest ważny w procesie różnicowania (specyficzny dla typu komórki), a drugi stymuluje proliferację (tkankowo niespecyficzny). Nie jest wykluczone, że *c-ets* należy do tych drugich genów kontrolujących wzrost komórek.

Badania transgenicznych myszy z aktywnym onkogenem *myc*, u których powszechnie występują białaczki-chłoniaki B komórkowe o różnym stopniu dojrzałości, wykazały, że wprowadzenie drugiego onkogeny — *raf* w białaczkowe komórki może powodować zmianę genetycznego programu różnicowania limfocytów B w makrofagi, które nadal zachowują onkogenność. A zatem jest prawdopodobne, że obserwowana u ludzi niestabilność linii białaczkowych blastów wiąże się z aktywacją dodatkowych onkogenów.

*Summary.* In recent years cellular immunophenotyping, cytogenetic chromosome studies with the use of banding and molecular DNA analysis of clonal rearrangements of immunoglobulin and T-cell antigen receptor genes have proved valuable tool for the diagnosis and classification of acute leukemias. These techniques revealed that the leukemic blasts in some cases of otherwise typical acute leukemia show features of both myeloid and lymphoid lineages or of both T and B lymphoid lineages. A subgroup of these cases has been named „mixed” phenotype leukemia.

Acute leukemia with the translocation t(4;11)(q21;q23), which exhibits truly promiscuity markers picture both early undifferentiated B-cells and monoblasts is peculiar variant of this leukemia. Simultaneous expression the B-cell-precursor markers and the monoblastic features has led to the suggestion that leukemia with the t(4;11) arises from a stem cell with the potential to differentiate in both the lymphoid and myeloid pathways. The proto-oncogene *c-ets-1* is translocated from 11q23 to 4q21 in this variant of leukemia.

For the present an encompassing model is accepted contending that the crucial result of the characteristic chromosome rearrangements in neoplasia might be the fusion of two chromosome segments with widely different functions: one being cell-type specific or important for the differentiation process, and the other containing proliferation-stimulating genetic material without tissue specificity. It is not excluded that *c-ets* belongs to the second genes.

The study of transgenic mice with the activated oncogene *myc* who develop a fatal leukemia-lymphoma of B cell, showed that the second oncogene – *raf* activation, can provoke genetic reprogramming of lymphocytes B to macrophages remained tumorigenic. These findings suggest that lineage instability in naturally occurring humans leukemias may reflect additional oncogenes activation.

#### PRÓBY KLASYFIKACJI OSTRYCH BIAŁACZEK

Postęp w rozpoznawaniu różnych chorób zwykle się wiąże z postępowaniem technologicznym, czego najlepszym przykładem są ostre białaczki. Początkowo ostre białaczki rozpoznawano retrospektywnie u pacjentów, którzy umierali w ciągu kilku miesięcy od zachorowania. Na przełomie stulecia wprowadzenie badań mikroskopowych i barwień metodą Romanowsky'ego, względnie Wrighta, lub May-Grünwald-Giemzy pozwoliły na odróżnienie ostrych białaczek limfatycznych od ostrych białaczek szpikowych, przy czym ostre białaczki rozpoznawano, gdy liczba komórek blastycznych w szpiku przekraczała 30%. Rozwój metod cytochemicznych, począwszy od lat czterdziestych umożliwił dalszy podział ostrych białaczek i stworzył podwaliny do klasyfikacji zaproponowanej w 1976 r. przez grupę hematologów francuskich, amerykańskich i brytyjskich, tzw. Klasyfikacji FAB [13]. Podstawę do klasyfikacji ostrych białaczek stanowi koncepcja, że komórki nowotworowe w jakiś sposób odzwierciedlają cechy genetyczne, antygenowe i biochemiczne prawidłowych komórek szpiku lub grasicy w którymś z etapów różnicowania i stanowią klonalną ekspansję takiej komórki „zablokowanej” („frozen”) w dalszym różnicowaniu [73]. W Tab. 1 i 2 przedstawiono klasyfikację ostrych białaczek limfoblastycznych i szpikowych wg kryteriów zaproponowanych przez FAB. Przypadki, których nie dało się zakwalifikować do żadnej z przedstawionych w obu tabelach grup, uważano za przypadki nie zróżnicowane. Jednakże dzięki wprowadzeniu technik ultrastrukturalno-cytochemicznych oraz zastosowaniu specyficznych przeciwciał monoklonalnych, można było w części przypadków białaczek nie zróżnicowanych rozpoznać ostrą białaczkę megakarioblastyczną (podtyp M-7), którą stosunkowo niedawno dodano do Klasyfikacji FAB [14, 102, 142].

Istnieją co najmniej dwa istotne zarzuty odnośnie Klasyfikacji FAB. Po pierwsze: klasyfikacja ta opiera się na subiektywnych kryteriach i zgodność rozpoznań ustalanych przez różnych hematologów nie jest wystarczająco wysoka. Po drugie: Klasyfikacja FAB nie ma znaczenia prognostycznego.

Jeśli idzie o pierwszy z zarzutów, to chociaż początkowa koncepcja podziału ostrej białaczki szpikowej na 7 typów (zob. Tab. 2) wydawała się początkowo prosta, to jednak linie podziału między poszczególnymi typami, jak np. między M-1 i M-2, M-2 i M-4, M-4 i M-5a lub b, M-5a i M-1, oraz M-6 a innymi wariantami z domieszką erytroblastów okazały się trudne do przeprowadzenia. Ponadto brakuje wyraźnej linii podziału między ostrymi białaczkami, a stanami przedbiałaczkowymi [13a]. Ustalono, że do rozpoznania ostrej białaczki wystarczy już 30% komórek blastycznych w szpiku. Z drugiej jednak strony do rozpoznania stanu przedbiałaczkowego (np. niedokrwistości opornej na leczenie w okresie złośliwej transformacji w przebiegu zespołu mielodysplastycznego) odsetek komórek blastycznych w szpiku również powinien wynosić 20–30%. Lansowanie przez grupę FAB wyłącznie różnic cytologicznych jako kryteriów diagnostycznych między stanami przedbiałaczkowymi w zespołach mielodysplastycznych, a ostrymi białaczkami, jest zbyt arbitralne, jeśli nie uwzględnia wieku pacjenta, stanu klinicznego i wskaźnika progresji choroby. Obserwacje kliniczne niejednokrotnie są ważniejsze w wyborze leczenia niż dociekania cytologiczne czy w szpiku stwierdza się 25%, czy 35% komórek blastycznych [86a].

Drugi zarzut wobec Klasyfikacji FAB to brak jej znaczenia prognostycznego, co jest związane z uwzględnieniem jedynie cech morfologicznych dominującego klonu komórek blastycznych. Klasyfikacja ta pomija dwie nie mniej ważne prognostycznie przesłanki, jak objawy dysplazji w innych liniach komórkowych, kryteria cytochemiczne przemawiające za tendencją do dojrzewania białaczkowych blastów.

Objawy dysplazji w innych liniach komórkowych, jak np. dyserytropoeza lub dysmegakariopoeza świadczą o udziale tych linii w procesie białaczkowym i wiążą się z gorszym wskaźnikiem remisji [24a, 109a, 207a]. Potwierdzenie tej tezy pochodzi także z badań Fiałkova i wsp. [58a], którzy oznaczali dwa warianty dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (G-6-PD) u heterozygotycznych kobiet z ostrą białaczką szpikową. U pacjentek, których wiek przekraczał 60 lat, ten sam wariant G-6-PD występował zarówno w białaczkowych blastach, jak i w erytrocytach i płytkach, co wskazywało, że wszystkie te komórki należą do jednego klonu stanowiącego potomstwo pojedynczej klonogennej, białaczkowej komórki macierzystej, obdarzonej zdolnością do wielokierunkowego różnicowania. Natomiast u młodszych pacjentek autorzy wykryli dwa warianty G-6-PD: inny w komórkach białaczkowych i inny w erytrocytach i płytkach, co sugerowało, że te ostatnie komórki pochodzą z prawidłowych komórek prekursorowych, a zatem proces białaczkowy dotyczy tylko jednej linii ukierunkowanych komórek. Odkrycia te potwierdzają istnienie dwu różnych postaci ostrej białaczki szpikowej:

jednej, która być może występuje głównie u osób młodszych z ekspresją procesu białaczkowego tylko w jednej linii i obecnością w szpiku prawidłowych komórek ukierunkowanych; w postaci tej łatwiej uzyskuje się remisję;

drugiej, z ekspresją białaczki w kilku liniach komórkowych i z mniejszą szansą na uzyskanie remisji i wystąpienie poliklonalności.

Inny ważny zarzut dotyczący ograniczonej wartości Klasyfikacji FAB jako cytologicznego przewodnika ułatwiającego prognozowanie pochodzi stąd, że nie uwzględnia ona kryteriów cytochemicznych przemawiających za tendencją do dojrzewania białaczkowych blastów. Autorzy z grupy Cambridge [207a] wykazali, że przypadki, w których dane cytochemiczne, takie jak sudanofilia, dodatni odczyn na esterazę maślanową, lub liczne pałeczki Auera widoczne w barwieniu metodą Romanowsky'ego względnie czernią sudanową, przemawiają za tendencją do dojrzewania białaczkowych blastów i wiążą się z wyższym wskaźnikiem remisji, niż przypadki bez tej tendencji.

W dalszych badaniach nad klasyfikacją ostrych białaczek szczególnie istotne okazały się badania fenotypu immunologicznego białaczkowych blastów przy pomocy całego zestawu przeciwciał monoklonalnych [30, 64]. W Tab. 3, 4 i 5 scharakteryzowano niektóre antygeny i przeciwciała monoklonalne stosowane w rozpoznawaniu ostrych białaczek limfoblastycznych wychodzących z linii B i T oraz ostrych białaczek szpikowych.

Janossy i Mason [cyt. wg 26] sądzą, że w rozpoznawaniu ostrych białaczek linii komórki B bardzo przydatna jest cytoplazmatyczna ekspresja antygeny CD 22, w rozpoznawaniu białaczek linii komórki T – cytoplazmatyczna ekspresja antygeny CD 3, a w rozpoznawaniu białaczek linii szpikowych – powierzchniowa ekspresja antygeny CD 33. Natomiast za swoistą dla białaczek megakarioblastycznych autorzy uważają ekspresję glikoproteiny płytkowej IIa.

Istnieją jednak ograniczenia w precyzyjnym odróżnianiu ostrych białaczek limfoblastycznych od białaczek szpikowych. Tak np. Vaughan i wsp. [218] badali w 31 przypadkach ostrych białaczek ekspresję antygeny CD 34 (ciężar cząsteczkowy 115 kilodaltonów, (w skrócie kd), wykrywalny przez monoklonalne przeciwciała: My 10, HPCA-1). Uważa się, że CD 34 charakteryzuje albo bardzo młode komórki ukierunkowane w linię mieloidalną, albo komórki macierzyste [6, 15, 34, 35, 114, 131, 132, 202, 213, 218, 224]. Vaughan i wsp. [218] ekspresję tego antygeny stwierdzili w ponad 70% przypadków ostrych białaczek i to zarówno szpikowych, jak i limfoblastycznych (te ostatnie zwykle pochodziły z wczesnych rozwojowo komórek linii B, ale kilka przypadków należało do innych podtypów białaczek limfoblastycznych). Około 30% białaczek limfoblastycznych CD 34-dodatnich wykazywało istnienie jednego lub więcej antygenów różnicowania mieloidalnego, zaś kilka przypadków ostrych białaczek szpikowych było CD 10-dodatnich (CALLA-dodatnich).

Ważną rolę w rozpoznawaniu ostrych białaczek limfoblastycznych odegrały badania klonalnej rearanżacji genów immunoglobulinowych (Ig) [124] i genów receptora komórki T (T-cell receptor, w skrócie TCR) [221].

Krytycznym zdarzeniem decydującym o ukierunkowaniu komórki macierzystej w linię limfocytów B jest rekombinacja somatyczna DNA linii płciowej (germ-line DNA), dzięki której powstają unikalne w swojej strukturze aktywne transkrypcyjnie loci Ig. Loci te znajdują się w trzech różnych chromosomach (zob. Tab. 6). Każdy locus w swojej linii płciowej składa się z przerywanych segmentów DNA kodujących część zmienną Ig (variable, w skrócie V), rejon zrębowy (joining, w skrócie J) i część stałą (constant, w skrócie C). Ponadto w locus łańcucha ciężkiego ( $Ig_H$ ) między segmentami V i J znajdują się jeszcze elementy kodujące odcinek super zmienny (diversity, w skrócie D) części V.

Niezwykle ważnym wydarzeniem w dojrzewaniu limfocytów B jest powstanie locus  $Ig_H$ . W tkance embrionalnej egzony kodujące poszczególne segmenty łańcucha immunoglobulin są oddzielone od siebie przez długie

sekwencje DNA. W procesie różnicowania limfocytów B następuje dwukrotne przegrupowanie egzonów z wycięciem niekodujących sekwencji DNA. Pierwsze elementy łańcucha ciężkiego powstają dzięki rekombinacji segmentu D z pojedynczym segmentem  $J_H$ , a następnie systemem  $V_H$ , dzięki czemu powstaje kompleks  $V_H$ -D- $J_H$ . Wówczas po scaleniu (splicing) odpowiedniego RNA może zachodzić synteza IgM, lub IgM i IgD. Mające nieco później miejsce przełączanie izotypów klas (class switching) pozwala na syntezę rejonów stałych łańcuchów ciężkich Ig kodowanych przez loci bardziej odległe, znajdujące się przy końcu 3'.

Po rekombinacji locus  $Ig_H$  zachodzi rearanżacja loci łańcuchów lekkich Ig, w której, jak się wydaje, uczestniczą te same mechanizmy delekcji i przełączeń. Najpierw ulega rearanżacji locus kappa. Jeśli w jej wyniku powstaje czynnościowy gen łańcucha kappa, proces rekombinacji zostaje zatrzymany. Jeśli jednak rekombinacja nie jest „produktywna”, zachodzi ponownie i jej następstwem jest powstanie locus lambda. Tak więc intensywne rekombinacje somatyczne loci Ig poprzedzają wytwarzanie Ig. Świeżo zsyntetyzowane cząsteczki Ig najpierw pojawiają się w cytoplazmie komórki, ale w miarę procesu dojrzewania występuje ich ekspresja na powierzchni.

Znacznie mniej wiemy o prawidłowym różnicowaniu i dojrzewaniu limfocytów T, lecz jak się wydaje, istnieją znamienne podobieństwa między układami komórek B i T [180]. W powstawaniu molekuł TCR uczestniczą cztery loci zlokalizowane w chromosomach 7 i 14 (Tab. 7). Łańcuchy alfa i beta tworzą zasadniczą strukturę TCR, natomiast rola łańcuchów gama i delta jest mniej znana (wszystkie cztery łańcuchy alfa/beta i gamma/delta są związane z powierzchniowym antygenem CD 3, chociaż komórki noszące łańcuchy gamma/delta tworzą stosunkowo niewielką subpopulację) [107]. Obecnie przyjmuje się, że w procesie dojrzewania komórki T i w powstawaniu loci TCR zasadniczą rolę odgrywają rekombinacje DNA linii płciowej, które zachodzą w podobny sposób, jak przy rearanżacji loci Ig, podczas dojrzewania komórki B.

Nie mniej ważną rolę w poznaniu markerów ostrych białaczek odegrały badania biochemiczne i immunologiczne wewnątrz jądrowego enzymu – terminalnej transferazy deoksynukleotydu (terminal deoxynucleotidyl transferase, w skrócie TdT) [19]. TdT jest niezwykle polimerazą katalizującą polimeryzację monofosforanu deoksynukleozydowego (deoxynucleoside monophosphate) przy końcu 3' pojedynczej nici DNA (primer). Prawdopodobnie TdT odgrywa rolę w powstawaniu immunologicznego polimorfizmu dzięki losowej insercji nukleotydów przy złączach rekombinacyjnych (recombinational junctions) podczas rearanżacji genów immunoglobulinowych i genów receptora komórki T we wczesnych okresach różnicowania komórki B i T. Gen TdT zlokalizowano w długich ramionach chromosomu 10 (10q23-q25) [104]. W prawidłowych tkankach aktywność TdT występuje w niewielkim odsetku prekursorowych komórek limfoidalnych w szpiku, w korowych tymocytach,

w mniej niż w 0,1% komórek krwi pępowinowej noworodków lub krwi obwodowej osób dorosłych [21].

W warunkach patologicznych aktywność TdT wykryto

w ostrych białaczkach limfoblastycznych wychodzących z bardzo wczesnych rozwojowo prekursorów komórki B (dawniejsza nazwa białaczki „null” komórkowe),

w powszechnych ostrych białaczkach limfoblastycznych wychodzących z komórek ukierunkowanych w linię B,

w ostrych białaczkach limfoblastycznych pre-B komórkowych,

w ostrych białaczkach limfoblastycznych wychodzących z mniej lub bardziej dojrzałych komórek T [53],

w chłoniakach limfoblastycznych o wysokim stopniu złośliwości wychodzących ze śródpiersia i grasicy [98],

w około 10% przypadków ostrych białaczek szpikowych [99, 109].

Analiza kariotypu białaczkowych blastów umożliwiła dalszy postęp w klasyfikacji białaczek. Technika ta stała się wiarygodna dzięki wprowadzeniu w pierwszej połowie lat siedemdziesiątych metod prążkowania w badaniu chromosomów [191]. W 1981 r. metodę tę udoskonalono dzięki zastosowaniu 24-godzinnej hodowli białaczkowych komórek z synchronizacją cyklu mitotycznego przy pomocy metotreksatu. Powyższa technika pozwoliła na wykrycie u 50–60% chorych z ostrymi białaczkami nieprzypadkowych klonalnych nieprawidłowości chromosomowych [212]. W niektórych publikacjach [228, 230] mówi się, że nieprawidłowości chromosomowe występują u 90% chorych z ostrymi białaczkami.

W ciągu ostatnich dziesięciu lat w wielu publikacjach omawiano związek między rokowaniem a nieprawidłowościami chromosomowymi. Niedawno Yunis i Brunning [229a] streścili dotychczasowe dane w pracy poglądowej.

Aberracje chromosomowe w ostrych białaczkach limfoblastycznych, które uszeregowano według stopniowo pogarszającej się prognozy, przedstawiają się następująco:

prognoza pomyślna – hiperdiploidalna liczba chromosomów (47–60 chromosomów),

prognoza pośrednia – liczba chromosomów bliska haploidalnej, lub diploidalna,

prognoza zła obejmuje następujące translokacje: t/1;19/, t/4;11/, t/9;22/, t/8;14/, t/11;14/, t/v;12/ oraz 6q-.

Aberracje chromosomowe w ostrych białaczkach szpikowych, uszeregowane zgodnie z pogarszającą się prognozą:

prognoza pomyślna – inv 16, lub del 16, t/8;21/, t/15;17/,

prognoza pośrednia – t/9;22/, t/v;11/, 9q-, trisomia 8,

prognoza zła – t/6;9/, 5q-, 7q-, lub t/1;7/, inv 3, lub t/3;3/, defekty złożone.

W Klasyfikacji FAB związek między rokowaniem a aberracjami chromosomowymi w zasadzie nie jest odnotowany. Jeden z rzadkich wyjątków stanowi ostra białaczka promielocytowa (typ M-3) z t/15;17/.

Rozwój w latach osiemdziesiątych biologii molekularnej pozwolił na dalsze doskonalenie klasyfikacji ostrych białaczek. Wykryto mianowicie istnienie w prawidłowych komórkach proto-onkogenów lub onkogenów komórkowych (**c-onc**). Koincydencja punktów złamań chromosomowych z położeniem **c-onc** dała podstawy dla hipotezy, że kluczową rolę w onkogenezie odgrywa zmieniona czynność **c-onc** wskutek translokacji.

Wykrycie **c-onc** stało się możliwe dzięki dwu różnym, chociaż zbieżnym kierunkom badawczym, a mianowicie:

dzięki wykryciu homologii komórkowych proto-onkogenów z onkogenami szybko transformujących retrowirusów (**v-onc**); **v-onc** są zresztą pochodzenia komórkowego i zostały włączone w genom retrowirusa podczas zakażenia zwierzęcia,

dzięki metodzie przenoszenia (transfekcji) genu nowotworowego w DNA komórek biorców, komórek, które ulegają złośliwej transformacji. Do badań transformujących genów komórkowych, jako biorcy, zwykle służą komórki NIH 3T3.

Linia NIH 3T3 została wyprowadzona z prawidłowych fibroblastów myszy i posiada wysoką zdolność integracji DNA dawcy. DNA wyizolowany zarówno z komórek transformowanych mutagenami, jak i DNA wielu naturalnie występujących nowotworów człowieka, a m. in. nowotworów układu hemopoetycznego – wprowadzony do komórek NIH 3T3 może indukować transformację nowotworową, za którą są odpowiedzialne sekwencje DNA zawierające **c-onc**.

Wzrost komórek jest regulowany przez **c-onc**. Na konferencji roboczej dotyczącej ekspresji onkogenów w nowotworach człowieka, zorganizowanej przez British Association of Cancer Research we wrześniu 1987 r. w Cambridge [106] na podstawie lokalizacji w obrębie komórki i właściwości biochemicznych produktów **c-onc** podzielono je na pięć grup.

Pierwszą grupę stanowią produkty o właściwościach czynników wzrostowych. Tak np. **c-sis** koduje łańcuch B czynnika wzrostowego z płytek krwi (platelet-derived growth factor, w skrócie PDGF).

Do drugiej grupy należą produkty o właściwościach receptorów dla czynników wzrostowych. Reprezentatywne są tutaj produkty **c-fms** i **c-erb-B-2**. **c-fms** koduje receptor dla czynnika wzrostowego pobudzającego wytwarzanie kolonii makrofagów (macrophage-colony stimulating factor, w skrócie M-CSF), a **c-erb-B-2** koduje receptor dla czynnika wzrostowego naskórka (epidermal growth factor, w skrócie EGF). Dokładnie rzecz biorąc, oba **c-onc** kodują część receptora zlokalizowaną we wnętrzu komórki, tuż pod jej błoną, którą to część charakteryzuje aktywność kinazy tyrozynowej.

Trzecią grupę stanowią produkty **c-onc** zlokalizowane w cytoplazmie komórki o aktywności kinazy tyrozynowej. Stosunkowo dobrze poznany jest produkt hybrydowego genu **bcr-abl**. Gen ten powstaje wskutek wymiennej translokacji materiału genetycznego między chromosomami 9 i 22, jaka ma miejsce w przewlekłej białaczce szpikowej i w ostrych białaczkach Ph'-dodatnich. Produkt hybrydowego genu **bcr-abl** charakteryzuje znacznie silniejsza

aktywność kinazy tyrozynowej, niż produkt prawidłowego genu *c-abl*.

Czwartą grupę stanowią produkty działające przez wewnątrzkomórkowy układ informacyjny (intracellular messenger system), który przypuszczalnie stanowi ogniwo łączące receptory powierzchni komórki (rozpoznające różne sygnały pozakomórkowe, jak np. sygnały wysyłane przez czynniki wzrostowe lub hormony) z wewnątrzkomórkowymi enzymami efektorowymi. Należy tu białko p 21 związane z aktywnością GTP-azy, kodowane przez rodzinę genów *ras*.

Do piątej grupy zaliczono produkty związane z jądrem komórkowym uczestniczące w regulacji transkrypcji genów, jak np. produkty kodowane przez *c-fos*, rodzinę genów *c-myc* i *c-myb*.

Niektórzy autorzy [173] wyróżniają jeszcze dodatkową grupę szóstą. Do grupy tej zaliczają produkty *c-onc*, o których czynności i lokalizacji subkomórkowej wiemy jeszcze bardzo mało.

Małżeństwo cytogenetyki i biologii molekularnej stworzyło dalsze możliwości klasyfikacji białaczek, których owocem jest klasyfikacja zwana Klasyfikacją Morfologiczno-Immunologiczno-Cytogenetyczną (Klasyfikacja MIC), wyłoniona na konferencjach w Lowanium przez First and Second MIC Cooperative Study Group w kwietniu 1985 i we wrześniu 1986 r. [215, 215a]. W Tab. 8, 9 i 10 przedstawiono Klasyfikację MIC odpowiednio ostrych białaczek limfoblastycznych i szpikowych.

Spektrum komórek tworzących klon białaczkowy odzwierciedla etap różnicowania, w którym ma miejsce złośliwa transformacja. Jeśli transformacja zachodzi w wielopotencjalnych komórkach macierzystych, wówczas w procesie białaczkowym uczestniczy szerokie spektrum komórek mieloidalnych (takich, jak prekursorzy neutrofilii, monocytów-makrofagów, krwinek czerwonych i megakariocytów) oraz limfocytów [58]. Najczęściej jednak w ostrych białaczkach szpikowych transformacja zachodzi w bardziej dojrzałych komórkach ukierunkowanych w linię mieloidalną i klon białaczkowy tworzą wyłącznie komórki mieloidalne bez udziału limfocytów. Względnie częste są przypadki ostrych białaczek szpikowych wychodzących z bipotencjalnych komórek ukierunkowanych w linię granulocytów i monocytów-makrofagów (bez zaangażowania krwinek czerwonych i megakariocytów). Jeśli transformacja zachodzi w komórce ukierunkowanej w linię limfoidalną, w skład białaczkowego klonu wchodzi komórki jednej tylko linii B lub T, co ma miejsce w ostrych białaczkach limfoblastycznych.

Poza udziałem jednej lub kilku linii, jako funkcji etapu rozwoju hemopoetycznego, podczas którego miała miejsce złośliwa transformacja, stosunkowo często może na jednej komórce blastycznej występować równoczesna ekspresja markerów charakteryzujących dwie odmienne linie różnicowania, np. limfoidalną i mieloidalną, lub równoczesna ekspresja markerów limfocytów linii B i T [20, 83, 108, 172, 179, 198], co kwestionuje zasadność klasyfikacji



ostrych białaczek. Dla przypadków tych zarezerwowano nazwę „ostra białaczka bifenotypowa” lub białaczka o „mieszanym” fenotypie. Spektrum cech charakterystycznych wykazywanych przez niektóre ostre białaczki waha się od wręcz powszechnej ekspresji jednego lub dwu markerów „niezgodnych” z linią różnicowania, do skrajnie rzadkich przypadków białaczek bilinearnej lub biklonalnej, w których występują dwie odmienne populacje blastów – jedna o fenotypie limfoidalnym, a druga mieloidalnym.

#### PRÓBY UPORZĄDKOWANIA NOMENKLATURY OSTRYCH BIAŁACZEK O MIESZANYM FENOTYPIE

W związku z heterogennością ostrych białaczek o mieszanym fenotypie, istnieje w piśmiennictwie niepokojąca różnorodność pojęć. Dla określenia białaczek wykazujących cechy zarówno linii limfoidalnej, jak i mieloidalnej są stosowane następujące nazwy: białaczka hybrydowa, białaczka bifenotypowa, białaczka biklonalna, białaczki równoczesne (simultaneous), białaczka bilinear-na, białaczki synchroniczne (jednoczesne) (synchronous), białaczki metachroniczne (niejednoczesne) (metachronous), białaczka chimeryczna, białaczki mieszane (mixed), białaczka z „przełączaniem linii różnicowania” („lineage switch”).

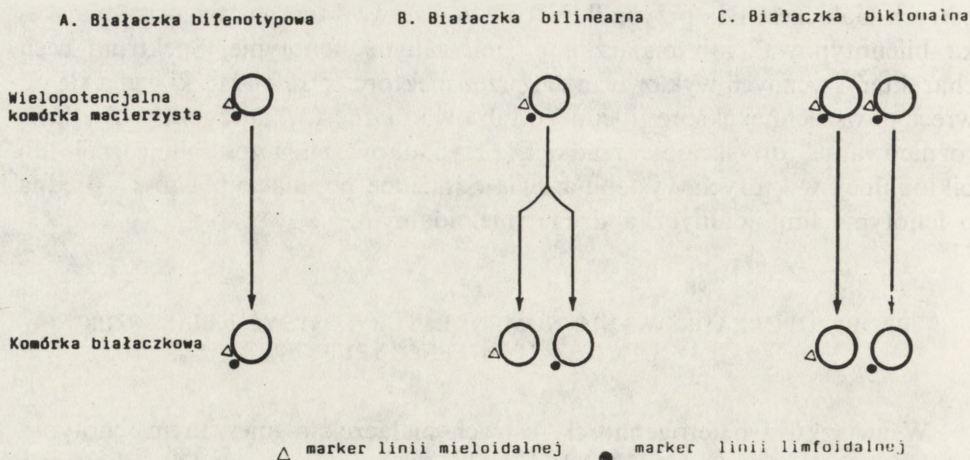
W pracy na temat stosunkowo wąskiej podgrupy prawdziwych białaczek hybrydowych Gale i Ben-Bassat [66] proponują ujednoczenie terminologii, zaś Hoffbrand i wsp. [100] sądzą, że terminologią tych autorów można objąć wszystkie ostre białaczki o mieszanym fenotypie. A zatem Gale i Ben-Bassat [66] pod pojęciem ostrej białaczki hybrydowej rozumieją stan, w którym złośliwa transformacja obejmuje zarówno linię limfoidalną, jak i mieloidalną. Należą tutaj:

ostra białaczka bifenotypowa – w której więcej niż 10% białaczkowych komórek wykazuje cechy zarówno komórki limfoidalnej, jak i mieloidalnej, są to więc komórki o mieszanym fenotypie;

ostra białaczka bilinear-na – w której występuje heterogenność populacji komórek białaczkowych tzn. jedne komórki należą do linii limfoidalnej, a inne do mieloidalnej.

Ten typ białaczki bywa także nieprawidłowo nazywany białaczką biklonalną. Zdaniem Gale i Ben-Bassata białaczka bilinear-na powinna być odróżniona od białaczki biklonalnej, ponieważ białaczka bilinear-na pochodzi z jednej komórki macierzystej zdolnej do różnicowania się w linię limfoidalną i mieloidalną.

Białaczka biklonalna nie jest białaczką hybrydową i przypuszczalnie pochodzi z dwu różnych komórek macierzystych, w których wystąpiły odrębne i niezależne procesy transformacji. Różnice te są przedstawione na ryc. 1 cytowanej z pracy Hoffbranda i wsp. [100].



Ryc. 1. Podział ostrych białaczek o mieszanym fenotypie [wg 100]. A. Białaczka bifenotypowa – więcej niż 10% komórek blastycznych wykazuje markery charakteryzujące więcej niż jedną linię różnicowania. B. Białaczka bilinearna – komórki blastyczne pochodzą od wspólnej komórki macierzystej, ale tworzą dwie odmienne populacje, z których każda wykazuje inny obraz markerów związanych z różnymi liniami różnicowania. Występowanie tych różnych populacji można obserwować albo od początku choroby (białaczka synchroniczna), albo w następstwie ewolucji choroby (białaczka metachroniczna, z przełączeniem linii różnicowania). C. Białaczka biklonalna – komórki blastyczne pochodzą z dwu różnych komórek macierzystych i tworzą dwa niezależne klony. Jest wyjątkowo rzadka.

Białaczka bifenotypowa jest zawsze synchroniczna, natomiast białaczka bilinearna może być zarówno synchroniczna, jak i metachroniczna. W metachronicznych białaczkach bilinearnych, zwłaszcza jeśli w następstwie ostrej białaczki limfoblastycznej rozwija się ostra białaczka szpikowa, konieczne jest precyzyjne ustalenie czasu jej wystąpienia do wykluczenia wpływu terapii, która może indukować rozwój drugiej, wtórnej białaczki (odmiennej genetycznie i fenotypowo od pierwszej). Białaczki wtórne nie powinny więc być utożsamiane z prawdziwą białaczką bilinearną. Gale i Ben-Bassat sądzą, że okres 6 miesięcy jest właściwym odstępem czasu, podczas którego może rozwinąć się metachroniczna białaczka bilinearna, później powstają białaczki wtórne.

Z pojęciem metachronicznych białaczek bilinearnych wiąże się pojęcie „przełączania linii różnicowania” („lineage switch”). Gale i Ben-Bassat jako przełączenie linii różnicowania rozumieją występowanie w przebiegu białaczki zmiany dominacji jednej linii różnicowania nad drugą, chociaż obie linie należą do tego samego klonu nowotworowego. Przewaga tej lub innej linii w białaczkowym klonie prawdopodobnie zależy od czynników dodatkowych, takich jak wpływy regulacyjne czy stochastyczne, które dostarczają danej linii różnicowania wybiórczych korzyści proliferacyjnych. Przełączanie linii różnicowa-

nia, jak to już podkreślono, jest często mieszane z rozwojem drugiej, wtórnej białaczki u tego samego pacjenta.

#### EKSPRESJA MARKERÓW „NIEZGODNYCH” Z LINIĄ RÓŻNICOWANIA W OSTRYCH BIAŁACZKACH

Ostre białaczki o mieszanym fenotypie stanowią heterogenną grupę, w której białaczkowe komórki charakteryzuje ekspresja markerów należących do dwu linii różnicowania, przy czym istnieją liczne warianty markerów „niezgodnych” z linią różnicowania. W Tab. 11 stanowiącej modyfikację tablicy z pracy Hoffbranda i wsp. [100] przedstawiono ekspresję markerów „niezgodnych” z linią różnicowania.

Stopień krzyżowej ekspresji markerów związanych z odmiennymi liniami różnicowania jest różny. I tak w około 10% przypadków ostrych białaczek szpikowych stwierdzono aktywność TdT [20, 108]. Wprawdzie rzadziej, ale jednak u części chorych z ostrymi białaczkami szpikowymi występują markery charakteryzujące bardzo wczesne etapy różnicowania limfocytów T, jak np. antygen CD 7, lub limfocytów B, jak np. antygen CD 10 (Tab. 3 i 4) [76, 219]. Niektórzy autorzy [8, 18, 32, 56, 63, 70, 78, 165, 184, 196] donosili o występowaniu w znamiennej części przypadków ostrych białaczek szpikowych klonalnej rearanżacji genów  $Ig_H$  i/lub genów TCR. Rearanżacja ta zwłaszcza często występowała w przypadkach ostrych białaczek szpikowych wykazujących aktywność TdT [63, 165].

W przypadkach ostrych białaczek limfoblastycznych obserwowano równoczesną ekspresję markerów charakteryzujących linię komórki T i B. Należą tu doniesienia o ostrych białaczkach limfoblastycznych wykazujących cechy zarówno powszechnych ostrych białaczek limfoblastycznych (białaczki CD 10-dodatnie), jak i ostrych białaczek T komórkowych [151]. Nuss i wsp. [167] u 27% chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną CD 10-ujemną obserwowali równoczesną ekspresję antygenów CD 19 i CD 7. Antygen CD 19 jest markerem bardzo wczesnych rozwojowo komórek ukierunkowanych w linię limfocytów B, zaś CD 7 – markerem komórek ukierunkowanych w linię limfocytów T (Tab. 3 i 4). Ta równoczesna ekspresja antygenów CD 19 i CD 7 na jednej komórce (nie wykazującej markerów linii mieloidalnej) może być wyjaśniona przez jedną z trzech hipotez:

albo białaczkowej konwersji ulegają bardzo wczesne prekursorzy linii limfoidalnej, nie ukierunkowane jeszcze ani w linię T, ani w linię B;

albo CD 7 nie jest specyficznym markerem komórek linii T;

albo występuje aberracja ekspresji CD 7 na komórkach ukierunkowanych w linię B.

Nieoczekiwanie częsta jest w ostrych białaczkach T komórkowych niezgodna z linią różnicowania rearanżacja genów  $Ig_H$  [77, 149, 181, 210], zaś

w białaczkach B komórkowych, również niezgodna z linią różnicowania, rearanżacja genów TCR [4, 8, 31, 70, 77, 78, 167, 172, 210]. Stass i Mirro [93] podają, że u około 20% dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną T komórkową występuje rearanżacja genów  $Ig_H$ , zaś u około 25% dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną pre-B komórkową — rearanżacja genów TCR. W badaniach Nuss i wsp. [167] równoczesna rearanżacja genów  $Ig_H$  i genów łańcuchów beta i gamma TCR występowała u dzieci powyżej 2 lat zarówno w ostrych białaczkach limfoblastycznych CD 10-ujemnych, jak i CD 10-dodatnich, natomiast u dzieci poniżej 2 lat — wyłącznie w przypadkach CD 10-dodatnich. Tak więc rearanżacja genów TCR wiąże się zarówno z etapem dojrzewania prekursorów komórek B, jak i wiekiem pacjenta (powyżej 2 lat). Obserwacje Nuss i wsp. nasuwają dotychczas nie wyjaśnione pytanie, czy komórki CD 10-ujemne są prekursorami komórek CD 10-dodatnich.

Dobrze udokumentowana jest w ostrych białaczkach limfoblastycznych ekspresja markerów charakteryzujących komórki szpikowe. Wykryto np. w ostrych białaczkach limfoblastycznych ekspresję genu mieloperoksydazy [57]. Badacze z Cancer and Leukemia Group B [199] wykazali występowanie antygenów linii mieloidalnej, takich jak CD 13 i/lub CD 33 w ponad 30% przypadków ostrych białaczek limfoblastycznych dorosłych. W większości tych przypadków komórki białaczkowe zaliczono do typu L-2 wg Klasyfikacji FAB (Tab. 1), a ponadto cechowała je aktywność esterazy octanowej alfa naftyłu [45]. Istnieją także doniesienia o występowaniu w dziecięcych ostrych białaczkach limfoblastycznych zarówno wariantów bifenotypowych, jak i bilinearnych [113, 138].

Z drugiej strony Greaves i wsp. [47] kwestionują wiele z wcześniejszych publikacji białaczek o mieszanym fenotypie, ponieważ nie badano markerów, które byłyby ściśle specyficzne dla danej linii różnicowania. Tak np. determinant antygenowy CD 15 (3-fukozył-N-acetylo-laktosamina lub hapten X), który jest markerem komórek linii szpikowej i komórek klonogennych ostrych białaczek szpikowych, jest identyczny z antygenem SSEA-1, który występuje na komórkach potworniaka (teratokarcinoma), a także w wielu tkankach i wydzielinach zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych [71]. Antygen CD 34, o którym sądzono, że charakteryzuje komórki ukierunkowane w linię granulocytów i monocytów-makrofagów, okazał się glikoproteiną komórki macierzystej [218]. Także inne antygeny, które uważano za specyficzne dla linii komórki T, takie jak CD 1 [62], CD 2 [148], CD 4 [226] i CD 5 [25] mogą występować na komórkach należących do innych linii różnicowania. Kwestionuje się także specyficzność TdT jako markera komórki ukierunkowanej w linię limfoidalną. Istnieją doniesienia mówiące, że sporadyczne komórki w prawidłowym szpiku wykazują zarówno aktywność TdT, jak i ekspresję antygeny linii mieloidalnej p 165 [22]. Również w prawidłowym szpiku występują komórki będące prekursorami tymocytów (TdT, HLA-DR i CD

7-dodatnie) [216]. Zanim zatem przyjmie się, że niektóre białaczki wykazują markery „niezgodne” z linią różnicowania, konieczne będzie ustalenie fenotypów wszystkich prawidłowych komórek prekursorowych.

Przedmiotem spekulacji [75] pozostaje także specyficzność rearanżacji genów podczas prawidłowej hemopoety. Podczas gdy zarówno komórki linii B, jak i linii T (i ich białaczkowe odpowiedniki) zawsze wykazują rearanżacje odpowiednich genów [172, 194], nie jest wykluczone, że przynajmniej w pewnych komórkach prekursorowych w szpiku jeszcze przed ukierunkowaniem ich w którąś z linii różnicowania występuje rearanżacja zarówno genów Ig, jak i genów TCR. Greaves i wsp. [74] sugerują, że proces białaczkowy „unieśmiertelnia” te właśnie komórki, które w warunkach prawidłowych są niezdolne do życia i jako takie eliminowane. Jest interesujące, że szczegółowe badania „niezgodnych” z linią różnicowania rearanżacji genowych, tak charakterystycznych dla różnych białaczek, ujawniły, że posiadają one szereg cech pozwalających na odróżnienie ich od prawidłowej, „produktywnej” rearanżacji genów i prawdopodobnie są „nieczynne”, co wskazuje, że nie należą do prawidłowego programu różnicowania linii limfoidalnej [75, 77, 78, 154].

#### HIPOTEZY DOTYCZĄCE PATOGENEZY OSTRYCH BIAŁACZEK O MIESZANYM FENOTYPIE

Udowodnienie istnienia wieloważnej komórki macierzystej umożliwiło podjęcie prób wyjaśnienia patogenyzy ostrych białaczek bifenotypowych albo przy pomocy hipotezy „niewierności” wobec linii różnicowania (lineage „infidelity”), albo poprzez hipotezę „przemieszczania” linii (lineage „promiscuity”).

Hipotezę „niewierności” wobec linii różnicowania wylansowali w 1981 r. McCulloch i wsp. Początkowo wykazano [140], że pojedyncza komórka blastyczna linii komórkowej wyprowadzonej z ostrej białaczki szpikowej posiada równocześnie markery linii krwinek czerwonych i linii neutrofilii. W dalszych badaniach [198] stwierdzono, że w niektórych przypadkach ostrych białaczek szpikowych może występować równoczesna ekspresja wewnątrz cytoplazmatycznych Ig (marker linii komórki B), jak i antygenu powierzchniowego CD 11 b (OKM-1) (marker komórek linii granulocytów, monocytów-makrofagów i komórek cytotoksycznych). Wyniki te McCulloch [145] interpretował jako „aberrację programowania” („aberrant programming”), lub „niewierność” wobec linii różnicowania (lineage „infidelity”) wywołaną procesem nowotworowym. Obecnie jednak znane są przykłady, które początkowo interpretowano jako „aberrację programowania”, a w których, jak się później okazało, białaczkowe blasty wykazywały po prostu niespecyficzne markery występujące na różnych liniach komórkowych. Wydaje

się więc, że hipoteza McCullocha i wsp. może odnosić się tylko do rzadkich przypadków ostrych białaczek, w których istotnie ma miejsce aberracja programowania.

Pochodząca z 1986 r. hipoteza Greavesa i wsp. [74] „przemieszania” linii opiera się na fakcie, że w prawidłowym szpiku istnieją ukierunkowane komórki oligopotencjalne. W toku prawidłowego różnicowania część tych komórek ginie, a część traci markery innej linii, jak np. komórki linii mieloidalnej tracą aktywność TdT. Jednakże niektóre komórki podczas różnicowania mogą zachowywać markery innej linii, jak np. częściowa rearanżacja genów TCR w komórce ukierunkowanej w linię B. Jak się przypuszcza, podczas prawidłowego różnicowania limfocytów niemal powszechnie zachodzą aberracje w rearanżacji genów, które prowadzą do powstania defektywnych komórek, wykazujących niezgodną z linią różnicowania rearanżację genów. Greaves i wsp. [74] sugerują, że proces białaczkowy unieśmiertelnia te komórki niezdolne do życia w warunkach prawidłowych.

Alternatywną hipotezę sugeruje niedawne odkrycie, że zarówno rearanżacja genu Ig, jak i genu TCR zachodzi dzięki podobnemu, chociaż nie identycznemu działaniu mechanizmów enzymatycznych rekombinacji [227]. Jak wiadomo, krytycznym zdarzeniem decydującym o ukierunkowaniu komórki macierzystej w linię limfocytów B lub T jest rekombinacja somatyczna DNA linii płciowej, dzięki której powstają, unikalne w swojej strukturze, odpowiednio loci Ig lub loci TCR. Ten proces rekombinacji obejmuje rozpoznanie sekwencji sygnałnych: heptamer-przerywnik (spacer)-nonamer, znajdujących się na każdym brzegu genu, jak również cięcie DNA i ponowne związanie jednostek końcowych w tym samym chromosomie. Jest on katalizowany przez enzymy zwane rekombinazami.

Fizjologiczna czynność rekombinaz w komórkach pre-B zapewnia powstanie kompleksu V-D-J  $Ig_H$  lub kompleksu V-J łańcuchów lekkich Ig i analogicznego loci TCR w komórkach pre-T. Hoffbrand i wsp. [100] sugerują, że podczas ekspansji klonu komórek pre-B współistniejący blok różnicowania pozwala na znaczne wydłużenie „okresu rozwojowego” („developmental window”), podczas którego działają rekombinazy. Przedłużona aktywność rekombinaz zwiększa możliwość rearanżacji genu TCR, która w warunkach prawidłowych jest zjawiskiem niezmiernie rzadkim w komórce pre-B. Natomiast w białaczkach wychodzących z bardziej dojrzałych prekursorów komórki B, które przekroczyły ten okres rozwoju, aktywność rekombinaz prawdopodobnie jest mniejsza, co by wyjaśniało rzadsze w tych białaczkach występowanie „niezgodnej” z linią różnicowania rearanżacji genu TCR.

BIAŁACZKA O MIESZANYM FENOTYPIE Z TRANSLOKACJĄ T/4;11//q21;q23/

W przedstawionym przez Ben-Bassata i Gale [11] przeglądzie zebranych z piśmiennictwa tzw. ostrych białaczek hybrydowych (bifenotypowych i biline-

arnych) autorzy zwrócili uwagę na stosunkowo częste występowanie translokacji t/4;11/.

Przeprowadzone przez Parkina i wsp. [171] badania morfologiczne, cytochemiczne i ultrastrukturalne komórek blastycznych z t/4;11/ wykazały ich bifenotypowość. Morfologia tych blastów odpowiadała komórkom limfoidalnym, zwykle typu L-1 lub L-2 wg Klasyfikacji FAB (Tab. 1), ale ich cechy ultrastrukturalne i cytochemiczne przemawiały za pochodzeniem z linii mieloidalnej.

Również badania Stonga i wsp. [203] linii RS 4;11 wyprowadzonej z komórek szpiku chorego z ostrą białaczką i t/4;11//q21;q23/ oraz izochromosomem 7q wykazały, że chociaż morfologia i fenotyp immunologiczny większości komórek blastycznych odpowiadały limfoblastom, to jednak ok. 30% komórek wykazywało cechy linii mieloidalnej. Za przynależnością do prekursorów linii limfoidalnej przemawiała aktywność TdT. Co więcej, komórki te należały do komórek ukierunkowanych w linię limfocytów B, na co wskazywała: rearanżacja genów  $Ig_H$  i łańcucha lekkiego kappa, a także ekspresja antygenów BA-1, BA-2, P 1153/3 i B 4. Występowała także ekspresja antygenów HLA-DR. Z drugiej strony za przynależnością do komórek ukierunkowanych w linię granulocytów i monocytów-makrofagów przemawiała reakcja z monoklonalnym przeciwciałem 1G10. Niektóre z komórek linii RS 4; 11 wykazywały słabą ekspresję antygeny gp 170,95/TA-1, który charakteryzuje prekursorowe komórki linii monocytów i monocyty krwi obwodowej. W badaniach ultrastrukturalnych w ok. 30% komórek RS 4; 11 wykryto ziarna przypominające ziarna niedojrzałych bazofili i komórek tucznych, a ponadto część tych komórek wykazywała aktywność peroksydazową. Indukując dojrzewanie komórek linii RS 4;11 przy pomocy estru forbolu (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13 acetate, w skrócie TPA) uzyskano różnicowanie do komórek przypominających makrofagi, za czym przemawiały badania cytochemiczne, czynnościowe, immunologiczne i ultrastrukturalne. Obserwacje te są zresztą zgodne z wcześniejszymi badaniami Nagasaka i wsp. [164], którzy w dwu przypadkach ostrej białaczki z t/4;11/ uzyskali przy pomocy TPA różnicowanie w kierunku monocytoidalnym.

Stass i Mirro [200] w pracy przeglądowej dotyczącej m.in. ostrej białaczki z t/4;11/ zwracają uwagę, że u dzieci białaczkowe blasty nieodmiennie charakteryzują się morfologią komórki limfoidalnej oraz wykazują rearanżację genów  $Ig_H$ , ale ich fenotyp immunologiczny odpowiada zarówno wczesnym rozwojowo limfocytom B, jak i monoblastom, a badania ultrastrukturalne ujawniają cechy linii mieloidalnej. Natomiast u dorosłych, chociaż większość przypadków białaczek z t/4;11/, podobnie jak u dzieci, wykazuje cechy białaczki limfoblastycznej, to jednak u niektórych chorych rozpoznawano ostrą białaczkę mielomonocytową i ostrą białaczkę niezróżnicowaną. W kilku przypadkach, które morfologicznie, cytochemicznie i immunofenotypowo od-

powiadały ostrej białaczce limfoblastycznej, w badaniach ultrastrukturalnych wykryto drugi klon komórek — odpowiadających monoblastom. Stass i Mirro przedstawili wyniki badań kariotypu u chorych z  $t(4;11)(q21;q23)$ . Autorzy podają, że u połowy badanych występowały jeszcze inne nieprawidłowości chromosomowe i sądzą, że przynajmniej kilka z nich było nieprzypadkowych.

Dość powszechne występowanie  $t(4;11)$  w białaczkach o mieszanym fenotypie sugeruje, że ten typ translokacji ma miejsce w wielopotencjalnej komórce macierzystej zdolnej do różnicowania się zarówno w linię limfoidalną, jak i mieloidalną [1, 164, 171, 203].

Częstość występowania  $t(4;11)$  jest różnie podawana w różnych publikacjach. Mirro i wsp. [150] stwierdzili ją u sześciu (2,5%) z 237 pacjentów z Tennessee z ostrą białaczką limfoblastyczną. Z drugiej strony badacze duńscy [17] w małej grupie 26 chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną — translokacją  $t(4;11)$  wykryli u pięciu (19%) badanych. Przyczyna tych różnic jest nie znana. W połączonym materiale przyjęto, że  $t(4;11)$  występuje w ok. 5–10% przypadków wszystkich ostrych białaczek limfoblastycznych [94].

Ostra białaczka z  $t(4;11)$  jest obserwowana w dwu grupach wiekowych. Albo u noworodków i bardzo małych dzieci, poniżej 18 miesięcy, albo u dorosłych [121]. Sugeruje się nawet, że białaczki z  $t(4;11)$  są białaczkami wrodzonymi [120]. Heim i wsp. [92] podają, że translokacja ta występuje w 78% przypadków wrodzonych ostrych białaczek limfoblastycznych. Zarówno białaczkę dziecięcą, jak i dorosłych charakteryzuje podobny obraz kliniczny, do którego należą: wysoka leukocytoza, często powyżej 150 000 w  $\mu\text{l}$  [137], hepato-splenomegalia i/lub powiększenie węzłów chłonnych oraz złe rokowanie [92, 94, 111, 150]. Przeżycie powyżej 20 miesięcy w przypadkach tej translokacji należy do wyjątków [120, 136, 211]. W Tab. 12 cytowanej z pracy Koefflera [121] przedstawiono główne cechy białaczki o mieszanym fenotypie z  $t(4;11)$ .

Przyjrzyjmy się z kolei zmianom molekularnym, jakie zachodzą w  $t(4;11)(q21;q23)$ . W chromosomie 11 znajdują się dwa miejsca dziedzicznie łamliwe w prążkach  $q13$  i  $q23$ . Dotychczas u człowieka zidentyfikowano 17 miejsc dziedzicznie łamliwych, z których 16 występuje w chromosomach autosomalnych, a jedno w chromosomie X. Sutherland [205, 205a] miejsca dziedzicznie łamliwe definiuje jako różnej szerokości przerwy w wybarwieniu fragmentów ramion chromosomów metafazalnych, obejmujące zwykle obie chromatydy. Miejsca te są dziedziczone w sposób dominujący zgodnie z prawami Mendla. Łamliwość jest wyrażona pod postacią acentrycznych fragmentów, delecji chromosomowych, lub trójpromiennych figur (triradiated figures).

Nomenklatura cytogenetyczna znakuje miejsca łamliwe skrótem „fra” (z angielskiego fragile sites). Skrót ten występuje w zapisie przed numerem chromosomu z oznakowaniem jego ramion (ramiona krótkie lub długie) oraz podaniem numeru prążka, w którym znajduje się miejsce łamliwe. Tak więc dwa miejsca dziedzicznie łamliwe w chromosomie 11 znakuje się jako fra 11/q13, lub q23/.



Poza miejscami dziedzicznie łamliwymi w chromosomie 11 znajduje się jeszcze homozygotyczne miejsce powszechnie lub konstytutywnie łamliwe (common or constitutive fragile site), przy czym pokrywa się ono z miejscem dziedzicznie łamliwym [231]. Yunis i Soreng [231] sugerują, że miejsca dziedzicznie łamliwe powstają wskutek mutacji miejsc powszechnie łamliwych. Miejsca powszechnie łamliwe prawdopodobnie wiążą się z przemieszczalnymi (transposable) elementami regulacyjnymi, które należą do zjawisk ewolucyjnie bardzo dawnych i warunkują niestabilność genomu, konieczną np. do powstania zarówno genów Ig, jak i genów TCR. Ekspresja miejsc łamliwych jest indukowana przez wciąż wzrastającą listę mutagenów i karcinogenów, począwszy od promieniowania jonizującego do produktów spalania papierosów włącznie [206]. Przyjmuje się istnienie związku między miejscami łamliwymi a nieprzypadkowymi punktami złamań, jakie obserwuje się w rearanżacjach chromosomowych w komórkach nowotworowych. Za związkiem tym przemawiają dane uzyskane z dwu kierunków badawczych. Jedne pochodzą z badań cytogenetycznych, w których porównywano koincydencję miejsc łamliwych z punktami złamań chromosomów w komórkach nowotworowych. Drugie – z badań molekularnych, które pozwoliły na zmapowanie genów leżących w miejscach łamliwych. Ze znanych ok. 110 miejsc łamliwych, 50 jest zgodnych z położeniem 50 z 75 punktów złamań chromosomów specyficznych dla nowotworów (67%). W 21 miejscach łamliwych leży 26 z 36 onkogenów (72%) [232]. Jak się wydaje, różnorodne rearanżacje chromosomowe występujące w nowotworach są spowodowane masowym rozrywaniem „słabych” punktów, jakimi są miejsca łamliwe [46, 87, 88, 91, 231] i w których leżą onkogeny. Ostatnio jednak Sutherland i Simmers [207] sugerują, że hipoteza ta jest bezzasadna. Wprawdzie wiadomo, że zarówno punkty złamań chromosomów w nowotworach, jak i miejsca łamliwe nie przypadkowo leżą w prążkach nie barwiących się metodą Giemzy (Giemza-ujemnych), nie stwierdzono jednak znamiennej statystycznie korelacji między tymi parametrami (między miejscami powszechnie łamliwymi i złamaniami chromosomów w nowotworach, a prążkami Giemza-ujemnymi).

W miejscu łamliwym w długich ramionach chromosomu 11 znajduje się proto-onkogen *c-ets-1* [50, 223]. Z kilku powodów *c-ets* należy do wyjątków. Po pierwsze: jego odpowiednik wirusowy *v-ets* wchodzi w skład genomu niezwyklego retrowirusa E 26 ostrej mieloblastozy i erytroblastozy ptaków (avian acute myeloblastosis and erythroblastosis virus, w skrócie E 26). Transformujący gen E 26 składa się z trzech członów: delecyjnego wirusowego genu *gag*, który koduje białka wnętrza wirionu i dwu onkogenów *v-myb* i *v-ets* [135, 166] -*v-Δgag-myb-ets*. *v-ets* powstaje wskutek transdukcji prawidłowego komórkowego genu *ets* drobiu przez retrowirus E 26. W wyniku transdukcji dochodzi do okrojenia i uszkodzenia komórkowego genu, co nadaje mu onkogenność. Trójczłonowy, transformujący gen E 26 koduje onkogenne białko o ciężarze cząsteczkowym 135 kd – p 135 [166]. Jeśli idzie o patogenność, to E 26 charakteryzują co najmniej dwie dodatkowe cechy, których nie posiada retrowirus mieloblastozy ptaków (avian myeloblastosis virus, w skrócie AMV) dysponujący tylko onkogenem *myb*. Pierwsza z tych cech to fakt, że E 26 u ptaków wywołuje zarówno mieloblastozę, jak i erytroblastozę, a in vitro transformuje mieloblasty i erytroblasty, podczas gdy AMV wywołuje jedynie białaczkę mieloblastyczną i wybiórczo transformuje mieloblasty [157, 158, 182]. Co więcej, E 26 posiada zdolność transformowania zarówno nie ukierunkowanych komórek macierzystych wspólnych dla linii erytroblastów i mieloblastów, jak i komórek już ukierunkowanych bądź w linię erytroblastów, bądź

mieloblastów [158, 182]. Druga cecha, odróżniająca gen E 26 od AMV to to, że mieloblasty stransformowane przez E 26 mają całkowicie zablokowane dojrzewanie i nie udaje się wywołać ich dalszego różnicowania żadnym ze znanych induktorów [cyt. wg 185]. Przeciwnie natomiast, komórki stransformowane przez AMV mogą różnicować się do makrofagów pod wpływem TPA [208].

Drugim powodem zaliczenia *c-ets* do wyjątków jest fakt, że u człowieka, a także u myszy i kotów, dwa różne loci nazwane *c-ets-1* i *c-ets-2* odpowiadają pojedynczemu genowi *c-ets* drobiu i wirusowemu *v-ets*. Niedawno u drobiu zidentyfikowano ekwiwalent ludzkiego *c-ets-2* [19a]. *c-ets-1* człowieka odpowiada 5'-*v-ets*, zaś *c-ets-2* – 3'-*v-ets* [223]. U ludzi *c-ets-1* zlokalizowano w 11q 23.3, zaś *c-ets-2* w 21q22.3 [50, cyt. wg 90, 223]. Ostatnio jednak Watson i wsp. [223a] podają, że *c-ets-2*, a także trzeci gen należący do rodziny *ets* – *c-erg* leżą w 21q23.3.

Po trzecie: rodzina genów *ets* należy do genów ewolucyjnie starych. Watson i wsp. [223a] proponują podział genów *ets* na trzy klasy. Do klasy I należą geny *c-ets-1* człowieka i drobiu. Posiadają one trzy domeny, nazwane przez autorów A, B i C, i jak się wydaje (na podstawie struktury tych genów i identyfikacji ramek odczytu), kodowane przez nich białka są identyczne w ponad 95% aminokwasów. Z szesnastu odmiennych aminokwasów, tylko cztery nie zostały przechowane podczas ewolucji. Do klasy II należą geny posiadające tylko domeny A i C. Należą tu *ets-2* człowieka, *ets-2* myszy, *ets-2* tak odległego ewolucyjnie gatunku jak *Xenopus* i gen *erg* człowieka. Przypuszczalne produkty genów *c-ets-2* człowieka i myszy są w ponad 91% identyczne. Trzecią klasę stanowią geny *ets*, które nie są jeszcze dokładnie sklasyfikowane, zawierające tylko domen C. Być może jest to unikalna klasa posiadająca tylko stary ewolucyjnie domen C, nie jest jednak wykluczone, że należy ona do którejś z poprzednich klas. Do klasy tej należą: *ets* muszki *Drosophila melanogaster* i *ets* jeża morskiego.

Produkt ludzkiego genu *c-ets-1* jest nie znany. *c-ets-2* koduje fosfoproteinę p 56 zlokalizowaną w jądrze komórkowym [65a], która prawdopodobnie odgrywa rolę regulacyjną, jak produkty *c-myc*, *c-myb*, *c-fos*, *c-jun*, wpływając na proces replikacji DNA, chociaż różni się od innych onkoprotein jądrowych zdolnością do post-transkrypcjonalnej odpowiedzi na TPA [cyt. wg 171a]. Sugeruje się, że *ets-2* i *erg* położone w 21 chromosomie odgrywają rolę w zespole Downa, a przynajmniej *ets-2* ulega potrojeniu w trisomii 21, która charakteryzuje zespół Downa [189a]. Nie stwierdzono homologii między *c-ets-1* i *c-ets-2* z wyjątkiem niewielkiej, pokrywającej się sekwencji, która koduje 14 aminokwasów; 12 z nich są zachowane w obu loci. Oba loci w komórkach człowieka ulegają transkrypcji: *c-ets-1* w mRNA wielkości 6,8 kilobaz (skrótów k), zaś *c-ets-2* – w trzy mRNA wielkości 4,7, 3,2 oraz 2,7 k [223].

Jak dotąd nie dysponujemy bezpośrednimi dowodami wskazującymi na udział sekwencji *c-ets* w ludzkich nowotworach, chociaż *c-ets-1* leży w miejscu

łamliwym w 11q23. Istnieją jednak pośrednie dane związane z translokacją lub nieprawidłowościami *c-ets* w niektórych białaczkach i chłoniakach. Po pierwsze, Diaz i wsp. [52] u trzech pacjentów z białaczką mielomonocytową i monoblastyczną (typy M-4 i M-5 wg Klasyfikacji FAB, zob. Tab. 2) i t/9; 11//p22; q23/ wykazali, że *c-ets-1* zostaje przeniesiony z chromosomu 11 w krótkie ramiona chromosomu 9 w bezpośrednie sąsiedztwo genów interferonu. Jednakże w DNA komórek blastycznych nie stwierdzono polimorfizmu długości fragmentu restrykcyjnego (restriction fragment length polymorphism) genu *c-ets-1*. Translokacje 11q23 do krótkich ramion chromosomu 9 stosunkowo często są opisywane w ostrej białaczce monoblastycznej (typ M-5, zob. Tab. 2) [51, 52, 84, 111, 112], zwłaszcza w podtypie nieodróżnionym tej białaczki (podtyp M-5a, Tab. 2) [188]. Ponadto donoszono o translokacji 11q23 do chromosomów 6, 10, 17 lub 19, co obserwowano w ostrej białaczce mielomonocytowej (typ M-4, Tab. 2) [111, 229]. LeBeau i Rowley [133] oceniają, że nieprawidłowości chromosomu 11 występują w ok. 10% przypadków ostrych białacek monoblastycznych i mielomonocytowych.

Po drugie, Rovigatti i wsp. [185] stwierdzili rearanżację i amplifikację sekwencji *c-ets-1* w DNA komórek blastycznych lub limfocytów: w jednym przypadku ostrej białaczki mielomonocytowej (typ M-4, Tab. 2) z jednorodnie barwiącym się odcinkiem (homogenously staining region) w 11q23, co odpowiadało ok. 30–40-krotnej amplifikacji *c-ets-1*; u chorego z chłoniakiem limfocytowym (chłoniak ten klinicznie i histopatologicznie odpowiada przewlekłej białaczce limfatycznej) w którym występowała inwersja 11q23. Ponadto autorzy ci w kilku przypadkach ostrych białacek szpikowych z nieprawidłowościami dotyczącymi 11q23 obserwowali niespecyficzne zmiany w locus *c-ets-1*.

Po trzecie, Sacchi i wsp. [190] w linii komórkowej wyprowadzonej od chorego z ostrą białaczką o mieszanym fenotypie i t/4;11//q21;q23/ wykazali, że *c-ets-1* zostaje przeniesiony z chromosomu 11 do chromosomu 4. Podobnie stwierdzono translokację *c-ets-2* z chromosomu 21 do chromosomu 8 w przypadku ostrej białaczki mieloblastycznej (typ M-2, Tab. 2) z t/8;21//q22;q22/. Jednakże nie udało się wykryć metodą Southerna (Southern blot analysis) rearanżacji sekwencji *c-ets* w DNA komórek blastycznych zarówno z t/4;11/, jak i z t/8;12/.

Goyns i wsp. [72] obserwowali rearanżację *c-ets-1* w dwu przypadkach ostrych białacek limfoblastycznych przebiegających z wysoką leukocytozą, niestety nie ustalono jednak, czy występowała t/4;11/. Autorzy sugerują, że położenie punktu złamania w 11q23 jest zmienne i może znajdować się albo w locus *c-ets-1* albo w jego pobliżu. Nasuwa się więc podejrzenie, że niemożność wykrycia rearanżacji *c-ets-1* w niektórych przypadkach białacek wiąże się z zastosowaniem niewłaściwej sondy do wykrycia rearanżacji, jeśli punkt złamania znajduje się w pewnej odległości od sekwencji *c-ets-1*.

Tak więc złamanie 11q23 połączone niekiedy z translokacją *c-ets-1* występuje w różnych białaczkach i chłoniakach. Poza omawianymi już białaczkami mielomonocytowymi i monoblastycznymi (typy M-4 i M-5, Tab. 2), ostrymi białaczkami limfoblastycznymi, białaczkami o mieszanym fenotypie i chłoniaku limfocytowym, opisano je także we wrodzonej białaczce mielomonocytowej u jednodniowego chłopca [167a], w zespołach mielodysplastycznych [89], w przełomie limfoblastycznym w przebiegu przewlekłej białaczki szpikowej [155], a nawet w guzach litych, jak np. mięsak Ewinga [214]. Wyniki te sugerują, że *c-ets-1* lub inne geny znajdujące się w 11q23 odgrywają rolę w różnych nowotworach, a więc są tkankowo niespecyficzne. Natomiast materiał genetyczny znajdujący się w 4q21, w przypadku t/4; 11/ należy uważać za raczej specyficzny dla różnicowania limfoidalnego [92], względnie różnicowania linii limfocytów i monocytów-makrofagów. Jest to o tyle interesujące, że trisomie 4 ostatnio wiąże się z ostrą białaczką mielomonocytową (typ M-4, Tab. 2) [110, 146, 178, 192, 193, 204]. Ponadto Gasner i wsp. [68] opisali przypadek ostrej białaczki z t/4;17//q25;q23/, której komórki początkowo zaliczano do komórek „null” (występowała tylko aktywność TdT i ekspresja antygenów HLA-DR). Natomiast w hodowli prowadzonej w komorach dyfuzyjnych wystąpiła równoczesna ekspresja markerów limfocytów T i mielomonocytów.

Założenie, że w 11q23 znajduje się gen lub geny tkankowo niespecyficzne, zaś w 4q21 – geny tkankowo specyficzne znalazło uogólnienie w hipotezie Heima i Mitelmana [93], w myśl której krytycznym następstwem rearanżacji chromosomowych charakteryzujących nowotwory jest fuzja dwu segmentów chromosomowych o całkowicie różnych funkcjach. Jeden z tych segmentów jest specyficzny dla typu komórki, a więc ważny w procesie różnicowania, podczas gdy drugi zawiera materiał genetyczny stymulujący proliferację, ale jest tkankowo niespecyficzny. Wprawdzie nic nie wiemy o przypuszczalnym genie lub genach związanych z różnicowaniem, a znajdujących się w długich ramionach chromosomu 4, nie jest jednak wykluczone, że *c-ets-1* należy do genów kontrolujących wzrost komórek, co może tłumaczyć dlaczego segment 11q23 stanowi gorące miejsce (hot spot) w cytogenetyce nowotworów. Uderzająca częstość rearanżacji 11q23 w białaczkach niemowląt i małych dzieci sugeruje, że odcinek ten podlega innej kontroli transkrypcji u płodu, a innej u osób dorosłych [92].

#### BIAŁACZKA O MIESZANYM FENOTYPIE Ph'-DODATNIA

Stass i Mirro [200] mówią o 5 przypadkach wykrytych przez nich białaczkach o mieszanym fenotypie (limfo-mieloidalnych) Ph'-dodatnich.

Chromosom Ph' (22q-) powstaje wskutek wymiennej translokacji między chromosomami 9 i 22 – t/9;22//q34.1;q11.21/ i jest uważany za cytogenetyczny marker przewlekłej białaczki

szpikowej [47, 186]. Chromosom Ph' stanowi nabytą nieprawidłowość i występuje w komórkach hemopoetycznych wszystkich linii i w ich prekursorach [189]. Punkty złamań w długich ramionach chromosomu 22 /22q11.21/ są zgrupowane w małym odcinku DNA, który leży w środkowej części genu **bcr** (od break-point cluster region), w chromosomie 22 [81, 95]. Proto-onkogen **c-abl**, który w warunkach prawidłowych znajduje się w długich ramionach chromosomu 9 /9q34/, w przypadku t/9;22/ zostaje przemieszczony do długiego ramienia chromosomu 22 [47]. **c-abl** wykazuje szereg homologii z onkogenami **v-abl** dwu transformujących retrowirusów:

– wirusa Abelsona białaczki myszy (Abelson murine leukemia virus, w skrócie Ab-MuLV) [220],

– szczepem 2 wirusa Hardy-Zuckerman mięsaka kotów (Hardy-Zuckerman 2 feline sarcoma virus, w skrócie HZ-2-FeSV) [16].

W następstwie translokacji koniec 5'**bcr** i **c-abl** pozostają w tej samej orientacji transkrypcyjnej.

W prawidłowych komórkach zarówno hemopoetycznych, jak i niehemopoetycznych **c-abl** ulega transkrypcji w dwie molekuly mRNA długości 6 i 7 kz [225], które z kolei ulegają translacji w białko o ciężarze cząsteczkowym 145 kd – p 145<sup>c-abl</sup> (Tab. 13), wykazujące niewielkiego stopnia aktywność kinazy tyrozynowej [123]. Natomiast w przypadkach klasycznej t/9;22/ powstaje nowy transkrypt **c-abl** długości ok. 8,5 kz [12, 28, 39, 67]. Klonowanie stykowego rejonu z chromosomu 22 ujawniło, że nieprawidłowo długi transkrypt mRNA jest molekułą hybrydową zawierającą egzony z końca 5'**bcr** (egzon b 2, lub egzon b 3 **bcr**) pozostającego w chromosomie 22, jak i prawie wszystkie egzony (z wyjątkiem egzonu I) z translokowanego **c-abl** [197]. Tak więc **bcr** ulega rearanzacji i powstaje nowy gen, którego część 5' pochodzi z sekwencji **bcr**, zaś część 3' z sekwencji **c-abl**. Nieprawidłowy mRNA długości 8,5 kz ulega translacji w unikalne białko o ciężarze cząsteczkowym 210 kd – p 210<sup>bcr-abl</sup> [9, 12, 28, 82, 197] (Tab. 13). W tym nowym białku p 210<sup>bcr-abl</sup> koniec aminowy prawidłowego białka p 145<sup>c-abl</sup> składający się z ok. 25 aminokwasów zostaje zastąpiony przez 600–700 aminokwasów kodowanych przez **bcr**. Podobnie w białku p 160 kodowanym przez **v-abl** Ab-MuLV 113 aminokwasów z końca aminowego prawidłowego białka kodowanego przez komórkowy gen **abl** zostaje zastąpionych przez 236 aminokwasów kodowanych przez gen **gag** retrowirusa [2].

Występuje jednak o najmniej jedna istotna różnica czynnościowa między produktem hybrydowego genu **bcr-abl** a produktem prawidłowego **c-abl**. Mianowicie p 210<sup>bcr-abl</sup>, podobnie zresztą jak i białko kodowane przez **v-abl** retrowirusa, wykazuje aktywność kinazy tyrozynowej, znacznie wyższą niż prawidłowe białko p 145<sup>c-abl</sup> [118, 122, 123]. A zatem, jak się wydaje, hybryda p 210<sup>bcr-abl</sup> ma krytyczne znaczenie w transformacji nowotworowej.

Chromosom Ph' nie jest patognomiczny dla przewlekłej białaczki szpikowej. Występuje on także w 25–30% przypadków ostrych białaczek limfoblastycznych dorosłych i 2–10% białaczek tego samego typu u dzieci [177, 187], a także w kilku procentach przypadków ostrej białaczki szpikowej [187]. Dotychczasowe dane wskazują, że chociaż punkty złamań w przewlekłej białaczce szpikowej i w ostrej białaczce limfoblastycznej, obu Ph'-dodatnich, w mikroskopie świetlnym wydają się zlokalizowane w tym samym miejscu, to jednak istnieją zasadnicze różnice molekularne. Obecnie mówi się o dwu molekularnie różnych chromosomach Ph' [7, 96, 97, 126]. W ok. 50% ostrych białaczek limfoblastycznych dorosłych i w większości przypadków tych białaczek u dzieci złamanie w chromosomie 22q11 leży bardziej proksymalnie niż u pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową – w obrębie pierwszego intronu genu **bcr** [7, 97], wskutek czego nie ulega on rearanzacji. Translokacja **c-abl** do tak okrojonego rejonu **bcr** powoduje, że transkrypcyjny mRNA jest mniejszy – wielkości 7 kz, podobnie jak kodowane chimeryczne białko o ciężarze cząsteczkowym 190 kd – p 190<sup>c-abl</sup> [29, 36, 55, 97, 128, 222] (Tab. 13). W tym mRNA pierwszy egzon genu **bcr** (e 1) jest złączony z drugim egzonom **c-abl**, co daje w ramce odczytu (reading frame) połączenie e 1–a 2 [55, 97]. Białko p 190<sup>c-abl</sup>, podobnie jak p 210<sup>bcr-abl</sup>, wykazuje wysokiego stopnia aktywność kinazy tyrozynowej [29, 36, 128, 222].

Wydaje się jednak, że p 190<sup>c-abl</sup> odgrywa rolę nie tylko w rozwoju ostrej białaczki limfoblastycznej Ph'-dodatniej. Niedawno wykazano, że w ostrej białaczce szpikowej Ph'-dodatniej punkt złamania w 22q11 znajduje się w odległości 5,8 kb od locus *bcr* i także powstaje p 190<sup>c-abl</sup> [129]. A zatem p 190<sup>c-abl</sup> nie byłoby specyficzne dla ostrych białaczek limfoblastycznych.

Reasumując: w przewlekłych i ostrych białaczkach Ph'-dodatnich u większości pacjentów występuje rearanżacja genu *bcr* i ekspresja p 210<sup>bcr-abl</sup>, jednakże około połowa przypadków ostrych białaczek limfoblastycznych Ph'-dodatnich przebiega bez rearanżacji genu *bcr* z ekspresją p 190<sup>c-abl</sup>. Te dwie molekularnie różne grupy ostrych białaczek limfoblastycznych Ph'-dodatnich (pacjenci z p 190<sup>c-abl</sup> i pacjenci z p 210<sup>bcr-abl</sup>) charakteryzuje podobny obraz kliniczny i morfologiczny [29, 36, 48, 54, 97, 127, 128, 168, 183, 195, 222], chociaż różnice genetyczne mogą mieć znaczenie biologiczne. Nie jest wykluczone, że t/9;22/ przebiegająca z rearanżacją genu *bcr* zachodzi w innej komórce docelowej, niż w przypadkach przebiegających bez rearanżacji *bcr* (wielopotencjalna komórka macierzysta vs. komórka ukierunkowana do różnicowania w linię limfoidalną). Alternatywnie p 210<sup>bcr-abl</sup> może mieć inną lokalizację w obrębie struktur komórkowych lub działać na inny substrat niż p 190<sup>c-abl</sup>. Obecność p 210<sup>bcr-abl</sup> sprawia, że ostra białaczka Ph'-dodatnia jest w zasadzie nieodróżnialna od przełomu blastycznego w przebiegu przewlekłej białaczki szpikowej [105] i sugeruje, że jest to ta sama choroba, w której faza rozpoznawana jako ostra białaczka limfoblastyczna jest w istocie przełomem blastycznym w przewlekłej białaczce szpikowej przebiegającej klinicznie w sposób skryty. Natomiast ostre białaczki Ph'-dodatnie z ekspresją p 190<sup>c-abl</sup> mogą odpowiadać prawdziwej białaczce de novo. Być może w kilku opisanych dotychczas przypadkach ostrej białaczki o mieszanym fenotypie Ph'-dodatniej występują jeszcze inne zmiany molekularne.

#### BIALĄCZKA O MIESZANYM FENOTYPIE Z INWERSJĄ /16//p13q22/

Niedawno Paietta i wsp. [169] opublikowali przypadek ostrej białaczki o mieszanym fenotypie ze zwiększoną eozynofilią i inwersją chromosomu 16 – inv/16//p13q22/. Białczkowe komórki morfologicznie odpowiadające mielomonocytom (typ M-4, Tab. 2) wykazywały równoczesną ekspresję TdT, którą autorzy uważają za marker linii limfoidalnej, i reagowały z przeciwciałem monoklonalnym VIM-2 specyficznym dla mielomonocytów [119]. Także Hogge i wsp. [101], którzy u 6 pacjentów z białaczką mielomonocytową i inv/16/ badali aktywność TdT, w dwu przypadkach wykryli, że 20–25% białczkowych blastów było TdT dodatnich. Wszystkie te badania sugerują względnie częste występowanie mieszanych fenotypów w białaczkach z inv/16/.

Uważa się, że inv/16//p13q22/ jest związana ze szczególnym wariantem białaczki mielomonocytowej (typ M-4, Tab. 2) przebiegającym z eozynofilią w szpiku [65]. W Tab. 14 cytowanej z pewną modyfikacją z pracy Koefflera [121] przedstawiono główne cechy tej białaczki.

#### EKSPRESJA *c-fos* W BIALĄCZKACH O MIESZANYM FENOTYPIE

*c-fos* jest proto-onkogenem, którego stałą i wysokiego stopnia ekspresję obserwowano w białaczkach o mieszanym fenotypie [174], a także w ostrych białaczkach mielomonocytowych (typ M-4, Tab. 2) i monoblastycznych (typ.

M-5, Tab. 2) [134, 143, 174]. Białaczki o mieszanym fenotypie, badane przez Pinto i wsp. [174], wykazywały równocześnie markery linii komórki B, jak i monocytów, nie przeprowadzono jednak badań kariotypu. Natomiast w ostrych białaczkach mieloblastycznych (typy M-1, M-2 i M-3, Tab. 2), w erytroleukemii (typ M-6, Tab. 2) i w białaczkach limfoblastycznych B i T komórkowych transkrypcja *c-fos* pozostawała na niskim poziomie. Autorzy sugerują, że ekspresja *c-fos* występuje tylko w tych komórkach linii szpikowej lub limfoidalnej, które pod wpływem TPA uzyskują stały fenotyp odpowiadający monocytom (monocyte-like phenotype). Wnioski te są zgodne z innymi badaniami, w których zarówno w liniach komórkowych wyprowadzonych z ostrych białaczek szpikowych człowieka (linie U-937, HL-60), jak i myszy (linia WEHI-3), pobudzonych do różnicowania w makrofagi przez TPA [153, 161, 162] lub czynnikiem wzrostowym pobudzającym wytwarzanie kolonii (colony stimulating factor, w skrócie CSF) [69] uzyskano transkrypcję *c-fos* i pojawienie się produktu *c-fos*. Z drugiej strony Mitchell i wsp. [152] sądzą, że ekspresja *c-fos* nie jest konieczna dla różnicowania komórek linii szpikowej w makrofagi. Jako przykład podają wariant komórek linii HL-60 oporny na TPA, który może zostać pobudzony do różnicowania w makrofagi bez towarzyszącej ekspresji *c-fos*. (Linia HLA-60 została wyprowadzona z komórek krwi pacjenta z ostrą białaczką promielocytową i jest uważana za linię promielocytów, którą jednak można pobudzić do różnicowania w granulocyty i makrofagi).

Komórkowy proto-onkogen *c-fos* wykazuje pewną homologię z onkogenami dwu odmiennych retrowirusów, wywołujących podobne histologicznie i patologicznie mięsaki kości u myszy. Są to:

wirus Finkel-Biskis-Jinkins mięsaka kości myszy (Finkel-Biskis-Jinkins mouse osteosarcoma virus, w skrócie FBJ-MSV) wyizolowany z występujących spontanicznie mięsaków kości u myszy szczepu CF-1 [59, 60];

wirus Finkel-Biskis-Reilly mięsaka kości myszy (Finkel-Biskis-Reilly mouse osteosarcoma virus, w skrócie FBR-MSV), wyizolowany z mięsaka kości wywołanego napromienianiem  $^{90}\text{Sr}$  myszy szczepu X/Gf [61].

Proto-onkogen *c-fos* u człowieka zlokalizowano w długich ramionach chromosomu 14 /14q24.3-q31/ [10, cyt. wg 90].

Produkt *c-fos* – fosfoproteina o ciężarze cząsteczkowym 55 kd (p 55<sup>c-fos</sup>) [41, 42] znajduje się w jądrze komórkowym i tworzy kompleksowy związek z innym białkiem p 39 [41, 43, 44]. Ekspresja *c-fos* mRNA jest najwyższa w życiu płodowym w owodni, w części trzewnej woreczka żółtkowego i w łożysku, a od 14 dnia ciąży w płodowej wątrobie (tkanka hemopoetyczna). W życiu pozapłodowym ekspresja *c-fos* mRNA występuje zwłaszcza w komórkach linii monocytów-makrofagów, a także w komórkach innych linii hemopoetycznych [161, 162].

Rolę *c-fos* w proliferacji komórkowej badano w modelu mysich fibroblastów (linia komórkowa NIH 3T3). Gdy pozostające w fazie spoczynkowej ( $G_0$ ) cyklu komórkowego fibroblasty NIH 3T3 stymulowano płodową surowicą cielecą zawierającą czynniki wzrostowe, uzyskiwano w ciągu 10–12 godzin zsynchronizowane wejście populacji komórkowej w fazę S cyklu komórkowego [160]. W ciągu 30 minut od stymulacji surowicą płodową występuje co najmniej 50-krotny wzrost poziomu *c-fos* mRNA z gwałtownym obniżeniem się, w ciągu następnych 90 minut, do podstawowego poziomu ekspresji [27, 38, 79, 115, 125, 160]. Ekspresja *c-fos* wyprzedza ekspresję

innego proto-onkogenu — **c-myc**, którego produkt również znajduje się w jądrze komórkowym. Wzrost poziomu **c-fos** mRNA jest w głównej mierze następstwem aktywacji transkrypcji [79]. Tak więc ekspresja **c-fos** jest najwcześniejszym ze znanych dotychczas efektów wpływu czynników wzrostowych na ekspresję różnych genów. Aktywacja **c-fos** i **c-myc** jest, jak się wydaje, odpowiedzią na interakcję czynnik wzrostowy-receptor, interakcję, która uruchamia cały łańcuch przekąźnikowy nadający odpowiednią informację do jądra komórkowego [24]. Jednakże w dalszym przebiegu cyklu komórkowego, komórek NIH 3T3, ekspresja **c-fos** mRNA pozostaje na bardzo niskim poziomie lub jest wręcz niewykrywalna [23]. Sugeruje to, że stała wysoka ekspresja **c-fos** nie jest konieczna dla ciągłości cyklu komórek NIH 3T3. Jednakże rola **c-fos** w podtrzymywaniu prawidłowej proliferacji nie może być całkowicie wykluczona, ponieważ stwierdzono, że w rosnących komórkach, w porównaniu z komórkami pozostającymi w fazie spoczynkowej, występuje nieznaczny wzrost ekspresji **c-fos** [160].

Ekspresja **c-fos**, podobnie jak **c-myc**, czyni komórkę „kompetentną”, tj. może ona syntetyzować DNA niezależnie od „czynników kompetencji wzrostu”, jak np. czynnik wzrostowy fibroblastów (fibroblast growth factor, w skrócie FGF) lub PDGF. Jakkolwiek do dalszego wzrostu komórki konieczne są „czynniki progresji wzrostu”, jak np. somatomedyny [201], **c-fos** i **c-myc** działają wspólnie, pobudzając komórkę do podziału [24].

Nie jest wykluczone, że ekspresja **c-fos** w komórkach ostrych białaczek o mieszanym fenotypie, jak i białaczek nielomonocytowych i monoblastycznych, która ma być molekularnym markerem różnicowania monocytoidalnego komórek białczkowych [143, 174], świadczy po prostu o uniezależnieniu się tych komórek od zewnątrz pochodnych „czynników kompetencji wzrostu”.

#### PRZEŁĄCZANIE LINII RÓŻNICOWANIA

Kaneko i wsp. [111] u jednego pacjenta z ostrą białaczką i punktem złamania w q23 chromosomu 11 /t/11; 19//q23; p11// obserwowali w nawrocie (po częściowej remisji) zmianę morfologii i fenotypu immunologicznego białczkowych komórek, których kariotyp nadal jednak zachowywał t/11; 19/. Początkowo białczkowe komórki morfologicznie odpowiadały typowi L-1 (Tab. 1) i wykazywały antygeny powszechnej ostrej białczki limfoblastycznej, ale w nawrocie proliferowały komórki typu M-5b (Tab. 2) noszące markery linii monocytów i mielomonocytów.

Stass i Mirro [200] w retrospektywnych badaniach 150 chorych z nawrotem ostrej białczki limfoblastycznej lub szpikowej, u 13 osób (8,6%) obserwowali przełączanie linii różnicowania. Autorzy sądzą jednak, że w tym materiale część przypadków stanowią białczki de novo, ponieważ występowała zmiana kariotypu białczkowych komórek, na co niewątpliwie wpływ wywierała chemioterapia.

Doskonałego przykładu na związek między liniami limfoidalną i mieloidalną dostarczają badania eksperymentalne, w których wywoływano transformację komórek szpikowych myszy wirusem J 2 posiadającym dwa onkogeny **v-myc** i **v-raf**. J 2 jest wytworzoną laboratoryjnie hybrydą, na którą składają się:

— fragmenty końca 5' onkogenu **raf** retrowirusa mięsaka myszy (w skrócie MSV),



– fragmenty końca 3' onkogenu **mil** retrowirusa szczepu Mill-Hill No 2 mielocytomatozy ptaków (w skrócie MH 2) (onkogen **mil** u ptaków jest odpowiednikiem **raf** u myszy),

– fragment 5' onkogenu **myc** MH 2,

– oraz koniec 3' onkogenu **myc** retrowirusa MC 29 mielocytomatozy ptaków ( w skrócie MC 29) [37].

Klinken i wsp. [cyt. wg 117] wykazali, że początkowo rozwijające się kolonie wyprowadzone z zakażonych przez J 2 komórek szpiku myszy miały wyłącznie fenotyp komórki pre-B, jednakże w miarę dalszego rozwoju nieoczekiwanie komórki pre-B zmieniały się w makrofagi, chociaż inne dojrzewały do komórek noszących powierzchniowe Ig. Natomiast komórki zakażone tylko jednym onkogenem, **v-raf** lub **v-myc**, pozostawały jako stabilne transformanty pre-B. Jedną z interpretacji tych wyników zakłada, że wirus **v-myc/v-raf** transformuje bipotencjalne komórki ukierunkowane, które mogą różnicować się albo w linię B, albo mieloidalną. Alternatywnie – kombinacja **v-myc/v-raf** może niszczyć zaprogramowanie ukierunkowanych komórek B i powodować przełączanie w linię mieloidalną. Powstała zatem konieczność odróżnienia transformacji komórki bipotencjalnej wywołanej przez wirusa **v-mbc/v-raf** od procesu przełączania przez tegoż wirusa linii limfoidalnej w linię makrofagów. Badania Klinkena i wsp. [117] jednoznacznie wykazały, że linie komórki B mogą ulec konwersji w makrofagi. W badaniach swych autorzy posłużyli się transgenicznymi myszami E mi-**myc**. Transgeniczne myszy E mi-**myc** są to myszy, do których komórek embrionalnych wprowadzono **c-myc** w połączeniu z sekwencjami wzmacniającymi ekspresję części stałej  $Ig_H$  (enhancer mi, w skrócie E mi). Wzmacniacz  $Ig_H$  wymusza ekspresję transgenu **c-myc** wyłącznie w komórkach linii B [3, 5]. Ciągła ekspresja **c-myc** powoduje wzrost ilości komórek pre-B w szczególnej fazie, zwanej fazą przedbiałaczkową, po której może nastąpić rozwój jawnych nowotworów pre-B lub B-komórkowych [85, 130]. Klinken i wsp. [117] wykazali, że wprowadzenie **v-raf** albo do klonowanych komórek linii chłoniaka B komórkowego E mi-**myc**, albo do komórek linii B wyprowadzonych ze szpiku transgenicznych myszy w fazie przedbiałaczkowej, może powodować ich konwersję w makrofagi. Tak więc równoczesna ekspresja **myc** i **raf** powoduje zmianę genetycznego programu różnicowania limfocytów w makrofagi. Z sześciu klonowanych przez autorów linii, które przeszły tę dramatyczną konwersję, trzy były w stadium komórki pre-B, a trzy w stadium dojrzałej komórki B. Przełączanie linii różnicowania w ciągłej hodowli występowało dopiero po 6–14 tygodniach, co sugeruje, że miało miejsce po 70 do 200 cyklach replikacyjnych. Przeobrażone komórki wykazywały zdolności adherencyjne i fagocytowały, rozmiarami i cechami morfologicznymi, odpowiadały makrofagom, wytwarzały enzymy charakteryzujące makrofagi (lizozym), a także nosiły mieloidalne markery powierzchni. Ich wzrost w hodowli był niezależny od 2-merkaptetanolu, który jest konieczny do wzrostu

limfocytów B, ale nie do wzrostu komórek mieloidalnych. Co więcej, makrofagi wykazujące cechy niedojrzałości mogły zostać pobudzone do dojrzewania. Z drugiej jednak strony pomimo utraty markerów powierzchniowych charakteryzujących linię limfocytów B, łącznie z powierzchniowymi Ig, makrofagi te zachowały rearanżację genu Ig swego macierzystego klonu. Chociaż ekspresja transgenu E mi-*myc* ulegała zmniejszeniu lub całkowicie zanikała w bardziej zróżnicowanych liniach, to jednak nadal zachowywały one onkogenność. Linie te wytwarzały czynnik wzrostowy pobudzający wytwarzanie kolonii granulocytów-makrofagów (w skrócie G,M-CSF) i w większości wykazywały nieprawidłowości kariotypu.

Powyższe wyniki wskazują, że wprowadzenie dodatkowego onkogenu w podatną komórkę powoduje jej przeprogramowanie (przeprogramowanie limfocytów B w makrofagi). Być może obserwowane u ludzi przełączanie linii różnicowania w przebiegu niektórych białaczek odzwierciedla aktywację dodatkowych onkogenów.

TABELA I

Morfologiczna klasyfikacja ostrych białaczek limfoblastycznych wg grupy hematologów francuskich, amerykańskich i brytyjskich (Klasyfikacja FAB) [13]

Cechy cytologiczne	Typ białaczki limfoblastycznej		
	L-1 (typ mikrolimfoblastyczny)	L-2 (typ heterogenny)	L-3 (typ komórki chłonia- ka Burkitta)
Wielkość komórki	Małe komórki (homogenna popu- lacja)	Przeważają duże ko- mórki, ale populac- ja wykazuje hetero- genność	Duże komórki (ho- mogenna popu- lacja)
Chromatyna jądra	Homogenna	Zmienna, często wy- stępuje heterogenny obraz chromatyny jądra	Zmienna (delikatne kropkowanie)
Kształt jądra	Regularny	Wcięcia, ząbkowanie	Regularny (owalny, lub okrągły)
Jąderka	Niewyraźne	Bardzo wyraźne	Bardzo wyraźne
Cytoplazma	Skąpa	Umiarkowana ilość	Umiarkowana ilość
Zasadochłonność cytoplazmy	Słabo zasadochlonna	Zmienna	Silnie zasadochlonna
Wakuolizacja	Zmienna	Zmienna	Zwykle uderzająca wakuolizacja

TABELA 2

Morfologiczna klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych wg grupy hematologów francuskich, amerykańskich i brytyjskich (Klasyfikacja FAB) [13]

Podgrupa	Typ białaczki	Częstość występowania	Morfologia
M-1	Ostra białaczka szpikowa bez cech dojrzewania	20%	Przeważają niedojrzałe mieloblasty, odsetek promielocytów, mielocytów lub monocytów nie przekracza 10%, w sporadycznych komórkach mogą występować pałeczki Auera*.
M-2	Ostra białaczka szpikowa z dojrzewaniem	30%	Przeważają niedojrzałe mieloblasty, jednakże odsetek promielocytów i mielocytów przekracza 10%, odsetek monocytów jest mniejszy od 20%. Mogą występować pałeczki Auera. Większość komórek jest peroksydazo-dodatnia.
M-3 i M-3 <sub>v</sub>	Ostra białaczka promielocytowa	10%	Przeważają promielocyty (powyżej 30%), często w cytoplazmie komórek występują całe wiązki pałeczek Auera. Białaczkowe komórki „in vitro” stosunkowo łatwo mogą zostać pobudzone do różnicowania w granulocyty lub makrofagi. Klinicznie u około 80% chorych, w czasie rozpoznania lub w czasie chemioterapii inicjującej remisję, występuje zespół rozsianego wewnątrznaczyniowego krzepnięcia. W wariantcie mikrogranularnym M-3 <sub>v</sub> ziarnistości nie są widoczne w mikroskopie świetlnym, a ponadto występują charakterystyczne dwupłatowe lub nerkowate jądra.
M-4 i M-4 <sub>EO</sub>	Ostra białaczka mielomonocyto-towa	20%	Mieszana populacja nieprawidłowych monocytów (powyżej 20%) oraz mieloblastów i promielocytów (powyżej 20%). W wariantcie M-4 <sub>EO</sub> (częstość występowania około 5%) odsetek eozynofili w szpiku waha się 1–30%.
M-5 a i b	Ostra białaczka monocytowa	15%	Przeważają komórki monocytoidalne (powyżej 80%). W wariantcie M-5 a niedojrzałe monoblasty przekraczają 80%. W wariantcie M-5 b bardziej dojrzałe monocyty przekraczają 20%.

Tab. 2, cd.

Podgrupa	Typ białaczki	Częstość występowania	Morfologia
M-6	Ostra erytro-leukemia	5%	Przeważają mieloblasty i erytro-blasty (powyżej 50%). Patologiczne wielojądrzaste erytroblasty zawierają bloki ziaren PAS-dodatnich
M-7	Ostra białaczka megakario-blastyczna	poniżej 5%	Metody ultrastrukturalno-cytochemiczne pozwoliły na wykrycie w białaczkowych komórkach peroksydazy płytkowej, a badania fenotypu immunologicznego ujawniły ekspresję antygenów megakariocytów, takich jak: glikoproteiny płytkowe Ib i IIb/IIIa i/lub antygen związany z VIII czynnikiem krzepnięcia. Prawie u wszystkich pacjentów występuje zwłóknienie szpiku, a u 20-40% obserwowano ostrą mielofibrozę, co być może pozostaje w związku z faktem, że megakariocyty wytwarzają czynnik wzrostowy z płytek (platelet derived growth factor, w skrócie PDGF), który pobudza proliferację fibroblastów.

\* Palczki Auera są azurofilnymi, wrzecionowatymi lub pałeczkowatymi wtrętami cytoplazmatycznymi, spotykanymi w komórkach blastycznych najczęściej w białaczkach typu M-2 i M-3. Badania ultrastrukturalne połączone z badaniami wyposażenia enzymatycznego pałeczek Auera wykazały aktywność peroksydazy, kwaśnej fosfatazy oraz niespecyficznych esteraz.

TABELA 3

Antygeny występujące na komórkach białaczkowych blastów wychodzących z linii B (opracowana na podstawie [26, 64, 141, 163, 215])

Nazwa antygenu wg CD /*/ lub innej nomenklatury	Ciężar cząsteczkowy antygenu (kd)	Ekspresja antygeny
HLA-DR (II klasa antygenów układu HLA, antygeny Ia-like)	29 i 33	Prekursorowe limfopoetyczne komórki szpiku. Komórki B. Niektóre plazmocyty. Aktywne komórki T. Makrofagi, niektóre monocyty i granulocyty. Ostre białaczki limfoblastyczne wychodzące z bardzo wczesnych rozwojowo prekursorów komórek B (dawniejsza nazwa białaczki „null” komórkowe) oraz z bardziej dojrzałych komórek B.

Tab. 3, cd.

Nazwa antygeny wg CD /*/ lub innej nomenklatury	Ciężar cząsteczkowy antygeny (kd)	Ekspresja antygeny
		Okolo 10% przypadków ostrych białaczek limfoblastycznych wychodzących z linii komórek T. Ostre białaczki szpikowe.
CD19 (anty-B4)	95	Antygen bardzo wczesnych komórek ukierunkowanych w linię B. Inne komórki linii B. Ostre białaczki limfoblastyczne wychodzące z linii komórek B. Foon i Todd [64] uważają przeciwciała anty-B4 za najbardziej specyficzne dla ostrych białaczek limfoblastycznych B-komórkowych.
CD10 (anty-CALLA, J5, BA-3)	100	Komórki szpiku ukierunkowane w linię B/HLA-DR <sup>+</sup> oraz zarówno TdT <sup>+</sup> , jak i TdT <sup>-</sup> . Antygen powszechnych ostrych białaczek limfoblastycznych (common acute lymphoblastic leukaemia-associated antigen, w skrócie CALLA). Komórki chłoniaka Burkitta. Komórki chłoniaka guzkowego. Komórki niektórych chłoniaków limfoblastycznych.
CD20 (anty-B1)	35	Komórki szpiku ukierunkowane w linię B. Inne komórki linii B. Ostre białaczki limfoblastyczne wychodzące z ukierunkowanych komórek B, komórek pre-B i komórek B.
CD22 (przeciwciała HD6, HD39, SCHCL-2)	135	Okolo 75% limfocytów B. W komórkach ukierunkowanych w linię B ekspresja CD22 występuje w cytoplazmie, natomiast w bardziej dojrzałych komórkach linii B — na powierzchni. Zdaniem Janossy i Masona [wg 26] cytoplazmatyczna ekspresja CD22 charakteryzuje większość ostrych białaczek limfoblastycznych B komórkowych.

\* CD skrót od cluster of differentiation wg nomenklatury ustalonej przez Third International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens w Oxfordzie w 1986 r. [170]

TABELA 4

Antygeny występujące na komórkach białaczkowych blastów wychodzących z linii T (opracowano na podstawie [26, 64, 141, 175, 176, 215, 217])

Nazwa antygenu wg CD /*/ lub innej nomenklatury	Ciężar cząsteczkowy antygeny (kd)	Ekspresja antygeny	Komentarz
CD7 (anty-Leu-9)	40	Antygen bardzo wczesnych komórek ukierunkowanych w linię T, występuje najwcześniej ze wszystkich markerów linii T [175, 176] i wszystkich innych limfocytów T (pan-T). Antygen właściwy dla wszystkich ostrych białaczek limfoblastycznych wychodzących z komórek T.	Receptor dla IgM
CD5 (OKT-1, anty-T-1, anty-Leu-1)	65	Antygen wszystkich limfocytów T i tymocytów. Występuje w większości ostrych białaczek limfoblastycznych wychodzących z komórek T (choć nie we wszystkich przypadkach).	
CD2 (OKT-11, anty-T-11, anty-Leu-5)	46-50	Antygen dojrzałych limfocytów T. Występuje w ostrych białaczkach limfoblastycznych wychodzących z bardziej dojrzałych komórek T.	Receptor dla erytrocytów barana, LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen); odgrywa rolę w aktywacji komórek T
CD3 (OKT-3, anty-T-3, anty-Leu-4)	19-29	Antygen limfocytów T w cyklu mitotycznym. W komórkach ukierunkowanych w linię T, ekspresja CD3 występuje w cytoplazmie, natomiast w bardziej dojrzałych komórkach linii T – na powierzchni. Zdaniem Janossy i Masona [cyt. wg 26] cytoplazmatyczna ekspresja CD3 charakteryzuje większość białaczek limfoblastycznych T komórkowych.	Kompleks antygenów specyficznych dla receptora komórki T

\* CD skrót od cluster of differentiation

TABELA 5

Antygeny występujące na komórkach białaczkowych blastów wychodzących z linii szpikowych (opracowano na podstawie [26, 64, 86a, 141, 147, 218])

Nazwa antygenu wg CD /*/ lub innej nomenklatury	Ciężar cząsteczkowy antygeny (kd)	Ekspresja antygeny
CD 34 (3C5, My 10)	115	Komórka macierzysta zdolna do różnicowania się w linię mieloidalną i limfoidalną. 70% ostrych białaczek szpikowych i limfoblastycznych (wychodzących najczęściej z wczesnych rozwojowo komórek ukierunkowanych w linię B).
HLA-DR	29 i 33	Komórka macierzysta. Prekursorowe komórki tworzące mieszane kolonie (mixed colony forming cell, w skrócie CFU-GEMM). Komórki tworzące kolonie granulocytów-monocytów (granulocyte-monocyte colony forming cell, w skrócie CFU-GM). Mieloblasty. 89% ostrych białaczek szpikowych.
S 3-13		CFU-GEMM. CFU-GM. Mieloblasty. 100% ostrych białaczek szpikowych.
S 8-6		CFU-GEMM. CFU-GM. Mieloblasty. Promielocyty. 69% ostrych białaczek szpikowych.
CD 33 (My 9)	67	CFU-GEMM. CFU-GM. Komórki tworzące kolonie erytroblastów i megakariocytów (burst forming unit, w skrócie BFU). Komórki linii neutrofilii do metamielocytów włącznie. Komórki linii monocytów, do monocytów włącznie. 95% ostrych białaczek szpikowych.
CD 13 (My 7)	150	CFU-GM. Wszystkie komórki linii neutrofilii. Wszystkie komórki linii monocytów. 97% ostrych białaczek szpikowych.
CD 15 (Hapten X) (My 1, FMC 10, VIM-DR, VIM-D5, DUHL 60.1)	50-180	Granulocyty. Monocyty-makrofagi. Komórki Reed-Sternberga. Komórki klonogenne ostrych białaczek szpikowych (colony forming unit-acute myeloblastic leukaemia, w skrócie CFU-AML).

\* CD skrót od cluster of differentiation

TABELA 6

Lokalizacja loci immunoglobulinowych w chromosomach człowieka

Locus	Chromosom	Piśmiennictwo
Locus łańcuchów ciężkich immunoglobulin	14q32	[116]
Locus łańcucha lekkiego kappa	2p11-p12	[139]
Locus łańcucha lekkiego lambda	22q11	[144]

TABELA 7

Lokalizacja loci receptora komórki T w chromosomach człowieka

Locus	Chromosom	Piśmiennictwo
Locus łańcucha alfa	14q11	[40, 49]
Locus łańcucha beta	7q32-q36	[94, 103, 156]
Locus łańcucha gamma	7p13-p15	[94, 159]
Locus łańcucha delta	14 (ok. 85 kb powyżej rejonu stałego locus łańcucha alfa)	[33, 80, 86, 209]

Trzy loci receptora komórki T (alfa, beta i gamma) pokrywają się z miejscami łamliwymi chromosomów (chromosomal fragile sites), stąd stosunkowo częste translokacje obejmujące te loci.



TABELA 8  
Klasyfikacja morfologiczno-immunologiczno-cytogenetyczna ostrych białaczek limfoblastycznych (Klasyfikacja MIC) [215]

Podgrupa	Kariotyp	Ostre białaczki limfoblastyczne wychodzące z linii komórek B						Morfologia wg FAB
		Rearanżacja genów Ig	Antygen CD19 (anty-B4)	TdT	HLA-DR	Antygen CD10 (CALLA)	Cyt Ig	
Wychodzące z bardzo wczesnych rozwojowo prekursorów komórek B (dawniejsza nazwa – białaczki „null” komórkowe)	t(4; 11)/t(9; 22) (translokacja ta występuje także w białaczkach T-komórkowych)	+	+	+	+	–	–	L-1, L-2
Powszechne ostre białaczki limfoblastyczne	6q- zbliżony do haploиду t lub del(12p)/ t(9; 22)	+	+	+	+	–	–	L-1, L-2
Białaczki pre-B komórkowe	t(1; 19)/ t(1; 22)	+	+	+	+	+	+	L-1
Białaczki B-komórkowe	t(8; 14)/ t(2; 8)/ t(8; 22)/ 6q-	+	+	–	+	+/-	-/+	L-3 (pojedynczy łańcuch lekki – monoklonalność)

Podgrupa	Kariotyp	Ostre białaczki limfoblastyczne wychodzące z linii komórek T				Morfologia wg FAB
		Rearanżacja genów TCR	Antygen CD7 (receptor dla IgM)	Antygen CD2 (receptor dla erytrocytów barana)	TdT	
Wychodzące z bardzo wczesnych rozwojowo prekursorów komórek T	t lub del(9p)	+	+	–	+	L-1, L-2
Białaczki T-komórkowe <sup>*/</sup>	t(11; 14)/ 6q-	+	+	+	+	L-1, L-2

W niewielkim odsetku przypadków (6-10%) ostre białaczki limfoblastyczne wychodzące z linii komórek T mogą posiadać antygeny HLA-DR i/lub CALLA.  
\* Niektóre białaczki T-komórkowe mogą wykazywać markery tymocytów z części korowej grasicy.

TABELA 9

Klasyfikacja MIC ostrych białaczek szpikowych uwzględniająca związek między nieprawidłowościami kariotypu a morfologią komórek białaczkowych (w nawiasach podano rzadsze związki) [wg 215a]

Nomenklatura sugerowana przez MIC	Częstość występowania (%)	Nieprawidłowości kariotypu	Morfologia wg kwalifikacji FAB
M2/t/8; 21/	12	t/8; 21//q22; q22/	M2
M3/t/15; 17/	10	t/15; 17//q22; q12/	M3, M3 <sub>v</sub>
M5a/t/11q/	6	t/del/11//q23/	M5a (M5b, M4)
M4 <sub>EO</sub> /inv/16/	5	inv/del/16//q22/	M4 <sub>EO</sub>
M1/t/9;22/	3	t/9; 22//q34; q11/	M1 (M2)
M2/t/6; 9/	1	t/6; 9//p21-22; q34/	M2 lub M4 z bazofilią
M1/inv/3/	1	inv/3//q21; q26/	M1 (M2, M4, M7) z nadpłytkowością
M5b/t/8; 16/	poniżej 0,1	t/8; 16//p11; p13/	M5b z fagocytozą
M2 Bazo/t/12p/	poniżej 0,1	t/del/12//p11-13/	M2 z bazofilią
M4/+4	poniżej 0,1	+4	M4 (M2)

TABELA 10

Klasyfikacja MIC ostrych białaczek szpikowych przedstawiająca wyłącznie nieprawidłowości kariotypu, bez uwzględnienia specjalnych związków z morfologią komórek [wg 215a]

Nomenklatura sugerowana przez MIC	Częstość występowania (%)	Nieprawidłowości kariotypu
M?/+8	8	+8
M?/-7	4	-7
M?/7q-	3	7q-
M?/5q-	3	5q-
M?/-Y	1	-Y
M?/+21	1	+21
M?/9q-	poniżej 0,1	9q-
M?/i/17q/	poniżej 0,1	i/17q/
M?/20q-	poniżej 0,1	20q-
M?/+22	poniżej 0,1	+22

TABELA 11

Ekspresja markerów „niezgodnych” z linią różnicowania w ostrych białaczkach (modyfikacja wg [100])

Ostre białaczki określane jako białaczki szpikowe	
Aktywność terminalnej transferazy dezoksynukleotydowej (w ok. 10% przypadków)	
Ekspresja CD7	
Rearanżacja genów łańcucha ciężkiego immunoglobulin lub genów receptora komórki T (stosunkowo częsta, zwłaszcza w przypadkach ostrych białaczek szpikowych w których występuje aktywność terminalnej transferazy dezoksynukleotydowej)	
Ekspresja CD10 (CALLA <sup>+</sup> )	
Ostre białaczki określane jako białaczki limfoblastyczne	
Ekspresja mieloperoksydazy [57]	
Ekspresja CD13 (My 7) i/lub CD33 (My 9) (w ponad 30% przypadków ostrych białaczek limfoblastycznych dorosłych [199], CD34 (My 10) (w ponad 50% przypadków ostrych białaczek limfoblastycznych [218]), a także CD15 (My 1)	
W białaczkach limfoblastycznych T komórkowych – rearanżacja genów łańcucha ciężkiego immunoglobulin (częsta)	
W białaczkach limfoblastycznych B komórkowych – rearanżacja genów receptora komórki T (częsta)	
Ostre białaczki z cechami antygenowymi zarówno powszechnych ostrych białaczek limfoblastycznych (które wychodzą z linii B), jak i ostrych białaczek T komórkowych	
Ostre białaczki limfoblastyczne CD10-ujemne (CALLA <sup>-</sup> ) wykazujące równoczesną ekspresję antygenów CD19 i CD7 [167]	

TABELA 12

Ostra białaczka hybrydowa z translokacją t/4; 11/ (modyfikacja [121])

Częstość występowania	5–10% wszystkich ostrych białaczek limfoblastycznych (78% wrodzonych ostrych białaczek limfoblastycznych)
Wiek chorych	Noworodki i dzieci poniżej 18 miesięcy lub dorośli
Obraz kliniczny	Hepato-splenomegalia, wysoka leukocytoza
Fenotyp komórek białaczkowych	Cechy morfologiczne (zwłaszcza ultrastrukturalne), badania cytochemiczne i badania markerów immunologicznych wykazują cechy linii limfocytów i monocytów
Cechy szczególne	Zdolność do różnicowania się komórek białaczkowych w linię monocytów
Kariotyp	t/4; 11//q21; q23/
Onkogen	W 11q23 leży c-ets-1, który ulega translokacji do 4q21
Rokowanie	Złe

TABELA 13

Zmiany molekularne w następstwie translokacji t/9; 22//q34; q11/ [wg 126]

Chromosom	Produkt transkrypcji (mRNA)	Produkt translacji (białko)
Prawidłowy 9	<b>c-abl</b> mRNA 6 i 7 kb	białko <b>c-abl</b> 145 kd (p 145 <sup>c-abl</sup> )
Prawidłowy 22	<b>bcr</b> mRNA 4,5 i 6,7 kb	białko <b>bcr</b> 160 kd (p 160 <sup>abl</sup> )
9q <sup>+</sup>	nie znany	nie znany
22q <sup>-</sup>	Przewlekła białaczka szpikowa: <b>bcr-abl</b> mRNA 8,5 kb	p 210 <sup>bcr-abl</sup>
	Ostra białaczka limfoblastyczna: <b>bcr-abl</b> mRNA 7,0 kb lub <b>bcr-abl</b> mRNA 8,5 kb	p 190 <sup>c-abl</sup> lub p 210 <sup>bcr-abl</sup>
	Ostra białaczka szpikowa: nie znany	p 190 <sup>c-abl</sup> (opisano tylko u jednego pacjenta)

TABELA 14

Białaczka mielomonocytoza (M-4) z eozynofilią i nieprawidłowościami chromosomu 16 (modyfikacja wg [121])

Częstość występowania	5% wszystkich ostrych białacek szpikowych
Cechy morfologiczne	Komórki blastyczne o cechach mielomonocytów (M-4), ponadto w szpiku występuje zwiększony odsetek eozynofili (1–30%)
Cechy histochemiczne	Słaby odczyn na niespecyficzną esterazę
Kariotyp	Inwersja, translokacja, a niekiedy delecja chromosomu 16. Znaczenie krytyczne przypisuje się złamaniu (w miejscu łamliwym) w 16q22
Onkogen	Nie znany
Zmiany molekularne	W 16q22 znajduje się zgrupowanie genów metalotioneiny (metallothionein genes cluster), które zawiadują homeostazą metali ciężkich w komórce (przypuszcza się, że ich produkty wiążą i magazynują cynk w komórce, wpływając w ten sposób na różnicowanie i dojrzewanie granulocytów i monocytów). W następstwie złamania w 11q22, np. w inv/16//p13 q22/, lub t/16; 16//p13; q22/ geny te ulegają rozerwaniu. Rozerwanie locus metalotioneiny może wpływać w sposób istotny na czynność jego produktu i stanowić ważny etap w leukemogenezie. Alternatywnie proponuje się, że przeniesienie elementów kontrolujących transkrypcję genów metalotioneiny w 16p13 może być przyczyną aktywacji niezanego jeszcze proto-onkogeny komórkowego, który leży w tym właśnie miejscu
Rokowanie	70–90% całkowitych remisji

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABE R., SATO T., UCHIDA T., KARIYONE S., MORI H., SUZUKI H., Infantile acute leukemia with 11q23 chromosome abnormality and lineage infidelity, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **31**: 279-283, 1988.
- [2] Adams J. M., Oncogene activation by fusion of chromosomes in leukaemia, *Nature*, **315**: 542-543, 1985.
- [3] ADAMS J. M., HARRIS A. W., PINKERT C. A., CORCORAN L. M., ALEXANDER W. S., CORY S., PALMITER R. D., BRINSTER R. L., The *c-myc* oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice, *Nature*, **318**: 533-538, 1985.
- [4] AISENBERG A. C., WILKES B. M., The genotype and phenotype of T cell and non T, non B acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, **66**: 1215-1218, 1985.
- [5] ALEXANDER W. S., SCHRADER J. W., ADAMS J. M., Expression of the *c-myc* oncogene under control of an immunoglobulin enhancer in E mi-*myc* transgenic mice, *Mol. Cell. Biol.*, **7**: 1436-1444, 1987.
- [6] ANDREWS R. C., SINGER J. W., BERNSTEIN I. D., Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115 kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors, *Blood*, **67**: 842-845, 1986.
- [7] AR-RUSHDI A., NEGRINI M., KURZROCK R., HUEBNER K., CROCE C. M., Fusion of the *bcr* and *c-abl* genes in Ph<sup>1</sup>-positive acute lymphocytic leukemia with no rearrangement in the breakpoint cluster region, *Oncogene*, **2**: 353-357, 1988.
- [8] ASOU N., MATSUOKA M., HATTORI T., KAWANO F., MAEDA S., SHIMADA K., TAKATSUKI T., T cell gamma gene rearrangement in haematologic neoplasms, *Blood* **69**: 968-970, 1987.
- [9] Autor anonimowy, *bcr-abl* in chronic myeloid leukemia, *Lancet*, **2**: 258-259, 1986.
- [10] 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**: 4826-4830, 1984.
- [11] BEN-BASSAT I., GALE R. P., Hybrid acute leukemia, *Leuk. Res.*, **8**: 926-936, 1984.
- [12] BEN-NERIACH Y., DALEY G. Q., MES-MASSON A. M., WITTE O. N., BALTIMORE D., The chronic myelogenous leukemia: Specific p 210 protein is the product of *bcr/abl* hybrid gene, *Science*, **233**: 212-214, 1986.
- [13] BENNETT J. M., CATOVSKY D., DANIEL M. T., FLANDRIN G., GALTON D. A. G., GRALNICK H. R., SULTAN C., Proposals for the classification of the acute leukemias: French-American-British (FAB) Cooperative Group, *Br. J. Haematol.*, **33**: 451-458, 1976.
- [13a] BENNETT J. M., CATOVSKY D., DANIEL M. T., FLANDRIN G., GALTON D. A. G., GRALNICK H. R., SULTAN C., The French-American-British (FAB) Cooperative Group 1982. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes, *Br. J. Haematol.*, **51**: 189-199, 1982.
- [14] BENNETT J. M., CATOVSKY D., DANIEL M. T., FLANDRIN G., GALTON D. A. G., GRALNICK H. R., SULTAN C., Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocytic lineage (M7): A report of the French-American-British Cooperative Group, *Ann. Intern. Med.*, **103**: 460-462, 1985.
- [15] BERENSON B. J., ANDREWS R. G., BESINGER W. I., KALAMASZ D., KNITTER G., "In vivo" reconstitution of hematopoiesis in baboons using 12-8 positive marrow cells isolated by avidin-biotin immunoadsorption, *Blood*, **68**: 137a, 1986.
- [16] BESMER P., HARDY W. D. Jr., ZUCKERMAN E. E., BERGOLD P., LEDERMAN L., SNYDER H. W. Jr., The Hardy-Zuckerman 2-FeSV, a new feline retrovirus with oncogene homology to Abelson-MuLV, *Nature*, **303**: 825-828, 1983.

- [17] BJERRUM O. W., PHILIP P., MÜLLER-BÉRAT N., HERTZ H., KILLMANN S. A., Acute lymphocytic leukaemia with t(4; 11): A clinical subentity, *Scand. J. Haematol.*, **35**: 96-101, 1985.
- [18] BOEHM T. L. J., WERLE A., DRAHAVEKY D., Immunoglobulin heavy chain and T cell receptor gamma and beta chain gene rearrangements in acute myeloid leukaemias, *Molec. Biol. Med.*, **4**: 51-62, 1987.
- [19] BOLLUM F. J., Terminal deoxynucleotidyl transferase as a hematopoietic cell marker, *Blood*, **54**: 1203-1215, 1979.
- [19a] BOULUKOS K. E., POGNONEC P., BEGUE A., GALIBERT F., GESQUIERE J. C., STEHELIN D., GHYSDAEL J., Identification in chickens of an evolutionary conserved cellular *ets* -2 gene (*c-ets-2*) encoding nuclear proteins related to the products of the *c-ets* protooncogene, *EMBO J.*, **7**: 697-705, 1988.
- [20] BRADSTOCK K. F., HOFFBRAND A. V., GANESHAGURU K., LLEWELLIN P., PATTERSON K., WONKE B., PRENTICE H. G., BENNETT M., PIZZOLO G., BOLLUM F. J., JANOSSY G., Terminal deoxynucleotidyl transferase expression in acute nonlymphoid leukaemia, *Br. J. Haematol.*, **47**: 133-143, 1981.
- [21] BRADSTOCK K. F., KERR A., BOLLUM F. J., Antigenic phenotype of TdT-positive cells in human peripheral blood, *Cell. Immunol.*, **90**: 590-598, 1985.
- [22] BRADSTOCK K. F., KERR A., KABRAL A., FAVALORO E. J., HENSON J. W., Co-expression of p 165 myeloid surface antigen and terminal deoxynucleotidyl transferase: A comparison of acute myeloid leukaemia and normal bone marrow cells, *Am. J. Hemat.*, **23**: 43-50, 1986.
- [23] BRAVO R., BURCKHARDT J., CURRAN T., MÜLLER R., Expression of *c-fos* in NIH 3T3 cells is very low but inducible throughout the cell cycle, *EMBO J.*, **5**: 695-700, 1986.
- [24] BRAVO R., MÜLLER R., Involvement of proto-oncogenes in growth control: The induction of *c-fos* and *c-myc* by growth factors, [w:] *Oncogenes and Growth Control*, (red.: P. Kahn, T. Graf), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, s. 253-258, 1988.
- [24a] BRITO-BABAPULLE F., CATOVSKY D., GALTON D. A. G., Clinical and laboratory features of de novo acute myeloid leukaemia with trilineage myelodysplasia, *Br. J. Haematol.*, **66**: 445-450, 1987.
- [25] CALIGARIS-CAPPIO F., GOBBI M., BOFILL M., JANOSSY G., Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukaemia, *J. Exp. Med.*, **155**: 623-628, 1982.
- [26] CALIGARIS-CAPPIO F., PIZZOLO G., The significance of leukocyte phenotype: A report from the November Meeting of the British Society for Immunology, London, U. K., November 12-13, 1987. *Leukemia*, **2**: 249-250, 1988.
- [27] CAMPISI J., GRAY H. E., PARDEE A. B., DEAN M., SONENSHEIN G. E., Cell cycle control of *c-myc* and *c-ras* expression in lost following chemical transformation, *Cell*, **36**: 242-247, 1984.
- [28] CANAANI E., GALE R. P., STEINER-SALTZ D., BERREBI A., AGHAI E., JANUSZEWICZ E., Altered transcription of an oncogene in chronic myeloid leukaemia, *Lancet*, **1**: 593-594, 1984.
- [29] CHAN L. C., KARHI K. K., RAYTER S. I., HEISTERKAMP N., ERIDANI S., POWELS R., LAWLER S. D., GROFFEN J., FOULKES J. G., GREAVES M. F., WIEDEMANN L. M., A novel *abl* protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia, *Nature*, **325**: 635-637, 1987.
- [30] CHAN L. C., PEGRAM S. M., GREAVES M. F., Contribution of immunophenotype to the classification and differential diagnosis of acute leukaemia, *Lancet*, **1**: 475-479, 1985.

- [31] CHEN Z., LE PASIER D., DAUSSET J., DEGOS L., FLANDRIN G., COHEN D., SIGAUX F., Human T cell gamma genes are frequently rearranged in B-lineage acute lymphoblastic leukaemias but not in chronic B cell proliferations, *J. Exp. Med.*, **165**: 1000-1015, 1987.
- [32] CHENG G. Y., MINDEN M. D., TOYONAGA B., MAK T. W., MCCULLOCH E. A., T cell receptor and immunoglobulin gene rearrangements in acute myeloblastic leukaemia, *J. Exp., Med.*, **163**: 414-424, 1986.
- [33] CHIEN Y. H., IWASHIMA M., KAPLAN K. B., ELLIOTT J. F., DAVIS M. M., A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation, *Nature*, **327**: 677-682, 1987.
- [34] CIVIN C. I., BANQUERIGO M. L., STRAUSS L. C., LOKEN M. R., Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10 positive progenitor cells in normal human bone marrow, *Exp. Hematol.*, **15**: 10-17, 1987.
- [35] CIVIN C. I., STRAUSS L. C., BROVALL C., FACKLER M. J., SCHWARTZ J. F., SHAPER J. H., Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells, *J. Immunol.*, **133**: 157-165, 1984.
- [36] CLARK S. S., MCLAUGHLIN J., CRIST W. M., CHAMPLIN T. R., WITTE O. N., Unique forms of the **abl** tyrosine kinase distinguish Ph<sup>1</sup>-positive CML from Ph<sup>1</sup>-positive ALL, *Science*, **235**: 85-88, 1987.
- [37] CLEVELAND J. L., JANSEN H. W., BISTER K., FREDERICKSON T. N., MORSE M. C., IHLE J. N., RAPP U. R., Interaction between **raf** and **myc** oncogenes in transformation „in vivo” and „in vitro”, *J. Cell. Biochem.*, **30**: 195-218, 1986.
- [38] COCHRAN B. H., ZULLO J., VERMA I. M., STILES C. D., Expression of the **c-fos** oncogene and a newly discovered **r-fos** is stimulated by platelet-derived growth factor, *Science* **226**: 1080-1082, 1984.
- [39] COLLINS S. J., KUBONISHI I., MIOYOSHI I., GROUDINE M. T., Altered transcription of the **c-abl** oncogene in K 562 and other chronic myelogenous leukemia cells, *Science*, **225**: 72-74, 1984.
- [40] CROCE C. M., ISOBE M., PALUMBO A., PUCK J., MING J., TWEARDY D., ERIKSON J., DAVIS M., ROVERA G., Gene for gamma-chain of human T-cell receptor: Location on chromosome 14 region involved in T-cell neoplasm, *Science*, **227**: 1044-1047, 1985.
- [41] CURRAN T., MILLER D. A., ZOKAS L., VERMA I. M., Viral and cellular **fos** proteins: A comparative analysis, *Cell*, **36**: 259-268, 1984.
- [42] CURRAN T., TEICH N. M., Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: Characterization of a 55,000-Dalton phosphoprotein, *J. Virol.*, **42**: 114-122, 1982.
- [43] CURRAN T., TEICH N. M., Identification of a 39,000-Dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus, *Virology*, **116**: 221-235, 1982.
- [44] CURRAN T., VAN BEVEREN C., LING N., VERMA I. M., Viral and cellular **fos** proteins are complexed with a 39,000-Dalton cellular protein, *Mol. Cell Biol.*, **5**: 167-172, 1985.
- [45] DAVEY F. R., MICK R., NELSON D. A., MAC CALLUM J., SOBOL R. E., ROYSTON I., CUTTNER J., ELLISON R. R., BLOOMFIELD C. D., Morphologic and cytochemical characterization of adult leukemias with express myeloid antigen, *Leukemia*, **2**: 420-426, 1988.
- [46] DE BRAEKELEER M., SMITH B., LIN C. C., Fragile sites and structural rearrangements in cancer, *Human Genet.*, **69**: 112-116, 1985.
- [47] DE KLEIN A., GEURTS VAN KESSEL A., 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 myelocytic leukaemia, *Nature*, **300**: 765-767, 1982.
- [48] DE KLEIN A., HAGEMEIJER A., BARTRAM C. R., HOUWEN R., HOEFSLOOT L., CARBONELL F., CHAN L., BARNETT M., GREAVES M., KLEIHAUER E., HEISTERKAMP N., GROFFEN J., GROSVELD G., *bcr* rearrangement and translocations of the *c-abl* oncogene in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, **68**: 1369-1375, 1986.
- [49] DESIDERIO S. V., YANCOPOULOS G. D., PASKIND M., THOMAS E., BOSS M. A., LANDAU N., ALT F. W., BALTIMORE D., Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells, *Nature*, **311**: 752-755, 1984.
- [50] DE TAISNE C., GEGONNE A., STEHELIN D., BEMHEIM A., BERGER R., Chromosomal localization of the human proto-oncogene *c-ets*, *Nature*, **310**: 581-583, 1984.
- [51] DEWALD G. W., MORRISON-DeLAP S. J., SCHUCHARD K. A., SPURBECK J. L., PIERRE R. V., A possible specific chromosome marker for monocytic leukemia: Three more patients with t/9; 11//p22; q24/ and another with t/11; 17//q24; q21/, each with acute monoblastic leukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **8**: 203-212, 1983.
- [52] DIAZ M. O., LeBEAU M. M., PITHA P., ROWLEY J. D., Interferon and *c-ets-1* genes in the translocation /9; 11//p22; q23/ in human acute monocytic leukemia, *Science*, **231**: 265-267, 1986.
- [53] DREXLER H. G., MESSMORE H. L., MENON M., MINOWADA J., Incidence of TdT-positivity in cases of leukemia and lymphoma, *Acta Haematol.*, **75**: 12-17, 1986.
- [54] ERIKSON J., GRIFFIN C. A., AR-RUSHDI A., VALTIERI M., HOXIE J., FINAN J., EMANUEL B. S., ROVERA G., NOWELL P. C., CROCE C. M., Heterogeneity of chromosome 22 breakpoints in Philadelphia-positive (Ph<sup>+</sup>) acute lymphocytic leukemia, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **83**: 1807-1811, 1986.
- [55] FAINSTEIN E., MARCELLE C., ROSNER A., CANAANI E., GALE R. P., DREAZEN O., SMITH S. D., CROCE C. M., A new fused transcript in Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukaemia, *Nature*, **330**: 386-388, 1987.
- [56] FEARON E. R., BURKE P. J., SCHIFFER C. A., ZEHNBAUER B. A., VOGELSTEIN B., Differentiation of leukemia cells to polymorphonuclear leukocytes in patients with acute non lymphocytic leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **315**: 15-24, 1986.
- [57] FERRARI S., MARIANO M. T., TAGLIFICO E., SARTI M., CECCHERELLI G., SELLERI L., MERLI F., NARNI F., DONELLI A., TORELLI G., TORELLI U., Myeloperoxidase gene expression in blast cells with a lymphoid phenotype in cases of acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, **72**: 873-876, 1988.
- [58] FERRARIS A. M., RASKIND W. H., BJORNSON B. H., JACOBSON R. J., SINGER J. W., FIALKOW P. J., Heterogeneity of B cell involvement in acute nonlymphocytic leukemia, *Blood* **66**: 342-344, 1985.
- [58a] FIALKOW P. J., SINGER J. W., RASKIND W. H., ADAMSON J. W., JACOBSON R. J., BERNSTEIN I. D., DOW L. W., NAJFELD V., VEITH R., Clonal development, stem-cell differentiation and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **317**: 468-473, 1987.
- [59] FINKEL M. P., BISKIS B. O., Experimental induction of osteosarcomas, *Prog. Exp. Tumor Res.*, **10**: 73-111, 1968.
- [60] FINKEL M. P., BISKIS B. O., JINKINS P. B., Virus induction of osteosarcomas in mice, *Science* **151**: 698-701, 1966.
- [61] FINKEL M. P., REILLY C. A., BISKIS B. O., GRECO I. L., Bone tumor viruses, *Colston Pap.*, **24**: 353-366, 1973.



- [62] FITHIAN E., KUNG P. C., GOLDSTEIN G., RUBENFIELD M., FENOGLIA C., EDELSON R., Reactivity of Langerhan's cells with hybridoma antibody, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **78**: 2541-2594, 1981.
- [63] FOA R., CASORATI G., GIUBELLINO M. C., BASSO G., SCHIRO R., PIZZOLO G., LAURIA F., LE FRANC M. P., RABBITTS T. H., MIGONE N., Rearrangements of immunoglobulin and T cell receptor beta and gamma genes are associated with terminal deoxynucleotidyl transferase expression in acute myeloid leukaemia, *J. Exp. Med.*, **165**: 879-890, 1987.
- [64] FOOD K. A., TODD R. F. III., Immunologic classification of leukemia and lymphoma, *Blood*, **68**: 1-31, 1986.
- [65] Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia, 1982: Abnormalities of chromosome 16, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **11**: 310-313, 1984.
- [65a] FUJIWARA S., FISHER R. J., SETH A., BHAT N. K., SHOWALTER S. D., ZWEIG M., PAPAS T. S., Characterization and localization of the products of the human homologs of the *v-ets* oncogene, *Oncogene*, **2**: 99-103, 1988.
- [66] GALE R. P., BEN-BASSAT I., Annotation: Hybrid acute leukaemia, *Br. J. Haematol.*, **65**: 261-264, 1987.
- [67] GALE R. P., CANAANI E., An 8 kilobase *abl* RNA transcript in chronic myelogenous leukemia, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **81**: 5648-5652, 1984.
- [68] GASNER A., HEIL G., BÖHM T., BARTRAM C. R., RAGHAVACHAR A., CARBONELL F., HOELZER D., Human acute unclassified leukemia with unique t(4; 17/ chromosomal translocation expresses T lymphoid and myeloid surface antigens after "in vitro" culture, *Blood*, **69**: 271-277, 1987.
- [69] GONDA T. J., METCALF D., Expression of *myb*, *myc* and *fos* protooncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukaemia, *Nature* **310**: 249-251, 1984.
- [70] GOOHA R., BUNIN N., MIRRO J., MURPHY S. B., CROSS A. H., BEHM F. G., QUERTERMOUS T., SEIDMAN J., KITCHINGMAN G. R., Provocative pattern of rearrangements of the genes for gamma and beta chains of the T cell receptor in human leukaemias, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **84**: 4547-4551, 1987.
- [71] GOOI H. C., THORPE S. J., HOUNSELL E. F., RUMPOLD H., KRAFT D., FORSTER O., FEIZI T., Marker of peripheral blood granulocytes and monocytes of man recognized by two monoclonal antibodies VEP8 and VEP9 involves the trisaccharide 3-fucosyl-N-acetyllactosamine, *Europ. J. Immunol.*, **13**: 306-312, 1983.
- [72] GOYNS M. H., HAN I. M., STEWART J., GEGONNE A., BIRNIE C. D., The *c-est-1* proto-oncogene is rearranged in some cases of acute lymphoblastic leukaemia, *Br. J. Cancer*, **56**: 611-613, 1987.
- [73] GREAVES M. F., "Target" cells, cellular phenotype and lineage fidelity in human leukemia, *J. Cell. Physiol.*, **1** (suppl): 113-126, 1982.
- [74] GREAVES M. F., CHAN L. C., FURLEY A. J. W., MOLGAARD M. V., Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia, *Blood*, **67**: 1-11, 1986.
- [75] GREAVES M. F., FURLEY A. J. W., CHAN L. C., FORD A. M., MOLGAARD H. V., Inappropriate rearrangement of immunoglobulin and T-cell receptor genes, *Immunol. Today*, **8**: 115-116, 1987.
- [76] GREAVES M. F., HAIRIRI G., NEWMAN R. A., SUTHERLAND D. R., RITTER M. A., RITZ J., Selective expression of common acute lymphoblastic leukemia (gp100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts, *Blood*, **61**: 628-639, 1983.
- [77] GREAVES M. F., MIZUTANI S., FURLEY A. J. W., SUTHERLAND D. R., CHAN L. C., FORD A. M., MOLGAARD H. V., Differentiation-linked gene rearrangement and expression in acute lymphoblastic leukaemia, *Clin. Haemat.*, **15**: 621-639, 1986.
- [78] GREENBERG J. M., QUERTERMOUS T., SEIDMAN J. G., KERSEY J. H.,

- Human T cell gamma-chain gene rearrangements in acute lymphoid and non-lymphoid leukaemia: Comparison with the T cell receptor beta-chain gene, *J. Immunol.*, **137**: 2043–2049, 1986.
- [79] GREENBERG M. E., ZIFF E. B., Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene, *Nature*, **311**: 433–438, 1984.
- [80] GRIESSER H., CHAMPAGNE E., TKACHUK D., TAKIHARA Y., LALANDE M., BAILLIE E., MINDEN M., MAK T. W., The human T-cell receptor alpha delta locus: A physical map of the variable joining and constant region genes, *Eur. J. Immunol.*, **18**: 641–645, 1988.
- [81] GROFFEN J., STEPHENSON J. R., HEISTERKAMP N., DE KLEIN A., BARTRAM C. R., GROSVELD G., Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, *bcrl*, on chromosome 22, *Cell*, **36**: 93–99, 1984.
- [82] GROSVELD G., VERWOERD T., VAN AGTHOVEN T., DE KLEIN A., RAMACHANDRAN K. L., HEISTERKAMP N., STAM K., GROFFEN J., The chronic myelocytic cell line K 562 contains a breakpoint in *bcrl* and produces a chimeric *bcrl/c-abl* transcript, *Mol. Cell. Biol.*, **6**: 607–616, 1986.
- [83] HA K., MINDEN M., KOZUMI N., GELFAND E. W., Immunoglobulin mu chain gene rearrangement in acute myelogenous leukaemia, *Cancer Res.*, **44**: 4658–4663, 1984.
- [84] HAGEMEIJER A., HAHLEN K., SIZOO W., ABELS J., Translocation /9; 11//p21; q23/ in three cases of acute monoblastic leukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **5**: 95–105, 1982.
- [85] HARRIS A. W., PINKERT C. A., CRAWFORD M., LANGDON W. Y., BRINSTER R. L., ADAMS J. M., The E mi-*myc* transgenic mouse: A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells, *J. Exp. Med.*, **167**: 353–371, 1988.
- [86] HATA S., BRENNER M. B., KRANGEL M. S., Identification of putative human T-cell receptor delta complementary clones, *Science*, **238**: 678–682, 1987.
- [86a] HAYHOE F. G. J., Classification of acute leukaemias, *Blood Rev.*, **2**: 186–193, 1988.
- [87] HECHT F., Fragile sites, cancer chromosome breakpoints, and oncogenes all cluster in light G bands, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **31**: 17–24, 1988.
- [88] HECHT F., Editorial: The fragile site – Hypothesis of cancer, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **31**: 119–121, 1988.
- [89] HECHT F., Appendix C: Hematologic malignancy breakpoint update, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **31**: 132–141, 1988.
- [90] HECHT F., Appendix D: Oncogene location update, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **31**: 142–143, 1988.
- [91] HECHT F., SUTHERLAND G. R., Fragile sites and cancer breakpoints, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **12**: 179–181, 1984.
- [92] HEIM S., BÉKÁSSY A. N., GARWICZ S., HELDRUP J., WIEBE T., KRISTOFFERSON U., MANDAHL N., MITELMAN F., New structural rearrangements in congenital leukemia, *Leukemia*, **1**: 16–23, 1987.
- [93] HEIM S., MITELMAN F., Proliferation-specific and differentiation-associated chromosomal breakpoints in human neoplasia – a unifying model, *Hereditas*, **104**: 307–312, 1986.
- [94] HEIM S., MITELMAN F., Acute lymphoblastic leukemia, [w:] *Cancer Cytogenetics*, (red.: S. Heim, F. Mitelman), Alan R. Liss Inc., New York, s. 141–173, 1987.
- [95] HEISTERKAMP N., STAM K., GROFFEN J., DE KLEIN A., GROSVELD G., Structural organization of the *bcrl* gene and its role in the Ph<sup>1</sup> translocation, *Nature*, **315**: 758–761, 1985.
- [96] HERMANS A., GOW J., SELLERI L., VON LINDERN M., HAGEMEIJER A., WIEDEMANN L. M., GROSVELD G., *bcrl-abl* oncogene activation in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, **2**: 628–633, 1988.
- [97] HERMANS A., HEISTERKAMP N., VON LINDERN M., VAN BAAL S., MEIJER D.,

- VAN DER PLAS D., WIEDEMANN L. M., GROFFEN J., BOOTSMA D., GROSVELD G., Unique fusion of *bcr* and *c-abl* genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia, *Cell*, **51**: 33-40, 1987.
- [98] HOFFBRAND A. V., DREXLER H. G., GANESHAGURU K., PIGA A., WICK-REMASINGHE R. G., Biochemical aspects of acute leukaemia, *Clin. Haematol.*, **15**: 669-694, 1986.
- [99] HOFFBRAND A. V., GANESHAGURU H., LLEWELLIN P., JANOSSY G., Biochemical markers in leukaemia and lymphoma, [w:] *Strategies in Clinical Haematology*, (red.: R. Gross, K. P. Hellriegel), Springer Verlag, Berlin, s. 25-39, 1979.
- [100] HOFFBRAND A. V., LEBER B. F., BROWETT P. J., NORTON J. D., Mixed acute leukaemias, *Blood Rev.*, **2**: 9-15, 1988.
- [101] HOGGE D. E., MISAWA S., PARSAN N. Z., POLLAK A., TESTA J. R., Abnormalities of chromosome 16 in association with acute myelomonocytic leukemia and dysplastic marrow eosinophils, *J. Clin. Oncol.*, **2**: 550-557, 1984.
- [102] HUANG M. J., LI C. Y., NICHOLS W. L., YOUNG J. H., KATZMANN J. A., Acute leukemia with megakaryocytic differentiation: A study of 12 cases identified immunocytochemically, *Blood*, **64**: 427-439, 1984.
- [103] ISOBE M., ERIKSON J., EMANUEL B. S., NOWELL P. C., CROCE C. M., Location of gene for beta subunit of T-cell receptor at band 7q35, a region prone to rearrangement in T-cells, *Science*, **228**: 580-582, 1985.
- [104] ISOBE M., HUEBNER K., ERIKSON K., PETERSON R. C., BOLLUM F. J., CHANG L. M., CROCE C. M., Chromosome localization of the gene for human terminal deoxynucleotidyl-transferase to region 10q23-q25, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**: 5836-5840, 1985.
- [105] JAIN K., ARLIN Z., MERTELSMANN R., GEE T., KEMPIN S., KOZINER B., MIDDLETON A., JHANWAR S., CHANGANTI R., CLARKSON B., Philadelphia chromosome and terminal transferase-positive acute leukemia: Similarity of terminal phase of chronic myelogenous leukemia and "de novo" acute presentation, *J. Clin. Oncol.*, **1**: 669-676, 1983.
- [106] JAMES N., EVAN G., GULLICK W., SIKORA K., British Association of Cancer Research workshop on oncogene expression in human tumours. Corpus Christi College, Cambridge 3-4 September, 1987, *Br. J. Cancer*, **57**: 440-441, 1988.
- [107] JANEWAY C. A., *Frontiers of the immune system*, *Nature*, **333**: 804-806, 1988.
- [108] JANI P., VERBY W., GREAVES M. F., BEVAN D., BOLLUM F. J., Terminal deoxynucleotidyl transferase in acute myeloid leukemia, *Leuk. Res.*, **7**: 17-29, 1983.
- [109] JANOSSY G., CAMPANA D., BOLLUM F. J., Immunofluorescence studies in leukaemia diagnosis, [w:] *Monoclonal Antibodies*, (red. P. Beverley), Churchill-Livingstone, Edinburgh, s. 97-131, 1985.
- [109 a] JINNAI I., TOMONAGA M., KURIYAMA K., MATSUO T., NONAKA H., AMENOMORI T., YOSHIDA Y., KUSANO M., TAGAWA M., ICHIMARU M., Dysmegakaryocytopoiesis in acute leukaemias: Its predominance in myelomonocytic (M 4) leukaemia and implication for poor response to chemotherapy, *Br. J. Haematol.*, **66**: 467-472, 1987.
- [110] JUNEJA S., BROWN J., DING J. C., CARSON O. M., Trisomy 4 in acute nonlymphocytic leukemia: An Australian case, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **34**: 25-28, 1988.
- [111] KANEKO Y., MASEKI N., TAKASAKI N., SAKURAI M., HAYASHI Y., NAKAZAWA S., MORI T., SAKURAI M., TAKEDA T., SHIKANO T., HIYOSHI Y., Clinical and hematologic characteristics in acute leukemia with 11q23 translocations, *Blood*, **67**: 484-491, 1986.
- [112] KANEKO Y., SHIKANO T., MASEKI N., SAKURAI M., TAKEDA T., HIYOSHI Y., MIMAYA J., FUJIMOTO T., Clinical characteristics of infant acute leukemia with

- or without 11q23 translocations, *Leukemia*, **2**: 672–676, 1988.
- [113] KATZ F., MALCOLM S., GIBBONS B., TILLY R., LAM G., ROBERTSON M. E., CZEPULKOWSKI B., CHESSELS J., Cellular and molecular studies on infant null acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, **71**: 1438–1447, 1988.
- [114] KATZ F. E., TINDLE R., SUTHERLANDS D. R., GREAVES M. F., Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells, *Leuk. Res.*, **9**: 191–198, 1985.
- [115] KELLY K., COCHRAN B. H., STILES C. D., LEDER P., Cell-specific regulation of the *c-myc* gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor, *Cell*, **35**: 603–610, 1983.
- [116] KIRSCH I. R., MORTON C. C., NAKAHARA K., LEDER P., Immunoglobulin heavy chain genes map to a region of translocations in malignant lymphomas, *Science*, **216**: 301–303, 1982.
- [117] KLINKEN S. P., ALEXANDER W. S., ADAMS J. M., Hemopoietic lineage switch: *v-raf* oncogene converts E *mi-myc* transgenic B cells into macrophages, *Cell*, **53**: 857–867, 1988.
- [118] KLOETZER W. R., KURZROCK L., SMITH M., TALPAZ M., SPILLER J., GUTTERMAN J., ARLINGHAUS R., The human cellular *abl* gene product in the chronic myelogenous leukemia cell line K 562 has an associated tyrosine protein kinase activity, *Virology*, **140**: 230–238, 1985.
- [119] KNAPP W., MAJDIC O., BETTELHEIM P., LISZKA K., ABERER W., STINGAL G., Typing of leukemic cells with monoclonal antibodies, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **420**: 251–260, 1983.
- [120] KOCOVA M., KOWALCZYK J. R., SANBERG A. A., Translocation 4; 11 acute leukemia: Three case reports and review of the literature, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **16**: 21–32, 1985.
- [121] KOEFFLER P., Syndromes of acute nonlymphocytic leukemia, *Annals Intern. Med.*, **107**: 748–758, 1987.
- [122] KONOPKA J. B., WATANABE S. M., WITTE O. N., An alteration of the human *c-abl* protein in K 562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity, *Cell*, **37**: 1035–1042, 1984.
- [123] KONOPKA J. B., WITTE O. N., Detection of *c-abl* tyrosine kinase activity “in vitro” permits direct comparison of normal and altered *abl* gene products, *Mol. Cell. Biol.*, **5**: 3116–3123, 1985.
- [124] KORSMEYER S. J., ARNOLD A., BAKSHI A., RAVETCH J. V., SIEBENLIST U., HIETER P. A., SHARROW S. O., LE BIEN T. W., KERSEY J. H., POPLACK D. G., LEDER P., WALDMANN T. A., Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute lymphocytic leukemia of T cell and B cell precursor origins, *J. Clin. Invest.*, **71**: 301–313, 1983.
- [125] KRUIJER W., COOPER J. S., HUNTER T., VERMA I. M., Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the *c-fos* gene and protein, *Nature*, **312**: 711–716, 1984.
- [126] KURZROCK R., GUTTERMAN J. U., TALPAZ M., The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias, *N. Engl. J. Med.*, **319**: 990–998, 1988.
- [127] KURZROCK R., SHTALRID M., GUTTERMAN J. U., KOLLER C. A., WALTERS R., TRUJILLO J. M., TALPAZ M., Molecular analysis of chromosome 22 break-points in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia, *Br. J. Haematol.*, **67**: 55–59, 1987.
- [128] KURZROCK R., SHTALRID M., ROMERO P., KLOETZER W. S., TALPAS M., TRUJILLO J. M., BLICK M., BERAN M., GUTTERMAN J. U., A novel *c-abl* protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia, *Nature*, **325**: 631–635, 1987.

- [129] KURZROCK R., SHTALRID M., TALPAZ M., KLOETZER W. S., GUTTERMAN J. U., Expression of *c-abl* in Philadelphia-positive acute myelogenous leukemia, *Blood*, **70**: 1584–1588, 1987.
- [130] LANGDON W. Y., HARRIS A. W., CORY S., ADAMS J. M., The *c-myc* oncogene perturbs B lymphocyte development in E mi-*myc* transgenic mice, *Cell*, **47**: 11–18, 1986.
- [131] LEARY A. G., OGAWA M., STRAUSS L. C., CIVIN C. L., Single cell origin of multilineage colonies in culture: Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes, *J. Clin. Invest.*, **74**: 2193–2197, 1984.
- [132] LEARY A. G., STRAUSS L. C., CIVIN C. I., OGAWA M., Disparate differentiation in hematopoietic colonies derived from human paired progenitors, *Blood*, **66**: 327–332, 1985.
- [133] LEBEAU M. M., ROWLEY J. D., Chromosomal abnormalities in leukemia and lymphoma. Clinical and biological significance, [w:] *Advances in Human Genetics*, (red.: H. Harris, K. Hirschorn), Plenum Publ. Corp., **15**: 1–54, 1986.
- [134] LEE J., MEHTA K., BLICK M. B., GUTTERMAN J. U., LOPEZ-BERESTEIN G., Expression of *c-fos*, *c-myb* and *c-myc* in human monocytes: Correlation with monocytic differentiation, *Blood*, **69**: 1542–1545, 1987.
- [135] LEPRINCE D., GEGONNE A., COLL J., deTAISNE C., SCHNEEBERGER A., LAGROU C., STEHELIN D., A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E 26, *Nature*, **306**: 395–397, 1983.
- [136] LEVIN M. D., MICHAEL P. M., GARSON O. M., TIEDEMANN K., FIRKIN P. C., Clinicopathological characteristics of acute lymphoblastic leukemia with the 4; 11 chromosome translocation, *Pathology*, **16**: 63–66, 1984.
- [137] LOOK A. T., The emerging genetics of acute lymphoblastic leukemia: Clinical and biologic implications, *Semin. Oncol.*, **12**: 92–104, 1985.
- [138] LUDWIG W. D., BARTRAM C. R., RITTER J., RAGHAVACHAR A., HIDDEMANN W., HEIL G., HARBOTT J., SEIBT-JUNG H., TEICHMANN J. V., RIEHM H., Ambiguous phenotypes and genotypes in 16 children with acute leukemia as characterized by multiparameter analysis, *Blood*, **71**: 1518–1528, 1988.
- [139] MALCOLM S., BARTON P., MURPHY C., FERGUSON-SMITH M. A., BENTLEY D. L., RABBITS T. H., Localization of human immunoglobulin kappa light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by "in situ" hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 4957–4961, 1982.
- [140] MARIE J. P., IZAGUIRRE C. A., CIVIN C. I., MIRRO J., McCULLOCH E. A., The presence within single K 562 cells of erythropoietic and granulopoietic differentiation markers, *Blood*, **58**: 708–711, 1981.
- [141] MASON D. Y., GATTER K. C., The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology, *J. Clin. Pathol.*, **40**: 1042–1054, 1987.
- [142] MATSUO T., BENNETT J. M., Editorial: Acute leukemia of megakaryocyte lineage (M 7), *Cancer Genet. Cytogenet.*, **34**: 1–3, 1988.
- [143] MAVILIO F., TESTA U., SPOSI N. M., PETRINI M., PELOSI E., BORDIGNON C., AMADORI S., MANDELLI F., PESCHLE C., Selective expression of *fos* proto-oncogene in human acute myelomonocytic and monocytic leukemias: A molecular marker of terminal differentiation, *Blood*, **69**: 160–164, 1987.
- [144] McBRIDE O. W., HIETER P. A., KORSEMEYER S. J., WALDMANN T. A., Chromosomal localization of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes, *J. Exp. Med.*, **155**: 1480–1490, 1982.
- [145] McCULLOCH E. A., Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis, *Blood*, **62**: 1–13, 1983.
- [146] MECUCCI G., VAN ORSHOVEN A., TRICOT G., MICHAUX J. L., DELANNOY A.,

- VAN DEN BEGHE H., Trisomy 4 identifies a subset of acute non-lymphocytic leukemias (ANLL), *Blood*, **67**: 1328–1332, 1986.
- [147] MESSNER H. A., GRIFFIN J. D., Biology of acute myeloid leukemia, *Clin. Haematol.*, **15**: 641–667, 1986.
- [148] MILLS K. H. G., CAWLEY J. C., Stimulated lymphoid cells of B lineage, but not plasma or myeloid cells, can express E receptor, *Leuk. Res.*, **9**: 375–380, 1985.
- [149] MINDEN M. D., TOYONAGA B., HA K., YANAGI Y., CHU B., GELFAND E., MAK T. W., Somatic rearrangement of T cell antigen receptor genes in human T cell malignancies, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**: 1224–1227, 1985.
- [150] MIRRO J., KITCHINGMAN G., WILLIAMS D., LAUZON G. J., LIN C.-C., CALLIHAN T., ZIPF T. F., Clinical and laboratory characteristics of acute leukemia with the 4; 11 translocation, *Blood*, **67**: 689–697, 1986.
- [151] MIRRO J., ZIPF T. F., PUI C.-H., KITCHINGMAN G., WILLIAMS D., MELVIN S., MURPHY S. B., STASS S., Acute mixed lineage leukaemia: Clinicopathologic correlation and prognostic significance, *Blood*, **66**: 1115–1123, 1985.
- [152] MITCHELL R. L., HENNING-CHUBB C., HUBERMAN E., VERMA I. M., *c-fos* expression is neither sufficient nor obligatory for differentiation of monomyelocytes to macrophages, *Cell*, **45**: 497–504, 1986.
- [153] MITCHELL R. L., ZOKAS L., SCHREIBER R. D., VERMA I. M., Rapid induction of the expression of proto-oncogene *fos* during human monocytic differentiation, *Cell*, **20**: 209–217, 1985.
- [154] MIZUTANI S., FORD A. M., WIEDEMANN L. M., CHAN L. C., FURLEY A. J. W., GREAVES M. F., MOLGARD H. V., Rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes in human T cells shows preferential utilization of the D segment (DQ 52) nearest to the J region, *Europ. Molec. Biol. Organization J.*, **5**: 3467–3473, 1986.
- [155] MORRIS C. M., WHITHAM S. E., FITZGERALD P. H., Transposition of the oncogene *c-ets-1* in a t(11; 19)(q23; p13) cell line transient during clonal evolution of blast crisis chronic myeloid leukemia, *Leukemia*, **2**: 74–78, 1988.
- [156] MORTON C. C., DUBY A. D., EDDY R. L., SHOWS T. B., SEIDMAN J. G., Genes for beta chain of the human T-cell antigen receptor map to regions of chromosomal rearrangement in T cells, *Science*, **228**: 582–585, 1985.
- [157] MOSCOVICI C., SAMARUT J., GAZZOLO L., MOSCOVICI M. G., Myeloid and erythroid responses to avian defective leukemia viruses in chickens and in quail, *Virology*, **118**: 765–768, 1981.
- [158] MOSCOVICI M. G., JURDIC P., SAMARUT J., GAZZOLO L., MURA C. V., MOSCOVICI C., Characterization of the hemopoietic target cells for the avian leukemia virus E 26, *Virology*, **129**: 65–78, 1983.
- [159] MURRE C., WALDMANN R. A., MORTON C. C., BONGIOVANNI K. F., WALDMANN T. A., SHOWS T. A., SEIDMAN J. G., Human gamma-chain genes are rearranged in leukaemic T-cells and map to the short arm of chromosome 7, *Nature*, **316**: 549–552, 1985.
- [160] MÜLLER R., BRAVO R., BURCKHARDT J., CURRAN T., Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*, *Nature*, **312**: 716–720, 1984.
- [161] MÜLLER R., CURRAN T., MÜLLER D., GUILBERT L., Induction of *c-fos* during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation, *Nature*, **314**: 546–548, 1985.
- [162] MÜLLER R., MÜLLER D., GUILBERT L., Differential expression of *c-fos* in hematopoietic cells: Correlation with differentiation of monomyelocytic cells “in vitro”, *EMBO J.*, **3**: 1887–1890, 1984.
- [163] NADLER L. M., KORSMEYER S. J., ANDERSON K. C., BOYD A. W., SLAUGHENHOUPHT B., PARK E., JENSEN J., CORAL F., MAYER R. J., SALLAN S. E.,

- RITZ J., SCHLOSSMAN S. F., B cell origin on non-T cell acute lymphoblastic leukemia, *J. Clin. Invest.*, **74**: 332-340, 1984.
- [164] NAGASAKA M., MAEDA S., MAEDA H., CHEN H.-L., KITA K., MABUCHI O., MISU H., MATSUO T., SUGIYAMA T., Four cases of t/4; 11/ acute leukemia and its myelomonocytic nature in infants, *Blood*, **61**: 1174-1181, 1983.
- [165] NORTON J. D., CAMPANA D., HOFFBRAND A. V., JANOSSY G., COUSTAN-SMITH E., JANI H., YAXLEY J. C., PRENTICE H. G., Rearrangement of immunoglobulin and T cell antigen receptor genes in acute myeloid leukaemia with lymphoid associated markers. *Leukemia*, **1**: 757-761, 1987.
- [166] NUNN M. F., SEEBURG P. H., MOSCOVICI C., DUESBERG P. H., Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E 26 transforming gene, *Nature*, **306**, 391-395, 1983.
- [167] NUSS R., KITCHINGMAN G., CROSS A., ZIPF T. F., ANTOUN G. R., BERNSTEIN I., BEHM F., PULLEN D. J., CRIST W., MIRRO J. Jr., GOORHA R., T cell receptor gene rearrangements in B-precursor acute lymphoblastic leukemia correlate with age and the stage of B cell differentiation, *Leukemia* **2**: 722-727, 1988.
- [167 a] OHYASHIKI K., OHYASHIKI J. H., NOMURA K., RYAN D. H., KINNIBURGH A. J., SANDBERG A. A., Hu-ets-1 gene in congenital leukemia with t/11; 19//q23; p13/, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **30**: 233-238, 1988.
- [168] OKABE M., MATSUHIMA S., MORIOKA M., KOBAYASHI M., ABE S., SAKURADA K., KAKINUMA M., MIYAZAKI T., Establishment and characterization of a cell line, TOM-1, derived from a patient with Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia, *Blood*, **69**: 990-998, 1987.
- [169] PAIETTA E., PAPENHAUSEN P., AZAR C., WIERNIK P. H., SPIELVOGEL A., inv/16/ occurring in a case of acute biphenotypic leukemia lacking monocytic markers: Multiple but short remission, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **25**: 367-368, 1987.
- [170] PALLESEN G., PLESNER T., The Third International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens with an up-to-date overview of the CD nomenclature, *Leukemia*, **1**: 231-234, 1987.
- [171] PARKIN J. L., ARTHUR D. C., ABRAMSON C. S., McKENNA R. W., KERSEY J. H., HEIDEMAN R. L., BRUNNING D. R., Acute leukemia associated with the t/4; 11/ chromosome rearrangement. Ultrastructural and immunologic characteristics, *Blood*, **60**: 1321-1331, 1982.
- [171 a] PAUDA R. A., Oncogene activation and function. Modern Trends in Human Leukemia VII. June 16-23, 1988, Hamburg/Wilsede, *Leukemia*, **2**: 821-823, 1988.
- [172] PELICCI P. G., KNOWLES D. M., DALLA-FAVERA R., Lymphoid tumours displaying rearrangements of both immunoglobulin and T cell receptor genes, *J. Exp. Med.*, **162**: 1015-1024, 1985.
- [173] PIERCE J. H., EVA A., AARONSON S. A., Interactions of oncogenes with haematopoietic cells, *Clin. Haematol.*, **15**: 573-596, 1986.
- [174] PINTO A., COLLETTA G., DEL VECCHIO L., ROSATI R., ATTADIA V., CIMINO R., COLOMBATTI A., c-fos oncogene expression in human hematopoietic malignancies is restricted to acute leukemias with monocytic phenotype and to subsets of B cell leukemias, *Blood*, **70**: 1450-1457, 1987.
- [175] PITTALUGA S., RAFFELD M., LIPFORD E. H., COSSMAN J., 3A1 (CD 7) expression precedes T-beta gene rearrangements in precursor T (lymphoblastic) neoplasms, *Blood*, **68**: 134-139, 1986.
- [176] PITTALUGA S., UPPENKAMP M., COSSMAN J., Development of T3/T-cell receptor gene expression in human pre-T neoplasms, *Blood*, **69**: 1062-1067, 1987.
- [177] PRIEST J. R., ROBINSON L. L., McKENNA R. W., LINDQUIST L. L., WARKEN-

- TIN P. I., LeBIEN T. W., WOODS W. G., KERSEY J. H., COCCIA P. F., NESBIT M. E., Jr., Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, **56**: 15–22, 1980.
- [178] PRIETO F., BADIA L., ORTS M. A., DIEGUEZ L., AMIGO V., Trisomy 4: Another specific anomaly in acute nonlymphocytic leukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **26**: 171–173, 1987.
- [179] PUI C. H., DAHL G. V., MELVIN S., WILLIAMS D. L., PEIPER S., MIRRO J., MURPHY S. B., STASS S., Acute leukaemia with mixed lymphoid and myeloid phenotype, *Br. J. Haematol.*, **56**: 121–130, 1984.
- [180] RABBITS T. H., Human antibody and T-cell receptor genes: Rearrangement in normal and abnormal cells, [w:] *Genetic Rearrangements in Leukaemia and Lymphoma*, (red. J. M., Goldman, D. G. Harnden), Churchill Livingstone, Edinburgh, s. 110–116, 1986.
- [181] RABBITS T. H., STINSON A., FORSTER A., FORONI L., LUZZATTO L., SMITH C. I. E., JONES D., KARPAS A., MINOWADA J., TAYLOR A. M. R., Heterogeneity of T cell receptor beta chain rearrangements in human leukemias and lymphomas, *Europ. Molec. Biol. Organisation J.*, **4**: 2217–2224, 1985.
- [182] RADKE K., BEUG H., KORNFELD S., GRAF T., Transformation of both erythroid and myeloid cells by E 26, an avian leukemia virus that contains the *myb* gene, *Cell*, **31**: 643–653, 1982.
- [183] RODENHUIS S., SMETS L. A., SLATER R. M., BEHRENDT H., VEERMAN A. J. P., Distinguishing the Philadelphia chromosome of acute lymphoblastic leukemia from its counterpart in chronic myelogenous leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **313**: 51–52, 1985.
- [184] ROVIGATTI U., MIRRO J., KITCHINGMAN G., DAHL G., OCHS J., MURPHY S., STASS S., Heavy chain immunoglobulin gene rearrangement in acute non lymphocytic leukemia, *Blood*, **63**: 1023–1027, 1984.
- [185] ROVIGATTI U., WATSON D. K., YUNIS J. J., Amplification and rearrangement of *Hu-ets-1* in leukemia and lymphoma with involvement of 11q23, *Science*, **232**: 398–400, 1986.
- [186] ROWLEY J. D., A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining, *Nature*, **243**, 290–293, 1973.
- [187] ROWLEY J. D.,  $Ph^1$ -positive leukaemia, including chronic myelogenous leukaemia, *Clin. Haematol.* **9**: 55–86, 1980.
- [188] ROWLEY J. D., Consistent chromosome abnormalities in human leukemia and lymphoma, *Cancer Invest.*, **1**: 267–280, 1983.
- [189] RUPNIEWSKA Z. M., ROŻYŃKOWA D., KOWAL M., Czy można uznać chromosom  $Ph^1$  za marker nowotworowej wieloważnej limfo-hemopoetycznej komórki pnia?, *Postępy Hig. Med. Doświadczalnej*, **38**: 39–60, 1984.
- [189 a] SACCHI N., NALBANTOGLU J., SERGOVICH F. R., PAPAS T. S., Human *ets-2* gene on chromosome 21 is not rearranged in Alzheimer disease, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **85**: 7675–7679, 1988.
- [190] SACCHI N., WATSON D. K., GUÉRTS VAN KESSEL A. H. M., HAGEMEIJER A., KERSEY J., DRABKIN H. D., PATTERSON D., PAPAS T. S., *Hu-ets-1* and *Hu-ets-2* genes are transposed in acute leukemias with /4; 11/ and /8; 21/ translocations, *Science*, **231**: 379–382, 1986.
- [191] SANDBERG A. A., *The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia*, Elsevier/North Holland, Amsterdam, s. 22–341, 1980.
- [192] SANDBERG A. A., MORGAN R., JANI SAIT S. N., BERGER R., FLANDRIN G., SHRIER S., HECHT F., Trisomy 4: An entity within acute nonlymphocytic leukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **26**: 117–125, 1987.



- [193] SANDBERG A. A., VAN DEN BERGHE H., HECHT F., Trisomy 4 in hematologic disorders, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **26**: 175, 1987.
- [194] SANGSTER R. N., MINOWADA J., SUCIO-FUCA N., MINDEN M., MAK T. W., Rearrangement and expression of the alpha, beta and gamma chain T cell receptor genes in human thymic leukaemia cells and functional T cells, *J. Exp. Med.*, **163**: 1491–1508, 1986.
- [195] SCHAEFER-REGO K., ARLIN Z., SHAPIRO L. G., MEARS J. G., LEIBOWITZ D., Molecular heterogeneity of adult Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia, *Cancer Res.*, **48**: 866–869, 1988.
- [196] SEREMETIS S. V., PELICCI P. G., TABILIO A., UBRACIO A., GRIGNANI F., CUTTNER J., WINCHESTER R. J., KNOWLES D. M., DALLA FAVERA R., High frequency of clonal immunoglobulin or T cell receptor gene rearrangements in acute myelogenous leukaemia expressing terminal deoxynucleotidyl transferase, *J. Exp. Med.*, **165**: 1703–1712, 1987.
- [197] SHTIVELMAN E., LIFSHITZ B., GALE R. P., CANAANI E., Fused transcript of *abl* and *bcr* genes in chronic myelogenous leukaemia, *Nature*, **315**: 550–554, 1985.
- [198] SMITH L. J., CURTIS J. E., MESSNER H. A., SENN J. S., FURTHMAYR H., McCULLOCH E. A., Lineage infidelity in acute leukemia, *Blood*, **61**: 1138–1145, 1983.
- [199] SOBOL R. E., MICK R., ROYSTON I., DAVEY F. R., ELLISON R. R., NEWMAN R., CUTTNER J., GRIFFIN J. D., COLLINS H., NELSON D. A., BLOOMFIELD C. D., Clinical importance of myeloid antigen expression in adult acute Lymphoblastic leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **316**: 1111–1117, 1987.
- [200] STASS S. A., MIRRO J. Jr., Lineage heterogeneity in acute leukaemia: Acute mixed lineage leukaemia and lineage switch, *Clin. Haematol.*, **15**: 811–827, 1986.
- [201] STILES C. D., CAPONE G. T., SCHER C. D., ANTONIADES N. N., VAN WIJK J. J., PLEDGER W. J., Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **76**: 1279–1283, 1979.
- [202] STRAUSS L. C., ROSELY S. D., LaRUSSA V. F., SHARKIS S. J., STUART R. K., CIVIN C. I., Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My 10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells, *Exp. Hematol.*, **14**: 878–886, 1986.
- [203] STONG R. C., KORSMEYER S. J., PARKIN J. L., ARTHUR D. C., KERSEY J. H., Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal rearrangement exhibit B lineage and monocytic characteristics, *Blood*, **65**: 21–31, 1985.
- [204] SUCIU S., WEH H.-J., KUSE R., MEIER C. B., HOSSFELD D. K., Trisomy 4 in two cases of acute myelomonocytic leukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **33**: 19–23, 1988.
- [205] SUTHERLAND G. R., Heritable fragile sites on human chromosomes. I. Factors affecting expression in lymphocyte culture, *Am. J. Human. Genet.*, **31**: 125–135, 1979.
- [205 a] SUTHERLAND G. R., Heritable fragile sites on human chromosomes. II. Distribution, phenotypic effects, and cytogenetics, *Am. J. Hum. Genet.*, **31**: 136–148, 1979.
- [206] SUTHERLAND G. R., Editorial: Fragile sites and cancer breakpoints — The pessimistic view, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **31**: 5–7, 1988.
- [207] SUTHERLAND G. R., SIMMERS R. N., No statistical association between common fragile sites and nonrandom chromosome breakpoints in cancer cells, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **31**: 9–15, 1988.
- [207 a] SWIRSKY D. M., de BASTOS M., PARISH S. E., REES J. K. H., HAYHOE F. G. J., Features affecting outcome during remission induction of acute myeloid leukaemia in 619 adult patients, *Br. J. Haematol.*, **64**: 435–453, 1986.
- [208] SYMONDS G., KLEMPNAUER K.-H., EVAN G., BISHOP J. M., Induced differentiation of avian myeloblastosis virus-transformed myeloblasts: Phenotypic alteration without altered expression of the viral oncogene, *Molec. Cell. Biol.*, **4**: 2587–2593, 1984.

- [209] TAKIBARA Y., CHAMPAGNE E., GRIESSER H., KIMURA N., TKACHUK D., REIMANN J., OKADA A., ALT F. W., CHESS L., MINDEN M., MAK T. W., Sequence and organization of the human T-cell delta chain-gene, *Eur. J. Immunol.*, **18**: 283–289, 1988.
- [210] TAWA A., HOZUMI N., MINDEN M., MAK T. W., GELFAND E. W., Rearrangement of the T cell receptor beta chain gene in non-T-cell, non-B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood, *N. Engl. J. Med.*, **313**: 1033–1037, 1985.
- [211] The Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia, Chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia: Structural and numerical changes in 234 cases, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **4**: 95–142, 1981.
- [212] The Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia, A prospective study of acute nonlymphocytic leukemia, Chicago, Illinois, September 2–7, 1982, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **11**: 49–54, 1984.
- [213] TINDLE R. W., NICHOLS R. A. B., CHAN L. C., COMPANA D., BIRNIE G., A novel monoclonal antibody BI.3C5 recognizes myeloblasts and non B, non T lymphoblasts in acute leukemias and CGL blast crisis and reacts with immature cells in normal bone marrow, *Leuk. Res.*, **9**: 1–10, 1984.
- [214] TURC-CAREL C., PHILIP I., BERGER M.-P., PHILIP T., LENOIR G. M., Chromosomal translocations in Ewing's sarcoma, *N. Engl. J. Med.*, **309**: 497–498, 1983.
- [215] VAN DEN BERGHE H., Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemias, Report of the Workshop held in Leuven, Belgium, April 22–23, 1985, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **23**: 198–197, 1986.
- [215a] VAN DEN BERGHE H., Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias, Report of the Workshop held in Leuven, Belgium, on 15–17 September, 1986, *Br. J. Haematol.*, **68**: 487–494, 1988.
- [216] VAN DONGEN J. J. M., HOOJKAAS H., COMANS-BITTER M., HAHLEN K., DE KLEIN A., VAN ZANEN G. E., VAN'T VEER M. B., ABELS J., BENNER R., Human bone marrow cells positive for terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), HLA-DR and a T cell marker may represent prothymocytes, *J. Immunol.*, **135**: 3144–3150, 1985.
- [217] VAN DONGEN J. J. M., QUETERMOUS T., BARTRAM C. R., GOLD D. P., WOLVERS-TETTERO I. L. M., HOOJKAAS H., COMANS-BITTER W. M., HOOJKAAS H., ADRIAANSEN H. J., DE KLEIN A., RAGHAVACHER A., GANSER A., DUBY A. D., SEIDMAN J. G., VAN DER ELSEN P., TERHORST C., T cell receptor CD 3 complex during early T cell differentiation. Analysis of immature T cell acute lymphoblastic leukaemias (T-ALL) at DNA, RNA and cell membrane level, *J. Immunol.*, **138**: 1260–1269, 1987.
- [218] VAUGHAN W. P., CIVIN C. I., WEISENBURGER D. D., KARP J. E., GRAHAM M. L., SANGER W. G., GRIERSON H. L., JOSHI S. S., BURKE P. J., Acute leukemia expressing the normal human hematopoietic stem cell membrane glycoprotein CD 34 (MY 10), *Leukemia*, **2**: 661–666, 1988.
- [219] VODINELICH L., TAX W., BAI Y., PEGRAM S., CAPEL P., GREAVES M. F., A monoclonal antibody (WTI) for detecting leukemias of T cell precursors, *Blood*, **62**: 1108–1113, 1983.
- [220] WANG J. Y. J., LEDLEY F., GOFF S., LEE R., GRONER Y., BALTIMORE D., The mouse *c-abl* locus: Molecular cloning and characterization, *Cell*, **36**: 349–356, 1984.
- [221] WALDMANN T. A., DAVIES M. M., BORIGIOVANNI K. F., KORSMEYER S. J., Rearrangements of genes for the antigen receptor on T cells as markers of lineage and clonality in human lymphoid neoplasms, *N. Engl. J. Med.*, **313**: 776–783, 1985.
- [222] WALKER L. C., GANESAN T. S., DHUT S., GIBBONS B., LISTER T. A., ROTHBARD J., YOUNG B. D., Novel chimaeric protein expressed in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia, *Nature*, **329**: 851–853, 1987.

- [223] WATSON D. K., McWILLIAMS-SMITH M. J., NUNN M. F., DUESBERG P. H., O'BRIEN S. J., PAPAS T. S., The *ets* sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E 26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: Both loci are transcriptionally active, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**: 7294-7298, 1985.
- [223 a] WATSON D. K., McWILLIAMS M. J., LAPIS P., LAUTENBERGER J. A., SCHWEINFEST C. W., PAPAS T. S., Mammalian *ets-1* and *ets-2* genes encode highly conserved proteins, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **85**: 7862-7866, 1988.
- [224] WATT S. M., KARHI K., CATTER K., FURLEY A. J. W., KATZ F. E., HEALY L. E., ALTASS L. J., SUTHERLAND D. R., LEVINKSY R., GREAVES M. F., Distribution and epitope analysis of the cell membrane glycoprotein (HPCA-1) associated with human hemopoietic progenitor cells, *Leukemia*, **1**: 417-426, 1987.
- [225] WESTIN E. H., WONG-STAAAL F., GELMAN E. P., DALLA-FAVERA R., PAPAS T., LAUTENBERGER J. A., EVA A., REDDY E. P., TRONICK S. R., AARONSON S. A., GALLO R. C., Expression of cellular homologue of retroviral oncogenes in human hematopoietic cells, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **79**: 2490-2494, 1982.
- [226] WOOD G. S., WARNER N. L., WARNKE R. A., Anti-Leu3/T4 antibodies react with cells on monocyte/macrophage and Langerhans lineage, *J. Immunol.*, **131**: 212-216, 1983.
- [227] YANCOPOULOS G. D., BACKWELL T. K., SUH H., HUOD L., ALT F. W., Introduced T cell receptor variable region segments recombine in pre-B cells: Evidence that B and T cells use a common recombinase, *Cell*, **44**: 251-259, 1986.
- [228] YUNIS J. J., The chromosomal basis of human neoplasia, *Science*, **221**: 227-236, 1983.
- [229] YUNIS J. J., Recurrent chromosomal defects are found in most patients with acute non-lymphocytic leukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **11**, 125-127, 1984.
- [229 a] YUNIS J. J., BRUNNING R. D., Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute leukaemias and myelodysplastic syndromes, *Clin. Haematol.*, **15**: 597-620, 1986.
- [230] YUNIS J. J., BRUNNING R. D., HOWE R. B., LOBELL M., High-resolution chromosomes as an independent prognostic indicator in adult acute nonlymphocytic leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **311**: 812-818, 1984.
- [231] YUNIS J. J., SORENG A. L., Constitutive fragile sites and cancer, *Science*, **226**: 1199-1204, 1984.
- [232] YUNIS J. J., SORENG L., BOWE A. E., Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogenes, *Oncogene*, **1**: 59-69, 1987.

*Otrzymano: 6 marca 1989.*

*Przyjęto: 23 kwietnia 1989.*

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



## POWSTAWANIE MELANOSOMÓW W KOMÓRKACH BARWNIKOWYCH ORAZ ICH UDZIAŁ W BIOSYNTEZIE MELANINY U SSAKÓW

### THE FORMATION OF MELANOSOMES WITHIN PIGMENT CELLS AND THEIR PARTICIPATION IN MELANIN SYNTHESIS IN MAMMALS

Małgorzata PORĘBSKA-BUDNY

Katedra Biochemii i Biofizyki, Śląska Akademia Medyczna

*Streszczenie.* U ssaków pigmentacja skóry i włosów jest spowodowana powstawaniem melanosomów wewnątrz komórek barwnikowych (melanocytów) oraz ich transportem i modyfikacją w obrębie keratynocytów. W pracy przedstawiono współczesne poglądy na udział melanosomów w biosyntezie barwników melaninowych.

*Summary.* In mammals, pigmentation of the skin and hair is brought about by the formation of melanosomes within pigment cells (melanocytes) and their transport and modification within keratinocytes. The article presents the contemporary views on the participation of melanosomes in melanin pigment biosynthesis.

#### I. WSTĘP

Melanosomy są organellami komórkowymi, wyspecjalizowanymi w biosyntezie melaniny, znajdującymi się w cytoplazmie komórek barwnikowych [18, 27, 55]. Komórki barwnikowe, czyli melanocyty, występują u ssaków w warstwie podstawnej naskórka, w mieszkach włosowych, w oponach miękkich mózgu, a także w naczyniówce i tęczówce oka. Melanocyty znajdują się wprawdzie w warstwie podstawnej naskórka, ale nigdy nie są połączone z sąsiednimi komórkami za pomocą desmosomów. Są to komórki rozgałęzione, których długie wypustki sięgają aż do warstwy ziarnistej [30]. Melanocyty są pochodzenia ektodermalnego. Komórką macierzystą każdego melanocytu jest melanoblast, który wyodrębnia się w grzebieniu nerwowym i w warstwie zewnętrznej kubka wzrokowego. W czasie życia płodowego, melanoblasty przemieszczają się do skóry, ośrodkowego układu nerwowego

(głównie do opon miękkich) i oka. W tych miejscach ulegają one poprzez podziały komórkowe przekształceniu w melanocyty. U człowieka pierwsze melanoblasty pojawiają się w skórze w dziesiątym tygodniu życia płodowego. Liczba melanocytów występujących w jednostce powierzchni skóry jest podobna u różnych ras ludzkich i wynosi ok. 1200 komórek/mm<sup>2</sup>. Różnice dotyczą aktywności melanocytów w tworzeniu barwników melaninowych i są uwarunkowane genetycznie [30].

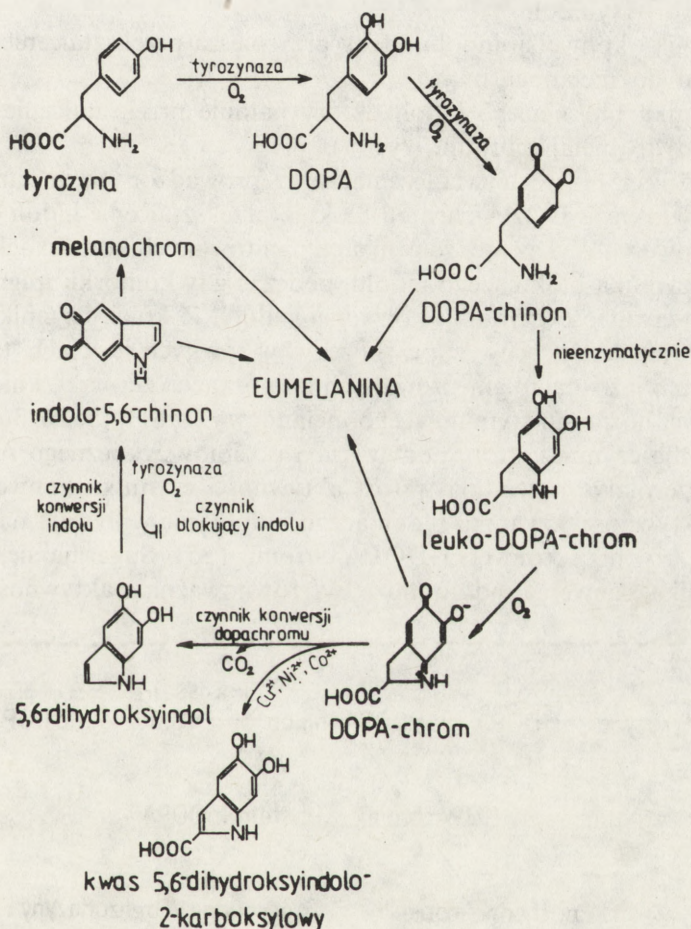
W niniejszym opracowaniu przedstawiono współczesne poglądy na powstawanie melanosomów w melanocytach naskórka i mieszków włosowych oraz na udział melanosomów w biosyntezie melanin u ssaków.

## II. UDZIAŁ MELANOSOMÓW W BIOSYNTEZIE MELANINY U SSAKÓW

Pojedynczy melanosom składa się z czterech zasadniczych układów biochemicznych: melaniny, białek strukturalnych matriks, enzymu tyrozynazy oraz fosfolipidów [14]. Dojrzałe melanosomy w naskórku Europejczyków o jasnej pigmentacji mają długość 600–700 nm, podczas gdy u osobników rasy czarnej 700–1300 nm [18], i są one całkowicie zmelanizowanymi organellami mniej lub bardziej gęstymi elektronowo, w których aktywność tyrozynazy jest zwykle już niewykrywalna. W przeciwieństwie do nich, premelanosomy są substrukturami komórkowymi, w których można wyróżnić wszystkie etapy genezy melanosomów, poprzedzające stadium pełnej dojrzałości. Premelanosomy charakteryzują się zmienną gęstością elektronową oraz zawartością aktywnej tyrozynazy [23].

Tyrozynaza (EC 1.14.18.1, oksydoreduktaza; monafenol, o-difenol: O<sub>2</sub>) jest głównym enzymem biorącym udział w biosyntezie brązowoczarnej eumelaniny i żółtoczerwonej feomelaniny u ssaków [37]. Z tkanek czerniaka złośliwego ssaków wyizolowano cztery izomery tyrozynazy T1, T2, T3 i T4, które są potranslacyjnymi modyfikacjami cząsteczki enzymu [4]. T3-tyrozynaza (m. cz. 56 000–62 000) jest izoenzymem prekursorowym w odniesieniu do T1- i T4-tyrozynazy. T1-tyrozynaza (m. cz. 65 000–81 000) powstaje przez przyłączenie kwasu sialowego i cukrów obojętnych (mannoza, galaktoza, fukoza) do T3-tyrozynazy. Z kolei, T4-tyrozynaza (m. cz. 102 000) powstaje przez zespolenie T1-tyrozynazy ze składnikami błony melanosomu. Izoenzym T2 jest prawdopodobnie artefaktem powstającym przez dezamidację T3-tyrozynazy w warunkach elektroforezy [4, 37, 52]. Budowa łańcuchów cukrowych tyrozynazy wyizolowanej z upigmentowanych tkanek ssaków została stosunkowo dobrze poznana. Dla przykładu, tyrozynaza wyizolowana z czerniaka chomika zawiera 4 łańcuchy cukrowe przyłączone do łańcucha polipeptydowego enzymu poprzez cząsteczkę asparaginy. Jeden z nich jest łańcuchem typu wysokomannozowego [Man<sub>3~5</sub> GluNAc<sub>2</sub>], a trzy pozostałe są łańcuchami typu złożonego [Man<sub>3</sub>·GluNAc β1→4/± Fuk α1→6/] [29].

Tyrozynaza katalizuje dwie ważne reakcje w szlaku Rapera-Masona, prowadzącym do powstawania polimeru eumelaniny: hydroksylację tyrozyny do dihydroksyfenyloalaniny (DOPA) i utlenianie DOPA do DOPA-chinonu [24, 42]. Powstały DOPA-chinon zostaje przekształcony, poprzez leuko-DOPA-chrom, DOPA-chrom, 5,6-dihydroksyindol (kwas 5,6-dihydroksyindolo-2-karboksylowy), indolo-5,6-chinon i melanochrom, w polimer eumelaniny (ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat melanogenezy wg Rapera i Masona

Badania nad tyrozynazą wyizolowaną i oczyszczoną z czerniaka oraz skóry brązowej myszy ujawniły, że tyrozynaza ma zdolność katalizowania również trzeciej reakcji w melanogenezie u ssaków, a mianowicie przekształcenia 5,6-dihydroksyindolu do melanochromu [21]. Reakcja ta wymaga obecności DOPA jako kofaktora i jest hamowana przez tyrozynę. Odwrotnie, 5,6-di-

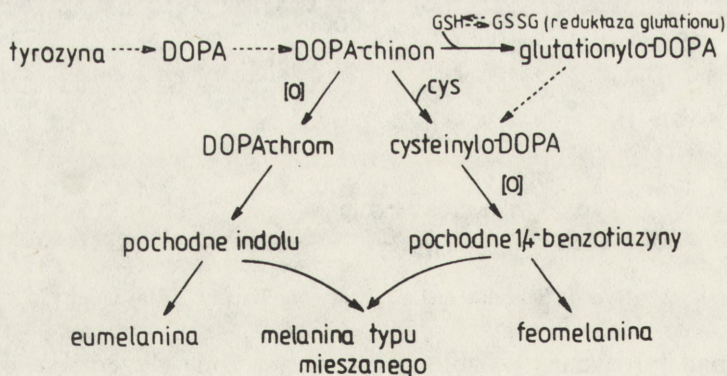
hydroksyindol hamuje hydroksylację tyrozyny do DOPA, tak że względne stężenia tyrozyny i 5,6-dihydroksyindolu w melanocycie ssaków są zdolne do regulacji melanogenezy. Badania Pawelka i wsp. [36] nad mechanizmami regulacji melanogenezy pozwoliły na zidentyfikowanie w melanosomach trzech czynników:

1. czynnika konwersji DOPA-chromu, określanego również jako oksydoreduktaza DOPA-chromu, który przyspiesza przekształcenie DOPA-chromu do 5,6-dihydroksyindolu,

2. czynnika konwersji indolu, który przyspiesza przekształcenie 5,6-dihydroksyindolu do melanochromu,

3. czynnika blokującego indolu, który hamuje przekształcenie 5,6-dihydroksyindolu do melanochromu (ryc. 1).

Barber i wsp. [1] w doświadczeniach przeprowadzonych *in vitro* ujawnili, że oksydoreduktaza DOPA-chromu blokuje przekształcenie indoli do polimeru melaninowego. Wykazano, że w nieupigmentowanych komórkach czerniaka jest dużo czynnika blokującego indolu, podczas gdy komórki upigmentowane mają dużą zawartość czynnika konwersji indolu. Z kolei, czynnik konwersji DOPA-chromu jest obecny, w przybliżeniu w równych ilościach, tak w upigmentowanych jak i nieupigmentowanych komórkach czerniaka i nie pozostaje pod kontrolą hormonu stymulującego melanocyty (MSH) [5, 26, 36]. Melanotropina i inne czynniki, które podwyższają poziomy cyklicznego AMP w komórkach czerniaka, powodują wzrost aktywności czynnika konwersji indolu i spadek aktywności czynnika blokującego indolu, nie wpływają natomiast na aktywność czynnika konwersji DOPA-chromu [35]. Sugeruje się, że aktywność czynnika konwersji indolu może być równoważna z aktywnością tyrozynazy.



Ryc. 2. Główne szlaki metaboliczne prowadzące do powstawania eumelaniny i feomelaniny w melanocycie ssaków, wg [38], zmodyfikowane. ---> przemiany enzymatyczne; → przemiany zachodzące spontanicznie lub bez udziału enzymu; GSH — zredukowany glutation; GSSG — utleniony glutation; cys — cysteina

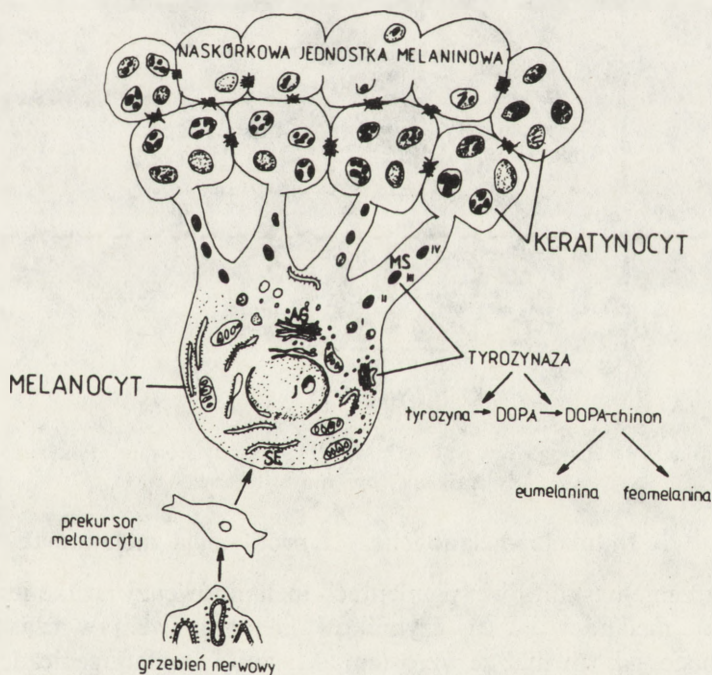


Palumbo i wsp. [31, 32] wykazali, że jony metali ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ), obecne w dużych ilościach w tkankach melanogenicznych, katalizują przekształcenie DOPA-chromu w większym stopniu do kwasu 5,6-dihydroksyindolo-2-karboksyowego niż do 5,6-dihydroksyindolu.

Czynnikiem łączącym przemiany eumelaniny ze szlakiem feomelaniny jest obecność w melanocytach cysteiny, zawierającej reaktywną grupę SH, która łączy się z DOPA-chinonem w reakcji nieenzymatycznej, dając addycyjny związek cysteinylo-DOPA [39, 40]. Dalsze przekształcenia tego związku prowadzą do powstania pochodnych 1,4-benzotiazyny, które są bezpośrednimi prekursorami feomelaniny. Na ryc. 2 przedstawiono główne szlaki metaboliczne prowadzące do powstania eumelaniny i feomelaniny.

### III. POWSTAWANIE MELANOSOMÓW I ICH DALSZE LOSY W NASKÓRKOWEJ JEDNOSTCE MELANINOWEJ

W naskórku oraz mieszkach włosowych ssaków melanocyt jest połączony z keratynocytami [49], tworząc wspólnie tzw. naskórkową jednostkę melaniczną (EMU), którą schematycznie przedstawiono na ryc. 3 [11].



Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie naskórkowej jednostki melanicznej (EMU), wg [11], zmodyfikowane. MS — melanosom; AG — aparat Golgiego; J — jądro; SE — siateczka endoplazmatyczna

Proces melanogeniczny może być rozpatrywany jako „kaskada” procesów połączonych wewnętrznymi czynnikami regulacyjnymi, które pojawiają się, gdy melanosom zostaje zaprogramowany do spełnienia swojego przeznaczenia w obrębie EMU. Na ryc. 4 przedstawiono w sposób schematyczny taką „kaskadę”. Poszczególne jej etapy to:



Ryc. 4. „Kaskada” melanogenezy w EMU, wg [11], zmodyfikowane. Poszczególne etapy tej „kaskady” opisano w tekście

### 1. Indukcja melanogenezy i proliferacja melanocytu

Zwiększenie naskórkowej pigmentacji melaninowej związane jest ze wzrostem liczby melanocytów (tj. czynników melaninowych) w czasie podziału mitotycznego, jak również ze wzrostem aktywności melanogenicznej wewnątrz każdego melanocytu (tj. produktów melaninowych). Miejscowe rozmieszczenie melanocytów w naskórku ssaków może ulegać zmianie, tzn. liczba aktywnych melanocytów zmniejsza się z wiekiem lub też wzrasta przy wielokrotnej

ekspozycji skóry na działanie promieniowania UV [17]. W komórkach czerniaka indukcja melanogenezy i wzrost komórki są ze sobą ściśle powiązane. I tak, podanie MSH powoduje zwiększenie aktywności tyrozynazy i nasilenie syntezy melaniny, zahamowanie lub pobudzenie wzrostu komórki oraz liczne zmiany jej morfologii [34, 54]. Na powierzchni komórek barwnikowych zidentyfikowano receptory glikoproteinowe specyficzne dla wiązania MSH. Pierwszym następstwem wynikającym z wiązania się MSH z receptorem w fazie G2 cyklu komórkowego [54], jest szybki wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznego AMP, pojawiający się w ciągu 5–30 min. Kompleksy MSH-receptor ulegają pochłonięciu drogą endocytozy. Pęcherzyki zawierające aktywowaną cyklazę adenyłową ulegają fuzji z premelanosomem, co aktywuje tyrozynazę. Wzrost aktywności tyrozynazy, w 6–8 godzin po dodaniu MSH, jest spowodowany prawdopodobnie w większym stopniu usunięciem inhibitora tyrozynazy niż syntezą nowej cząsteczki enzymu [53]. Wykazano bowiem, że podwyższone poziomy cyklicznego AMP aktywują kinazę białkową, która katalizując fosforylację inhibitora tyrozynazy, powoduje aktywację tyrozynazy [20]. Wzrost aktywności tego enzymu powoduje, po około 24 godzinach, zwiększenie zawartości melaniny w melanocycie. W tym czasie komórki powiększają swoje rozmiary i rozciągają długie dendrytyczne wypustki. Stopień proliferacji komórkowej, zależny od warunków hodowli i genotypów czerniaka, może się zmniejszyć lub zwiększyć w odpowiedzi na podany MSH [34, 54].

## 2. Tworzenie składników melanosomalnych i ich wbudowanie do melanosomów znajdujących się w stadium I rozwoju

Białka strukturalne i enzymatyczne melanosomu są syntetyzowane zgodnie z programem genetycznym, a następnie gromadzą się wewnątrz otoczonych błoną wakuoli melanosomów znajdujących się w stadium I rozwoju.

Biogeneza melanosomów jest w dalszym ciągu przedmiotem kontrowersji [18]. Według klasycznej teorii zaproponowanej przez Seiji i Iwashita [46, 47], aparat Golgiego jest jedynym miejscem w komórce, w którym zachodzi synteza melanosomów. W obrębie aparatu Golgiego, prawdopodobnie przy udziale związanych z nim szorstkich błon siateczki endoplazmatycznej, syntetyzowane są białka strukturalne melanosomów. Białka te, zawierające przynajmniej 15–16 polipeptydów [13], znajdują się w pęcherzykach, których struktura opiera się na włókniste ukształtowanych białkach, zamkniętych błoną otaczającą poszczególne pęcherzyki. W każdym pęcherzyku białka podlegają segregacji, tworząc matrycę melanosomu składającą się z kilku koncentrycznie ułożonych blaszek białkowych. Przy zastosowaniu mikroskopu elektronowego wykazano, że wielkość małych początkowo pęcherzyków aparatu Golgiego wzrasta, jak również, że ich wewnętrzne struktury błoniaste ulegają stopnio-

wemu pogrubieniu, osiągając gęstość błony zewnętrznej pęcherzyka. Do tak utworzonej matrycy melanosomu wbudowywana jest tyrozynaza.

Tyrozynaza syntetyzowana jest na powierzchni układu: aparat Golgiego – siateczka endoplazmatyczna – lizosom (GERL) w formie protyrozynazy [28]. Z rybosomów, gdzie powstaje łańcuch polipeptydowy proenzymu, białko zostaje uwolnione do szczelin między błonami szorstkimi, a następnie drogą błon gładkich zostaje przeniesione do aparatu Golgiego. Podczas tej migracji do łańcucha peptydowego enzymu zostają dołączone cukry obojętne (mannoza, galaktoza, fukoza) oraz kwas sjałowy [28]. Stwierdzono, że glikozylacja tyrozynazy, a w szczególności przyłączenie kwasu sjałowego, zachodzi przed osiągnięciem przez enzym aparatu Golgiego, a następnie w układzie GERL [6, 44, 52]. Po osiągnięciu aparatu Golgiego, protyrozynaza ulega rozdzieleniu na małe jednostki, z których każda otrzymuje błoniastą otoczkę. W obrębie każdej otoczki cząsteczki protyrozynazy zostają „uporządkowane” według określonego wzoru, co prawdopodobnie jest istotne dla konwersji protyrozynazy w tyrozynazę [44].

Białka strukturalne tworzą matriks melanosomu oraz część błony melanosomalnej [14, 56]. Tyrozynaza zaś zostaje połączona z „potyrozynazowymi czynnikami regulacji” (np. czynnik konwersji DOPA-chromu, czynnik blokujący indolu) w czasie jej syntezy lub bezpośrednio po syntezie [1, 5, 22].

Białka strukturalne melanosomu są otaczane błoną ograniczającą w obrębie gładkiej i szorstkiej siateczki endoplazmatycznej, dając początek tzw. „strukturalnemu melanosomowi”. W tym czasie przypuszczalnie specyficzne białka i lipidy są dołączone do struktury błony melanosomalnej. Prawdopodobnie lipidy, początkowo zlokalizowane na powierzchni zewnętrznej, regulują funkcjonalne różnicowanie się melanosomów, podczas gdy białka melanosomów, pierwotnie tworzące korę, kontrolują strukturalne różnicowanie się tych organelli [14]. Cząsteczki glikozylowanej T1-tyrozynazy, połączone z „potyrozynazowymi czynnikami regulacji” są zamykane wewnątrz otoczonych pęcherzyków w układzie GERL. Wytworzone w ten sposób tzw. ciała pęcherzykowato-kuliste (wielkości 40 nm i nie wykazujące wysokiej gęstości elektronowej) zlewają się ze „strukturalnymi melanosomami” i są włączane do ich wnętrza [16]. Prawdopodobnie pewne białka i lipidy oraz ich połączenia biorą udział w rozpoznawaniu „strukturalnych melanosomów” i otoczonych pęcherzyków. W ten sposób powstaje melanosom znajdujący się w stadium I rozwoju, czyli premelanosom, który jest okrągłą wakuolą, o wymiarach: 200–500 nm długości i 100–500 nm szerokości, zawierającą nie ukierunkowane włókienka lub blaszki białek strukturalnych oraz mikropęcherzyki [10, 23].

Ostatnio przeprowadzono badania mające na celu wyjaśnienie, w jaki sposób tyrozynaza jest aktywowana, aby na pewnym etapie rozwoju melanosomu rozpocząć syntezę melaniny. Wykazano, że otoczone pęcherzyki, po zlaniu się z wczesną postacią melanosomu, przenoszą do premelanosomu glikozyl-

waną T1-tyrozynazę, co prowadzi do powstania izomeru połączonego z błoną melanosomalną, tj. T4-tyrozynazy [6, 29] oraz do zapoczątkowania tworzenia melaniny wewnątrz premelanosomu. Prawdopodobnie sygnałem dla wewnątrzkomórkowego procesu transportu tyrozynazy do premelanosomu są wszystkie łańcuchy cukrowe enzymu, a zwłaszcza łańcuchy typu wysokomanozowego [29]. Z kolei, badania przeprowadzone przez Imokawa i Mishima [7] z zastosowaniem inhibitorów glikozylacji (glukozamina i tunikamycyna) wykazały, że N-glikozylacja tyrozynazy oraz białek premelanosomu jest kluczowym sygnałem dla transportu enzymu z otoczonych pęcherzyków w układzie GERL do premelanosomów, a zatem dla melanizacji melanosomów. Można więc wnioskować, że melanogeneza jest regulowana przez wewnątrzkomórkowe dojrzewanie i przemieszczanie się tyrozynazy. Hatta i wsp. [3] wykazali, że otoczone pęcherzyki transportują do premelanosomów również monomery melaniny, głównie 5, 6-dihydroksyindol i kwas 5, 6-dihydroksyindolo-2-karboksylowy.

Otoczone pęcherzyki zawierają, oprócz monomerów melaniny, także oligomery barwnika, nie zawierają natomiast polimeru melaniny. Taki polimeryczny barwnik nie może powstawać we frakcji otoczonych pęcherzyków z powodu zarówno braku aktywności T4-tyrozynazy [25], jak i wysokiej aktywności oksydoreduktazy DOPA-chromu, która, jak już wcześniej wspomniano, blokuje proces polimeryzacji [1].

### 3. Przekształcenie melanosomu znajdującego się w stadium I rozwoju w eumelanosom lub feomelanosom

Dalszy los melanosomu zależy od poziomu cysteiny (lub glutationu) w komórce barwnikowej. Gdy poziom cysteiny jest niski, wówczas wewnątrz melanocytów powstają eumelanosomy. Dominującym elementem matriks stają się blaszki, a melanosom poprzez ich równoległe ustawienie staje się eliptyczny. Tyrozynaza jest wyrzucana z eumelanosomalnych mikropęcherzyków i prawdopodobnie zostaje przyłączona do matriks lub otaczającej błony. W ten sposób, przy braku inhibitorowej ilości cysteiny, zainicjowana zostaje w szlaku Rapera-Masona biosynteza brązowoczarnej eumelaniny [24, 42] (ryc. 1.). Gdy poziom cysteiny w melanocycie jest wysoki, powstają kuliste feomelanosomy, w których na konglomeratach włókienek i mikropęcherzyków odkładana jest żółtoczerwona feomelanina. Tyrozynaza zawarta wewnątrz mikropęcherzyków katalizuje przekształcenie tyrozyny do DOPA, a następnie DOPA do DOPA-chinonu, który wydostając się na zewnątrz mikropęcherzyka łączy się z cysteiną. W wyniku reakcji powstaje cysteinylo-DOPA, która dalej przekształcana do metabolitów 1, 4-benzotiazyny, daje ostatecznie polimer feomelaniny [9] (ryc. 2). Zatem kompartmentacja tyrozynazy wyjaśnia, w jaki sposób feomelanogeneza włącza w swój szlak cysteinę, która działa jak chemiczny zmiatacz DOPA-chinonu bez hamowania aktywności tyrozynazy.

Ogólnie można stwierdzić, że melanocyty czarnych mieszków włosowych wytwarzają głównie eumelanosomy. Feomelanosomy są natomiast znajduwane w melanocytach żółtych i rudych mieszków włosowych oraz w melanocytach naskórkowych osobników rudowłosych [41]. U ludzi i zwierząt feomelanosomy są okrągłe i zawierają liczne mikropęcherzyki połączone z nieuporządkowanymi włóknkami [12]. Pomimo różnic morfologicznych, blaszkowato-eliptyczne eumelanosomy i pęcherzykowato-kuliste feomelanosomy różnią się głównie ilością, a nie typem białek strukturalnych [14]. Zasadnicze różnice w kształcie eumelanosomów i feomelanosomów wynikają raczej z różnej organizacji tych samych składników pod wpływem regulacyjnych grup sulfhydrylowych i białek matriks [19]. Wiadomo również, że w tej samej komórce barwnikowej może zachodzić melanogeneza obu typów (tj. eu- i feomelanogeneza). Wykazano bowiem, że cysteinyl-DOPA jest obecna nie tylko w tkankach feomelanogenicznych, ale również w eumelanogenicznych [15]. W rzeczywistości, melanina występująca w melanocytach ssaków jest kopolimerem różnych prekursorów zarówno eu-, jak i feomelaninowych [8].

Końcowy etap dojrzewania, obejmujący głównie stadium IV rozwoju, związany jest wyłącznie z melanizacją melanosomu [44]. Powstająca, w wyniku enzymatycznego utleniania tyrozyny, melanina wypełnia stopniowo wnętrze melanosomu. Wysoka w niedojrzałych, „niezmelanizowanych” melanosomach aktywność tyrozynazy, w miarę akumulacji melaniny, zmniejsza się. W ten sposób, w wyniku postępującej melanizacji, melanosomy zostają stopniowo przekształcane z aktywnych enzymatycznie cząsteczek w nieaktywną melano-proteinę, ziarno melaniny, niezdolne do dalszej produkcji melaniny [48]. Można przyjąć, że istnieje odwrotnie proporcjonalna zależność pomiędzy zawartością melaniny, a aktywnością tyrozynazy w melanosomie [45].

#### 4. Przemieszczanie się melanosomów wewnątrz melanocytów

Wykazano, że w czasie dojrzewania melanosomów zachodzą zmiany ich kształtu i wymiarów [33]. Dojrzewające melanosomy przemieszczają się z aparatu Głogiego do okolicy przyjądrowej melanocytu. Następnie melanosomy zostają przeniesione do dendrytycznych wypustek melanocytu za pomocą mikrotubuli. Prawdopodobnie białka, lipidy lub ich połączenia uczestniczą w przyciąganiu melanosomów do mikrotubuli, zapoczątkowując w ten sposób migrację ziaren barwnika [43].

#### 5. Przenoszenie i upakowanie melanosomów wewnątrz keratynocytów

Melanocyty uwalniają melanosomy, zlokalizowane w dendrytycznych wypustkach, prawdopodobnie bezpośrednio do keratynocytów poprzez przejściowe zlanie się błony i kontakt cytoplazmatyczny. W keratynocytach melanosomy zostają upakowane w postaci wtórnych lizosomów (fagolizosomów),

w których w zależności od wielkości i natury chemicznej mogą występować pojedynczo lub w grupach. Zaobserwowano zgodność między wymiarami melanosomów a ich uporządkowaniem wewnątrz wtórnych lizosomów w keratynocytach, tj. mogą one być upakowane pojedynczo (melanosomy o średnicy większej od 1000 nm) lub w grupach (melanosomy o średnicy mniejszej od 1000 nm) [51]. Stwierdzono jednak znaczne odstępstwa od tej reguły, które sugerują udział innego czynnika kontrolującego upakowanie, nie dającego się wytłumaczyć jedynie zmianą wymiarów melanosomów, co prawdopodobnie związane jest z błoną melanosomalną. W pewnych zaburzeniach pigmentacyjnych oraz w przypadkach stosowania niektórych substancji leczniczych, melanosomy wykazywały nieprawidłowe uporządkowanie wewnątrz wtórnych lizosomów, niezgodne z ich wymiarami. Dla przykładu, lecznicze traktowanie iperytem azotowym wywołuje stan, w którym prawie wszystkie małe melanosomy występują pojedynczo wewnątrz keratynocytów [2].

Po osiągnięciu keratynocytów, melanosomy zostają następnie degradowane przez lizosomalne kwaśne hydrolazy [27]. Keratynocyty natomiast przemieszczają się w kierunku powierzchni naskórka. W końcu melanina zostaje wyrzucana, a aminokwasy, lipidy i węglowodany melanosomalne mogą być reabsorbowane poniżej warstwy zrogowaciałej i ponownie zużyte w metabolizmie naskórka [50].

#### IV. UWAGI KOŃCOWE

U ssaków pigmentacja melaninowa, będąca wynikiem wieloetapowych procesów mających zakres od subkomórkowej organelli związanej z syntezą melaniny aż do skóry jako w pełni zintegrowanego układu, spełnia wiele ważnych zadań fizjologicznych, a mianowicie ochrania podstawowe tkanki przed promieniowaniem UV, umożliwia przystosowawcze zabarwienie, kontroluje gospodarkę cieplną ustroju. Proces wytwarzania barwnika może być również traktowany jako mechanizm odtruwania, dzięki któremu bardzo reaktywne i toksyczne dla komórki chinony zostają szybko przekształcone, poprzez szereg spontanicznych reakcji, w nierozpuszczalny, stosunkowo obojętny polimer melaniny [38].

#### PIŚMIENNICTWO

- [1] BARBER J. I., TOWNSEND D., OLDS D. P., KING R. A., Dopachrome oxidoreductase. A new enzyme in the pigment pathway, *J. Invest. Dermatol.*, **83**, 145-149, 1984.
- [2] FLEXMAN B. A., SOSIS A. C., VAN SCOTT E. J., Changes in melanosome distribution in caucasoid skin following topical application of nitrogen mustard, *J. Invest. Dermatol.*, **60**, 321-326, 1973.
- [3] HATTA S., MISHIMA Y., ICHIHASHI M., ITO S., Melanin monomers within coated vesicles and premelanosomes in melanin synthesizing cells, *J. Invest. Dermatol.*, **91**, 181-184, 1988.

- [4] HEARING V. J., EKEL T. M., MONTAGUE P. M., Mammalian tyrosinase: isozymic forms of the enzymes, *Int. J. Biochem.*, **13**, 99–103, 1981.
- [5] HEARING V. J., KÖRNER A. M., PAWELEK J. M., New regulators of melanogenesis are associated with purified tyrosinase isozymes, *J. Invest. Dermatol.*, **79**, 16–18, 1982.
- [6] IMOKAWA G., MISHIMA Y., Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glycosylation inhibitors within malignant melanoma cells, *Cancer Res.*, **42**, 1992–2002, 1982.
- [7] IMOKAWA G., MISHIMA Y., Importance of glycoproteins in the initiation of melanogenesis: An electron microscopic study of B-16 melanoma cells after release from inhibition of glycosylation, *J. Invest. Dermatol.*, **87**, 319–325, 1986.
- [8] ITO S., NOVELLINO E., CHIOCCARA F., MISURACA G., PROTA G., Copolymerization of dopa and cysteinylodopa in melanogenesis in vitro, *Experientia*, **36**, 822–823, 1980.
- [9] ITO S., PROTA G., A facile one-step synthesis of cysteinylodopas using mushroom tyrosinase, *Experientia*, **33**, 1118–1119, 1977.
- [10] JIMBOW K., FITZPATRICK T. B., Characterization of a new melanosomal structural component – the vesiculo-globular body – by conventional transmission, high voltage, and scanning electron microscopy, *J. Ultrastruct. Res.*, **48**, 269–283, 1974.
- [11] JIMBOW K., FITZPATRICK T. B., QUEVEDO W. C., Cascade of melanogenesis in epidermal melanin pigmentation. The melanosome as a programmed organelle, [w:] *Structure and function of melanin*, vol. 2, (red. K. Jimbow), Fuji Printing Co., Inc. Sapporo, 71–82, 1985.
- [12] JIMBOW K., ISHIDA O., ITO S., HORI Y., WITKOP C. J., KING R. A., Combined chemical and electron microscopic studies of pheomelanosomes in human red hair, *J. Invest. Dermatol.*, **81**, 506–511, 1983.
- [13] JIMBOW K., JIMBOW M., CHIBA M., Characterization of structural properties for morphological differentiation of melanosomes. II. Electron microscopic and SDS-PAGE comparison of melanosomal matrix proteins in B-16 and Harding-Passey melanomas, *J. Invest. Dermatol.*, **78**, 76–81, 1982.
- [14] JIMBOW M., KANO H., JIMBOW K., Characterization of biochemical properties of melanosomes for structural and functional differentiation. Analysis of the compositions of lipids and proteins in melanosomes and their subfractions, *J. Invest. Dermatol.*, **79**, 97–102, 1982.
- [15] JIMBOW K., MIYAKE Y., HOMMA K., YASUDA K., IZUMI Y., TSUTSUMI A., ITO S., Characterization of melanogenesis and morphogenesis of melanosomes by physicochemical properties of melanin and melanosomes in malignant melanoma, *Cancer Res.*, **44**, 1128–1134, 1984.
- [16] JIMBOW K., OIKAWA O., SUGIYAMA S., TAKEUCHI T., Comparison of eumelanogenesis and pheomelanogenesis in retinal and follicular melanocytes. Role of vesiculo-globular bodies in melanosome differentiation, *J. Invest. Dermatol.*, **73**, 278–284, 1979.
- [17] JIMBOW K., PATHAK M. A., SZABO G., FITZPATRICK T. B., Ultrastructural changes in human melanocytes after ultraviolet radiation, [w:] *Sunlight and Man*, (red. M. A. Pathak, L. C. Haber, M. Seiji, A. Kukita, T. B. Fitzpatrick), University of Tokyo Press, Tokyo, 195–215, 1974.
- [18] KANCLERZ A., ZBYTNIIEWSKI Z., Melanosomy w tkankach normalnych i nowotworowych, *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego, Prace z biologii molekularnej*, **Z. 9**, 339–349, 1982.
- [19] KONO R., JIMBOW K., KATAHASHI H., MAEDA K., Ultrasonic measurement of melanosomes for characterization of their physico-chemical structure in B 16 and Harding-Passey melanomas, *Cancer Res.*, **44**, 4337–4341, 1984.
- [20] KÖRNER A. M., PAWELEK J. M., Activation of melanoma tyrosinase by cyclic-AMP-dependent protein kinase in a cell-free system, *Nature*, **267**, 444–447, 1977.



- [21] KÖRNER A. M., PAWELEK J. M., Dopachrome conversion. A possible control point in melanin biosynthesis, *J. Invest. Dermatol.*, **75**, 192–195, 1980.
- [22] KÖRNER A. M., PAWELEK J. M., Mammalian tyrosinase catalyses three reactions in the biosynthesis of melanin, *Science*, **217**, 1163–1165, 1982.
- [23] KRISTIČ J., *Illustrated Encyclopedia of Human Histology*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, s. 252, 1984.
- [24] MASON H. S., Comparative biochemistry of the phenolase complex, [w:] *Methods in Enzymology*, (red. K. Kustin), vol. 35, Academic Press, New York, 105–184, 1955.
- [25] MISHIMA Y., IMOKAWA G., Role of glycosylation in initial melanogenesis: post-inhibition dynamics, [w:] *Pigment Cell, 1985: Biological, Molecular and Clinical Aspects of Pigmentation*, (red. J. Bagnara, S. N. Klaus, E. Paul, M. Scharl), University of Tokyo, Tokyo, 17–30, 1985.
- [26] MURRAY M., PAWELEK J. M., LAMOREUX M. L., New regulatory factors for melanogenesis. Developmental changes in neonatal mice of various genotypes, *Develop. Biol.*, **100**, 120–126, 1983.
- [27] NAKAGAWA H., RHODES A., FITZPATRICK T. B., HORI Y., Acid phosphatase in melanosome formation. A cytochemical study in normal human melanocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **83**, 140–144, 1984.
- [28] NISHIOKA K., Particulate tyrosinase of human malignant melanoma. Solubilization, purification following trypsin treatment, and characterization, *Eur. J. Biochem.*, **85**, 137–146, 1978.
- [29] OHKURA T., YAMASHITA K., MISHIMA Y., KABATA A., Purification of hamster melanoma tyrosinases and structural studies of their asparagine-linked sugar chains, *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 63–77, 1984.
- [30] OSTROWSKI K., *Histologia*, PZWL, Warszawa, 641–642, 1988.
- [31] PALUMBO A., d'ISCHIA M., MISURACA G., PROTA G., Effect of metal ions on the rearrangement of dopachrome, *Biochim. Biophys. Acta*, **925**, 203–209, 1987.
- [32] PALUMBO A., d'ISCHIA M., MISURACA G., PROTA G., SCHULTZ T. M., Structural modifications in biosynthetic melanins induced by metal ions, *Biochim. Biophys. Acta*, **964**, 193–199, 1988.
- [33] PAUTSCH F., ZBYTNIIEWSKI Z., *Biologia czerniaków, Klinika Oczna*, **42**, 671–681, 1972.
- [34] PAWELEK J. M., Factors regulating growth and pigmentation of melanoma cells, *J. Invest. Dermatol.*, **66**, 201–209, 1976.
- [35] PAWELEK J. M., KÖRNER A. M., The biosynthesis of mammalian melanin, *Am. Sci.*, **70**, 136–145, 1982.
- [36] PAWELEK J. M., KÖRNER A. M., BERGSTROM A., BOLOGNA J., New regulators of melanin biosynthesis and the autodestruction of melanoma cells, *Nature*, **286**, 617–619, 1980.
- [37] PORĘBSKA-BUDNY M., DWORZAŃSKI J. P., Tyrozynaza-oksydoreduktaza; monofenol, o-difenol: O<sub>2</sub>, *Postępy Biochemii*, **34**, 375–394, 1988.
- [38] PROTA G., Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals, *J. Invest. Dermatol.*, **75**, 122–127, 1980.
- [39] PROTA G., GRESCENZI S., MISURACA G., NICOLAUS R. A., New intermediates in pheomelanogenesis in vitro, *Experientia*, **26**, 1058–1060, 1970.
- [40] PROTA G., SCHERILLO G., NICOLAUS R. A., Struttura e biogenesi delle feomelanine. IV. Sintesi e proprietà della 5-S-cysteinildopa, *Gaz. Chim. Ita.*, **98**, 435–510, 1968.
- [41] QUEVEDO W. C., FLEISCHMANN R. D., Developmental biology of mammalian melanocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **75**, 116–120, 1980.
- [42] RAPER H. S., The aerobic oxidases, *Physiol. Rev.*, **8**, 245–282, 1928.
- [43] SCHLIWA M., Stereo high voltage electron microscopy of melanophores. Matrix transformations during pigment movements and the effects of cold and colchicine, *Exp. Cell Res.*, **118**, 323–340, 1979.

- [44] SEIJI M., Melanosomes 1980, [w:] Pigment Cell, (red. M. Seiji), University of Tokyo Press, Tokyo, 3-13, 1981.
- [45] SEIJI M., FUKUZAWA N., SHIMAO K., ITAKURA H., On the melanization process of melanosomes, [w:] Pigment Cell, vol. 1 (red. V. J. Mc Govern, P. R. Sydney), Karger A. G., Basel, 39-46, 1973.
- [46] SEIJI M., IWASHITA S., On the site of melanin formation in melanocytes, J. Biochem., **54**, 465-467, 1963.
- [47] SEIJI M., IWASHITA S., Intracellular localization of tyrosinase and site of melanin formation in melanocyte, J. Invest. Dermatol., **45**, 305-314, 1965.
- [48] SEIJI M., MIYAZAKI K., Melanization and tyrosinase activity, J. Invest. Dermatol., **57**, 316-322, 1971.
- [49] SNELL R., Clinical and functional histology for medical students, (red. R. S. Snell), Little Brown and Co, Boston, Toronto, s. 697, 1984.
- [50] TAKEMATSU H., SEIJI M., Effect of macrophages on elimination of dermal melanin from the dermis, Arch. Dermatol. Res., **276**, 96-98, 1984.
- [51] TODA K., PATHAK M. A., PARRISH J. A., FITZPATRICK T. B., Alteration of racial differences in melanosome distribution in human epidermis after exposure to ultraviolet light, Nature, **236**, 143-145, 1972.
- [52] TOMITA Y., SEIJI M., IGARASHI A., The hydroxyl radical is not involved with tyrosinase inactivation, J. Dermatol., **7**, 377-380, 1980.
- [53] WONG G., PAWELEK J. M., MSH promotes the activation of preexisting tyrosinase molecules in Cloudman S 91 melanoma cells, Nature, **255**, 644-646, 1975.
- [54] WONG G., PAWELEK J. M., SANSONE M., MOROWITZ J., Response of mouse melanoma cells to melanocyte stimulating hormone, Nature, **248**, 351-354, 1979.
- [55] ZBYTNIIEWSKI Z., KANCLERZ A., DREWA G., Melaniny zwierzęce: budowa, występowanie i rola biologiczna, Przegl. Zool., **21**, 116-126, 1977.
- [56] ZIMMERMAN J., Four new proteins of the eumelanosome matrix of chick pigment epithelium, J. Exp. Zool., **219**, 1-6, 1982.

Otrzymano: 22 października 1988

Przyjęto: 9 maja 1989

Adres autorki: ul. Narcyzów 1, 41-200 Sosnowiec.

## ORGANIZACJA I TRANSKRYPCJA GENÓW MITOCHONDRIÓW I PLASTYDÓW

### ORGANIZATION AND TRANSCRIPTION OF MITOCHONDRIAL AND PLASTID GENES

Anna GOŹDZICKA-JÓZEFIAK

Zakład Biochemii Polimerów UAM w Poznaniu

*Streszczenie.* Plastydy i mitochondria zawierają specyficzne rRNA, tRNA i białka, które są kodowane przez genom organelowy oraz zestaw enzymów biorących udział w replikacji DNA, transkrypcji i translacji.

mtDNA organizmów jednokomórkowych różnią się wymiarami, kształtem i organizacją genów. Mitochondrialne DNA zwierząt są od nich mniejsze, a zawarte w nich geny ułożone blisko siebie. Genomy mitochondrialne roślin mają bardzo różnorodny kształt i wymiary. W mitochondriach roślin występują często mtDNA plazmidowe i episomalne.

Geny genomów plastydowych są zorganizowane podobnie jak w komórce prokariotycznej.

Sekwencje uczestniczące w inicjacji i terminacji genów plastydów są podobne do sekwencji genów prokariotycznych. W plastydach stwierdzono występowanie 2 polimeraz DNA, różniących się właściwościami fizyko-chemicznymi.

Geny genomu mitochondrialnego są transkrybowane przez pojedynczą polimerazę RNA, która jest kodowana przez genom jądrowy.

Inicjacja transkrypcji większości genów mt drożdży rozpoczyna się w miejscu dziewięćciu nukleotydowej sekwencji promotorowej przylegającej do końca 5' genu struktury.

*Summary.* Plastids and mitochondria contain their own specific rRNAs, tRNAs and proteins that are coded by an organellar genome, and also the complete set of enzymes which participate in DNA replication, transcription and translation.

The mtDNAs of unicellular organisms vary greatly in size, shape, and gene arrangement, with some of the genes having organizations not previously observed in bacterial or nuclear genomes. Animal mtDNAs are strikingly uniform in structure and contain an extraordinary gene arrangement which permits maximum exploitation of their coding capacity.

The mitochondrial genomes of higher plants exist as a set of large recombining circular molecules in which some circles are more abundant than others. Minicircular plasmid DNA and linear DNA episomes are also frequently present in plant mitochondria.

The organization of plasmid genes is similar to that found in bacteria.

The sequences involved in the initiation and termination of transcription in plasmids are very similar to those identified in prokaryotes.

In extracts from plastids there have been found two different kinds of RNA polymerase activities.

Mitochondrial genes coding for tRNA, rRNA and mRNA are transcribed by a single nuclearly encoded mitochondrial polymerase. The initiation of transcription of the most mitochondrial genes in yeast occurs at a nine-nucleotide promoter sequences located at 5' end to their structural genes.

Wykaz stosowanych skrótów:

N, X – nukleotydy  
 tzp – tysięcy par zasad  
 pz – pary zasad

## I. WPROWADZENIE

Przeszło 20 lat temu wykazano, że mitochondria i plastydy zawierają specyficzne organelowe DNA [54]. Od tego czasu prowadzone są badania nad strukturą i funkcją organelowego DNA oraz współdziałaniem pomiędzy genomem mitochondrialnym, jądrowym i plastydowym.

Wykazano, że organelowy DNA koduje rRNA wchodzące w skład plastydowych i mitochondrialnych rybosomów, tRNA uczestniczące w syntezie organelowych białek oraz niektóre z organelowych białek. Plastydy i mitochondria zawierają zestaw enzymów niezbędnych w replikacji DNA, transkrypcji i translacji mRNA.

Poznanie struktury, organizacji i ekspresji mitochondrialnych i plastydowych genów jest ważne nie tylko dla wyjaśnienia biogenezy organelowego DNA, ale również współdziałania organeli z cytoplazmą i jądrem komórki.

## II. OGÓLNY SCHEMAT ORGANIZACJI DNA MITOCHONDRIÓW

W większości organizmów dotychczas zbadanych mitochondrialny DNA stanowi mniej niż 1% ogólnego DNA komórki, wyjątkiem są drożdże, których mitochondria mogą zawierać więcej niż 15% ogólnego DNA [13].

Mitochondrialny DNA organizmów niższych (np. jednokomórkowych *Eukaryota*) występuje w trzech różnych formach:

1. w formie kowalencyjnie zamkniętej cząsteczki kolistej (np. mtDNA *Saccharomyces cerevisiae*),
2. w formie liniowej (np. mtDNA *Paramecium aurelia*),
3. w formie agregatów dużych i małych cząsteczek kolistych.

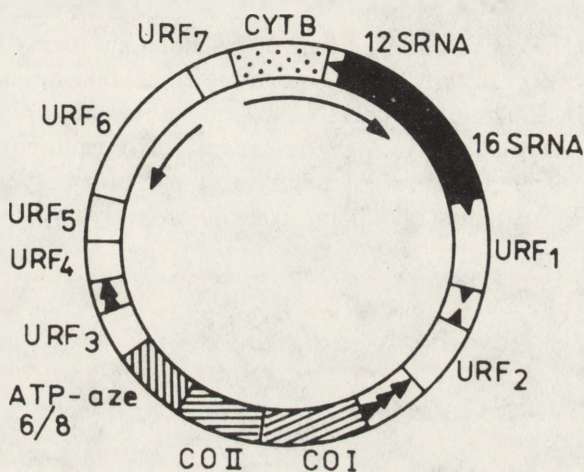
Formę tę znajdowano w kinetoplastach *Trypanosomidae* [106].

Wielkość cząsteczki mitochondrialnego DNA waha się od 16 tpz (np. *Chlamydomonas reinhardtii*) do 90 tpz, np. w mitochondriach grzyba *Podospora anserina* (tab. 1) [110].

W mitochondriach niektórych grzybów spotyka się również małe koliste cząsteczki DNA, zawierające od 3 do 5 tpz, zwane plazmidami mitochondrialnymi [14, 33].

Różnorodność form oraz zróżnicowane wymiary DNA w mitochondriach organizmów niższych nie występują w mitochondriach zwierząt. Genomy zwierzęce są mniejsze od genomów organizmów jednokomórkowych, a zawarte w nich geny ułożone są bardzo blisko siebie, a nawet częściowo zachodzą na siebie. Geny struktury nie zawierają intronów [17, 54]. DNA występuje w formie kowalencyjnie zamkniętej cząsteczki kolistej, o obwodzie około 6  $\mu\text{m}$ , co odpowiada zawartości około 17 tpz (tab. 1). Znamy pełną sekwencję nukleotydową dla genomu mitochondrialnego człowieka, myszy, wołu, żaby i muchy [1, 3, 8, 17, 41, 54, 84].

Ogólny schemat organizacji mitochondrialnego DNA zwierząt jest przedstawiony na ryc. 1.



Ryc. 1. Ogólny schemat organizacji DNA mitochondriów człowieka [104]. Na ryc. zaznaczone są sekwencje kodujące podjednostkę cyt b (CYT-B), otwarte ramki odczytu (URF) sekwencje kodujące podjednostki ATP-syntazy (ATP-aze); ▲ — zaznaczono sekwencje kodujące tRNA. Strzałki oznaczają kierunek transkrypcji genów. Wszystkie geny mtDNA są transkrybowane zgodnie ze wskazówkami zegara, poza URF<sub>6</sub> i 8 genami tRNA.

Genom mitochondrialny roślin wyższych jest znacznie większy od genomu mitochondriów zwierząt i organizmów jednokomórkowych oraz ma bardziej zróżnicowany kształt i wymiary. Wielkość genomu mitochondrialnego roślin waha się od 100 do 2500 tpz [12, 30, 50, 54, 58, 60, 77, 80, 95] (Tab. 1).

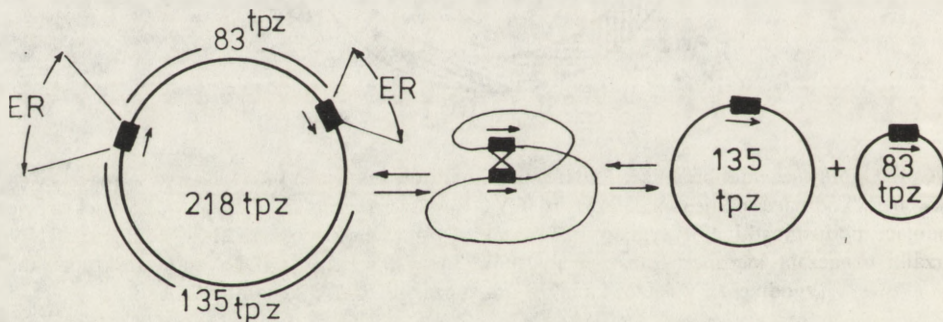
Zwiększonym wymiarom genomu mitochondrialnego roślin nie towarzyszy wyraźny wzrost liczby zlokalizowanych w nim genów. Leaver i Gray wykazali, że liczba białek kodowanych w mitochondriach roślin jest podobna do liczby białek kodowanych w mitochondriach zwierząt [58].

W mitochondriach roślin stwierdzono jednak występowanie dodatkowych małych cząsteczek DNA, zwanych DNA plazmidowymi lub episomalnymi, oraz zidentyfikowano kilka genów lub ich produktów [14, 15, 30, 33, 92, 94].

Genom ten zawiera także obszerne niekodujące odcinki DNA bogate w pary AT. Funkcja ich nie jest znana.

Mitochondrialny DNA roślin wyższych występuje najczęściej w formie kowalencyjnie zamkniętych cząsteczek kolistych (o różnych rozmiarach) lub formie liniowej (tab. 1).

W genomach mitochondrialnych większości dotychczas zbadanych roślin stwierdzono występowanie odcinków o takiej samej sekwencji i orientacji (tzw. elementy powtarzalne, z ang. repeat element), zbudowanych z 2–6 tpz, np. w genomie mitochondrialnym kukurydzy znajduje się 6 takich odcinków (5 o takiej samej orientacji, 1 odwrotnie zorientowany), natomiast w genomie rzepy i szpinaku po jednej ich parze [30, 58, 77, 95, 113]. Przypuszcza się, że odcinki te stanowią miejsca w genomie, gdzie dochodzi do rekombinacji DNA, w wyniku której mogą powstawać liczne i różnorodne formy mitochondrialnego DNA (ryc. 2). Z tym DNA mogą również rekombinować mtDNA plazmidowe [88]. Plazmidowe mtDNA zostały obszernie opisane przez Gorączniaka i Augustyniak [33]. Z genomem mitochondrialnym roślin szeregu gatunków jest związana także męska sterylność cytoplazmatyczna [16, 46, 79, 81, 115, 116]. W roślinach takich nie rozwija się aktywny pyłek kwiatowy.



Rys. 2. Schemat organizacji i przemieszczania się odcinków mtDNA rzepy (*Brassica campestris*) [30]. W genomie mitochondrialnym rzepy zawierającym 218 tpz (tz master genom) występują odcinki o takiej samej sekwencji zbudowane z 6 tpz, które są oddzielone rejonami DNA o unikalnej sekwencji zawierającymi z jednej strony 83 tpz, a z drugiej 135 tpz. W wyniku utworzenia par pomiędzy odcinkami o takiej samej sekwencji, może dojść do rekombinacji DNA i rozdzielania dużego genomu (218 tpz) na dwa mniejsze podgenomy, z których każdy ma pojedynczy odcinek o takiej samej sekwencji. Częsteczki te mogą dalej między sobą rekombinować, co doprowadza do powstania licznych i różnorodnych form DNA mitochondrialnego. Symbolem ER – oznaczono na ryc. odcinki o takiej samej sekwencji. Strzałki oznaczają kierunek transkrypcji genów.

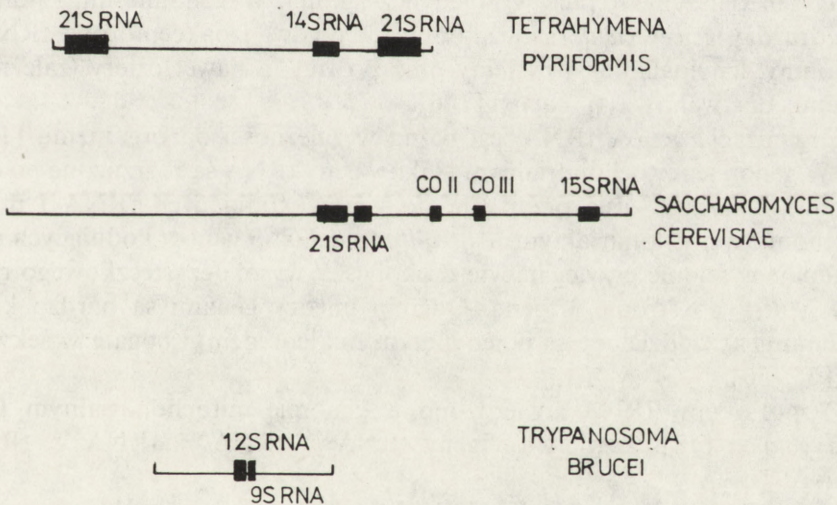
## III. ORGANIZACJA GENÓW MITOCHONDRIALNYCH

Mitochondrialny DNA koduje pełen zestaw tRNA niezbędny do syntezy mitochondrialnych białek, wysokocząsteczkowe rRNA oraz niektóre z mitochondrialnych białek [11, 13, 21, 54, 56, 71, 87, 91, 103, 104, 112].

Większość genów mitochondriów jest zlokalizowana na nici ciężkiej DNA (nić H) [9, 10, 54]. Dokładniejsze informacje znaleźć można w artykule Kruszewskiej i Boguty [54].

Wielkość genów rRNA i ich organizacja jest różna w zależności od organizmu [2, 7, 8, 20, 25, 31, 55, 59, 82, 86, 93]. W mitochondriach organizmów niższych, np. drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) są kodowane geny rRNA o stałej sedymentacji 15S i 21S. Geny te są zlokalizowane na tej samej nici DNA i przedzielone genami CO II i CO III oraz licznymi genami tRNA, natomiast u *Trypanosomidae* geny wysokocząsteczkowego rRNA (9S i 12S) umieszczone są ściśle obok siebie (ryc. 3).

Inną organizację genów rRNA stwierdzono u *Tetrahymena*. Gen rRNA o stałej sedymentacji 14S jest umieszczony tam centralnie, a w rejonach 3' i 5' genu znajdują się geny 21S rRNA oddzielone od genu 14S rRNA genami białek i tRNA (ryc. 3).



Ryc. 3. Schemat organizacji genów wysokocząsteczkowego RNA w genomach mitochondrialnych różnych organizmów [106]. ■ — oznaczono sekwencje kodujące geny wysokocząsteczkowego RNA; CO I — gen podjednostki I oksydazy cytochromowej; CO II — gen podjednostki II oksydazy cytochromowej.

Geny 21S rRNA w niektórych szczepach *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* i *Aspergillus niger* zawierają 1 lub 2 duże introny (np. introny w genie *A. niger* zawierają odpowiednio 1678 i 1143 pz). W intronach tych stwierdzono obecność kodonów inicjujących i terminujących, dlatego przypuszcza się, że mogą one kodować białka. Sekwencje takie nazywa się otwartymi ramkami odczytu (z ang. open reading frames – ORF).

W przeciwieństwie do organizmów niższych, organizacja genów rRNA mitochondriów zwierząt wielokomórkowych jest podobna. Genom ten koduje rRNA o stałej sedymentacji 12S i 16S, które są zorganizowane w kolejności 5' – tRNA<sup>Phe</sup>-12S rRNA – tRNA<sup>Val</sup>-16S rRNA – tRNA<sup>Leu</sup>-3' [8, 20, 88] (ryc. 1). Proponowane modele struktur wysokocząsteczkowych rRNA są podobne do odpowiednich modeli rRNA *E. coli* [32]. W genomach mitochondrialnych organizmów niższych i zwierząt nie jest kodowany 5S rRNA.

Genom mitochondrialny roślin wyższych koduje natomiast 5S rRNA, 18S rRNA i 26S rRNA. Geny 5S rRNA i 18S rRNA w mitochondriach pszenicy są zlokalizowane obok siebie, natomiast gen 26S rRNA umieszczony jest oddzielnie. Podobną organizację genów rRNA stwierdzono w roślinach innych gatunków [11, 59]. 18S rRNA wykazuje homologię sekwencji do 16S rRNA bakterii. Liczba genów tRNA w mitochondriach wynosi od 22 u ssaków do około 25 w pszenicy [1, 27, 34, 56, 68, 78, 106]. W mitochondriach ssaków każdy gen tRNA występuje w pojedynczej kopii. W genomie mitochondrialnym drożdży (*S. cerevisiae*) są już kodowane po dwa izoakceptorowe tRNA dla metioniny, fenyloalaniny i cysteiny oraz po trzy, a nawet cztery (zależnie od szczepu) dla waliny i tyrozyny [106].

Organizacja genów tRNA jest różna w zależności od organizmu [10, 20, 26]. W genomie mitochondrialnym ssaków geny tRNA są rozrzucone po całym genomie i bardzo ściśle przylegają do genów kodujących rRNA i mRNA. W genomie mitochondrialnym *Aspergillus nidulans* 9 genów kodujących tRNA występuje w rejonie przylegającym do końca 5' wysokocząsteczkowego rRNA, a 11 genów po stronie 3' genu. Odcinki między genami są bardzo krótkie (czasami geny oddzielone są pojedynczym nukleotydem) i bogate w sekwencje AT [55, 56].

Zespół genów tRNA stwierdzono w genomie mitochondrialnym *Drosophila yakuba* [18]. Zawiera on geny tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Ser</sup> i tRNA<sup>Phe</sup>.

Geny tRNA w mitochondriach drożdży występują przeważnie w rejonach przylegających do 3' lub 5' genów kodujących białka.

Struktura pierwszorzędowa licznych genów mitochondrialnych tRNA zwierząt wyższych i owadów różni się od dotychczas poznanych genów cytoplazmatycznych brakiem sekwencji TΨC, zmianami nukleotydów w pozycji 18 i 19 (zwykle występuje tam G) oraz silnie zredukowanym lub w ogóle niewystępującym ramieniem dodatkowym [4, 18, 26, 56].



Wykazano również, że tRNA mitochondriów ssaków i niektórych grzybów, np. *Neurospora crassa*, podlegają innym regułom odczytywania kodonów niż w kodzie uniwersalnym [4, 40, 54]. I tak np. kodon UGA koduje tryptofan, nie jest więc kodonem nonsensownym, kodon AUA koduje metioninę zamiast izoleucyny, zaś kodony AGG i AGA nie są używane. Znane są również przypadki, że kodon AGA jest kodonem terminującym lub kodującym serynę.

Dotychczas niewiele wiadomo o mitochondrialnych tRNA i ich genach w roślinach wyższych. Znane są jedynie sekwencje przeszło 10 genów tRNA mitochondriów roślin wyższych. Sekwencje te wykazują wysoki stopień homologii (90%) do odpowiednich genów plastydów [37, 66–69, 71]. Stwierdzono również, że tRNA<sup>Trp</sup> z mitochondriów fasoli, zawierający antykodon C<sub>m</sub>CA może rozpoznawać kodon UGG jak w kodzie uniwersalnym i nie jest komplementarny do kodonu UGA, który koduje tryptofan w mitochondriach ssaków i drożdży.

Dotychczas poznane geny mitochondrialne tRNA z różnych organizmów nie kodują sekwencji terminalnej CCA oraz nie zawierają intronów.

W genomach mitochondrialnych organizmów dotychczas zbadanych zidentyfikowano geny kodujące niektóre z mitochondrialnych białek, wśród nich geny kodujące I, II i III podjednostkę oksydazy cytochromowej (CO I, CO II, CO III), podjednostki 6, 8 i 9 ATP-syntazy, podjednostkę reduktazy Q oraz geny białek wchodzących w skład mitochondrialnych rybosomów [21, 31, 71, 91, 103, 104]. W mitochondrialnym DNA zwierząt zidentyfikowano również 7 otwartych ramek odczytu [105, 106]. Funkcje kodowanych przez nie białek nie są wyjaśnione. Białka te zawierają przypuszczalnie hydrofobowe składniki i prawdopodobnie wchodzi w skład błon mitochondrialnych.

Większość mitochondrialnych białek jest jednak kodowana przez genom jądrowy, syntetyzowana w cytoplazmie, a następnie importowana do mitochondriów [64]. Liczne geny mitochondrialne zawierają od 1 do kilku intronów. Sekwencje intronowe występują np. w genie kodującym podjednostkę I oksydazy cytochromowej drożdży i w genie kodującym podjednostkę II oksydazy cytochromowej kukurydzy.

Introny występujące w genach mitochondrialnych można podzielić na dwie grupy [2, 39, 70, 98, 110–112]. Do grupy pierwszej należą introny, które są zdolne do autokatalitycznego wycięcia bez udziału dodatkowych białek, np. intron w genie cyt b, wysokocząsteczkowego RNA *Tetrahymena* czy białek w mitochondriach *Neurospora crassa*.

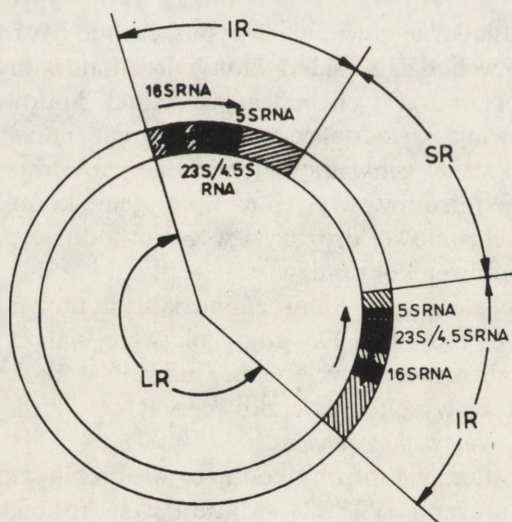
Odrębną grupę stanowią introny kodujące w obrębie sekwencji intronowej białka zwane maturazami [22, 58]. Maturazy są to białka enzymatyczne odpowiedzialne za prawidłowe wycięcie sekwencji intronowej, przez które są kodowane [54]. Introny genów mitochondrialnych nie zawierają w rejonach przylegających do eksonu sekwencji GU...AG występującej w intronach jądrowych pre-mRNA [39].

## IV. OGÓLNY SCHEMAT ORGANIZACJI DNA PLASTYDÓW

W większości dotychczas zbadanych roślin plastydowy DNA występuje w formie kowalencyjnie zamkniętej cząsteczki kolistej o masie  $56\text{--}95 \times 10^6$  daltona (tab. 2). Odpowiada to zawartości par zasad od 120 do 195 tysięcy [5, 35, 72, 73]. Obwód cząsteczki plastydowego DNA waha się od  $27 \mu\text{m}$  (jak np. u *Codium fragile*) do  $63 \mu\text{m}$  (np. u *Chlamydomonas*). Liniowe formy plastydowego DNA przeważają jedynie u kilku gatunków *Acetabularia*.

W genomach plastydowych niektórych roślin (np. grochu, fasoli) występują rybonukleotydy. Znajdują się one w różnych miejscach DNA, na obu jego niciach, w ilości od 12 do 18 nukleotydów [5, 50].

Znane są mapy fizyczne plastydowych genów wielu roślin, a także sekwencje nukleotydowe większości ich genów. W 1986 r. ustalono sekwencje nukleotydowe genów plastydowych tytoniu i wątrobowca (*Marchantia polymorpha*) [35, 72]. Porównując różne fragmenty plastydowego DNA roślin odległych ewolucyjnie, wykazano podobną organizację szeregu sekwencji nukleotydowych w ich genomach. Stwierdzono również, że sekwencje nukleotydowe kodujące geny RNA i geny białek w genomach plastydowych tytoniu i wątrobowca są podobne, mimo że genom plastydowy tytoniu jest większy od genomu wątrobowca o przeszło 30 tpz. Plastydowy DNA w większości roślin dotychczas zbadanych zawiera dwa odwrotnie zorientowane



Ryc. 4. Ogólny schemat organizacji DNA plastydów [72]. IR — odcinki DNA o takiej samej sekwencji i odwrotnej orientacji; LR — duży rejon DNA o unikalnej sekwencji; SR — mały rejon DNA o unikalnej sekwencji; Strzałki oznaczają kierunek transkrypcji genów.

odcinki o takiej samej sekwencji (z ang. inverted repeat) i długości od 10 do 28 tpz [6, 51, 57, 76]. Odcinki te oddzielone są rejonami DNA o unikalnej sekwencji: tzw. duży rejon zawiera od 80 do 103 tpz, a rejon mały od 12,6 do 26,9 tpz (ryc. 4). Wyjątek stanowi tutaj genom plastydowy roślin motylkowych, np. grochu (*Pisum sativum*) i bobu (*Vicia faba*), w których nastąpiła delecja jednego z odcinków o powtórzonej sekwencji [49]. Natomiast u *Euglena gracilis* występują aż trzy tak samo zorientowane, kopie tego odcinka [36, 44, 51, 83, 85].

#### V. ORGANIZACJA GENÓW PLASTYDÓW

W genomie plastydów zidentyfikowano pełen zestaw genów kodujących: tRNA uczestniczące w syntezie plastydowych białek, przeszło 50 genów białek oraz geny wysokocząsteczkowych rRNA wchodzących w skład plastydowych rybosomów [35].

Geny rRNA w plastydach występują w obrębie odcinków o powtórzonej sekwencji. Każdy z odcinków zawiera rRNA ułożone w kolejności: 16S rRNA – przerywnik – 23S rRNA – 5S rRNA (ryc. 4).

Taki zespół genów rRNA w plastydach określa się mianem operonu rRNA. Ogólna organizacja analizowanych dotychczas operonów rRNA plastydów wykazuje duże ich podobieństwo do organizacji obserwowanej w organizmach prokariotycznych [89, 101]. Przerywnik oddzielający gen 16S rRNA od 23S rRNA składa się z 1,6–2,4 tpz i zawiera rozszczepione geny tRNA.

Najlepiej dotychczas poznane są geny 16S rRNA kukurydzy, tytoniu, wątrobowca i *Euglena*. 16S rRNA kukurydzy i tytoniu są zbudowane odpowiednio z 1491 i 1186 nukleotydów i wykazują między sobą 96,4% homologii. 16S rRNA kukurydzy wykazuje także 80% homologii sekwencji nukleotydowej z 16S rRNA *Euglena*, natomiast z rRNA *E. coli* 74,2% [48, 101, 109]. Obserwowane różnice pomiędzy 16S rRNA plastydów a 16S rRNA *E. coli* wynikają głównie z delecji nukleotydów w plastydowym rDNA. Delecja nukleotydów wpływa na redukcję pętli dodatkowych w strukturze II rzędu rRNA, co nie ma jednak znaczącego wpływu na geometrię całej cząsteczki.

Geny 23S rRNA plastydów tytoniu i kukurydzy zawierają odpowiednio 2804 i 2898 nukleotydów [100]. Ich sekwencje nukleotydowe wykazują 92% homologii między sobą, natomiast ich podobieństwo do genu 23S rRNA *E. coli* wynosi 67% w przypadku tytoniu i 71% w przypadku kukurydzy [102].

Rejony sekwencji nukleotydowej 23S rRNA o znanych funkcjach, takich jak np. wiązanie rybosomalnych białek  $L_1$  i  $L_2$ , interakcje podjednostek znanych plastydowych 23S rRNA, są w dużym stopniu zachowane. W 23S rRNA kukurydzy występują trzy insercje obejmujące 25 pz, 65 pz i 78 pz, które powodują pojawienie się dodatkowych pętli w strukturze II rzędu rRNA plastydów. Nie występują natomiast w strukturze rRNA *E. coli* [32].

W 23S rDNA *Chlamydomonas reinhardtii* znajduje się intron o długości 870 pz, w odległości 270 pz od końca 3' genu. W rejonie przylegającym do końca 5' genu 23S rDNA *Chlamydomonas* występują geny 7S rRNA i 3S rRNA, zbudowane odpowiednio z 282 i 47 pz [85]. Oba geny oddzielone są od siebie przerywnikiem o długości 23 pz oraz 81 pz od genu 23S rRNA. Sekwencje kodujące geny 7S i 3S rRNA, jak również je przedzielające są homologiczne do 5' końcowego fragmentu genów 23S rRNA *E. coli* i *Euglena*. Na końcu 3' sekwencji nukleotydowej 23S rDNA w genomie plastydowym roślin wyższych oraz paproci *Dryopteris acuminata* [99] znajduje się gen 4,5S rRNA. 4,5S rRNA jest zbudowany, w zależności od gatunku rośliny, z 96 – 103 pz [28] i wykazuje przeszło 60% homologii z sekwencją końca 3' rejonu 23S rDNA *E. coli*, dlatego przypuszcza się, że mógł on powstać w wyniku insercji około 100 pz w 3' końcowym rejonie genu 23S rRNA.

W większości znanych plastydowych operonów rRNA (także bakterii) znajduje się gen 5S rRNA [19, 65]. Gen ten oddzielony jest od poprzedzającego go genu (23S rRNA lub 4,5S rRNA) przerywnikiem, który jest zbudowany z przeszło 200 pz (np. u kukurydzy z 231 pz). 5S rRNA w zależności od gatunku roślin zawiera 111–122 nukleotydów [19, 23]. Sekwencje te wykazują dużą homologię z sekwencją 5S rRNA cyjanobakterii.

W plastydach roślin różnych gatunków stwierdzono obecność przeszło 30 genów tRNA [34, 71, 72, 106–108]. Geny tRNA w plastydach, podobnie jak u organizmów prokariotycznych, są zlokalizowane pojedynczo lub w zespołach w różnych rejonach cząsteczki plastydowego DNA. W genomie plastydowym *Euglena* stwierdzono obecność dwóch zespołów genów tRNA [42, 74]. W jednym z nich są zlokalizowane 4 geny tRNA, natomiast zespół drugi zawiera 6 genów tRNA. Niektóre z plastydowych genów tRNA mają sekwencje intronowe [34, 71, 72, 106–108, 114]. Introny te są bardzo długie w porównaniu z intronami obecnymi w jądrowych genach tRNA. Introny genów jądrowych zawierają tylko 11–60 pz zlokalizowanych po stronie 3' antykodonu, podczas gdy np. introny w plastydowych genach tRNA<sup>Ala</sup> kukurydzy i tRNA<sup>Leu</sup> tytoniu mają odpowiednio 806 i 503 pz [51, 116].

Najdłuższy znany intron plastydowego genu tRNA jest zbudowany z 2526 par zasad i występuje w tRNA<sup>Liz</sup> tytoniu [99]. Sekwencje intronowe w plastydowych genach tRNA są umieszczone przeważnie pomiędzy 1 a 2 lub 2 a 3 zasadą w antykodonie, wyjątek stanowi gen tRNA<sup>Gly</sup> plastydów tytoniu, który zawiera intron w pętli D [24, 73]. Rola intronów nie jest wyjaśniona. Sekwencje intronowe plastydowych genów tRNA zawierają otwarte ramki odczytu. Nie wiadomo jednak, czy ulegają one ekspresji.

Geny tRNA plastydów zawierające sekwencje intronowe podzielone na trzy grupy [97]. Do grupy pierwszej zaliczane są geny tRNA (jak np. tRNA<sup>Leu</sup> fasoli), których introny mogą tworzyć struktury podobne do takiej struktury, jaką proponowano w procesie autokatalitycznego rozpadu prekursorowego

rRNA *Tetrahymena*. Grupę drugą stanowią geny tRNA, których introny wykazują między sobą 95% homologii sekwencji (np. geny tRNA<sup>Ile</sup> i tRNA<sup>Ala</sup> z plastydów kukurydzy). Natomiast do grupy trzeciej-rozszczepionych genów tRNA należą geny tRNA, np. tRNA<sup>Liz</sup>, tRNA<sup>Gly</sup> tytoniu zawierające introny, których sekwencje przylegające do eksonów są podobne do sekwencji znajdowanych w intronach genów plastydowych białek. Geny tRNA plastydów nie kodują sekwencji terminalnej CCA.

Z poznanych dotąd sekwencji nukleotydowych kilkudziesięciu plastydowych tRNA wynika, że wykazują one wyższy stopień homologii do tRNA prokariotycznych niż do tRNA jądrowych [37]. W rejonach plastydowych DNA o unikalnej sekwencji znajdują się geny struktury dla niektórych białek [53, 61, 72]. W plastydach zidentyfikowano przeszło 55 genów kodujących białka i około 30 otwartych ramek odczytu zawierających od 31 do 2136 kodonów.

Wśród genów kodujących plastydowe białka stwierdzono występowanie genów kodujących dużą podjednostkę (LS) karboksylazy RuDP, białek wchodzących w skład fotosystemu I i II, kompleksu cytochromów b-f oraz podjednostek ATP-syntazy, około 1/3 białek wchodzących w skład plastydowych rybosomów (19 genów), białka podjednostek polimerazy RNA, białek biorących udział w transporcie elektronów oraz liczne otwarte ramki odczytu.

Analiza komputerowa wykazała, że 7 otwartych ramek odczytu ma sekwencje nukleotydowe podobne do sekwencji niektórych genów mitochondriów człowieka, np. genu podjednostki NADH dehydrogenazy [72].

Geny plastydowych białek występują pojedynczo lub w zespołach, podobnie jak u *E. coli*. W 12 genach plastydowych białek stwierdzono występowanie 1–9 intronów. Introny te zawierają charakterystyczne sekwencje graniczne podobne do 5'-NG<sup>T</sup>CGC<sup>T</sup>G.....TTTATTTATN-3' sekwencji najwyższej zgodności występujących w genomach jądrowych kodujących mRNA dla niektórych białek.

Obserwuje się znaczną zachowawczość genów kodujących plastydowe białka, występujących w roślinach różnych gatunków. Geny te wykazują także dużą homologię sekwencji z odpowiednimi genami cyjanobakterii. Wykazano, że w większości plastydowych białek zbudowanych z podjednostek, przynajmniej jedna z nich jest kodowana przez genom jądrowy.

## VI. TRANSKRYPCJA GENÓW PLASTYDÓW I MITOCHONDRIÓW

Plastydy i mitochondria zawierają zestaw enzymów uczestniczących w transkrypcji organelowego DNA. Geny mitochondrialne tRNA, rRNA i białek są transkrybowane przez pojedyncze polimerazy RNA kodowane

przez genom jądrowy [47, 117]. W mitochondriach szczura stwierdzono jednak występowanie dwóch różnych polimeraz RNA znacznie różniących się właściwościami.

Obie nici DNA mitochondrialnego ssaków są transkrybowane równocześnie w postaci dużych policistronowych RNA [9–11, 29]. Każda z nici zawiera własny obszar promotorowy, który jest zlokalizowany w pobliżu pętli D będącej równocześnie miejscem inicjacji replikacji DNA [54, 105]. Sekwencje tRNA są w pierwotnych transkryptach DNA mitochondrialnego ssaków sygnałami decydującymi o poprawnym rozcięciu transkryptu [91].

W genomach mitochondrialnych drożdży stwierdzono występowanie kilku rejonów, w których polimeraza RNA rozpoczyna transkrypcję mitochondrialnego DNA [75, 104]. W rejonach przylegających do końca 5' większości genów mitochondrialnych drożdży (w tym również genów tRNA) występuje sekwencja 5'-ATATAAGTA-3'. Stanowi ona rejon promotorowy rozpoznany przez mitochondrialne polimerazy RNA [9, 75]. Silne promotory genów mitochondrialnego tRNA zawierają w pozycji +2 adeninę, a w pozycji +3 tymidynę [108]. Geny tRNA mitochondriów drożdży, nie mające sekwencji promotorowej w rejonie przylegającym do końca 5' genu, są transkrybowane razem z mRNA, rRNA lub innymi tRNA (np. gen tRNA<sup>Wal</sup> jest transkrybowany wspólnie z genem trzeciej podjednostki oksydazy cytochromowej). Sygnały terminacji transkrypcji nie są poznane.

Pierwotne transkrypty genów mitochondrialnych tRNA zawierają sekwencje dodatkowe, które są usuwane w procesie dojrzewania cząsteczki. Sekwencje dodatkowe, przylegające do końca 5' są odcinane przez nukleazę, która ma właściwości podobne do bakteryjnej RNA-azy P i podobnie jak enzym bakteryjny wymaga kofaktorów, którymi są niskocząsteczkowe RNA.

Na końcach 3' pierwotnych transkryptów stwierdzono występowanie sekwencji 5'-AUUCUUA-3', która, jak się sądzi, może być sygnałem dla specyficznej nukleazy w procesie dojrzewania cząsteczki.

Plastydy zawierają pełen zestaw enzymów niezbędnych do transkrypcji plastydowych genów [38, 45]. W plastydach stwierdzono występowanie 2 różnych polimeraz RNA. Jedna z nich, zwana rozpuszczalną, bierze udział w transkrypcji genów tRNA, natomiast druga izolowana z kompleksu DNA-białko (zwana TAC), transkrybuje geny rRNA [38].

Polimerazy te znacznie różnią się wrażliwością na stężenie soli, na heparynę, na zmiany temperatury i obecność kationów. Plastydowe polimerazy RNA w przeciwieństwie do polimeraz jądrowych roślin (II i III) nie są wrażliwe na  $\alpha$  amanitynę. Aktywność rozpuszczalnej polimerazy plastydowej nie jest hamowana przez rifampicynę, która jak wiadomo, całkowicie inhibuje aktywność polimerazy RNA *E. coli*.

Sekwencje rozpoznawane przez polimerazy RNA plastydów nie są dokładnie poznane. W rejonie przylegającym do końca 5' genów plastydów stwier-

dzono występowanie sekwencji nukleotydowej podobnej do sekwencji promotorów *Prokaryota* w pozycji -10 i -35. Wykazano również, że rejonny te wiąże polimerazę RNA *E. coli*, która chroni te miejsca przed działaniem DNA-azy [52, 90]. Ponadto w rejonie 5' kilku genów tRNA plastydów stwierdzono występowanie sekwencji 5'-GTT<sup>AA</sup>NTATT<sup>AA</sup>-3', która zdaniem Gruissem i wsp. może być sekwencją promotorową dla polimeraz RNA plastydów [38].

Wykazano, że niektóre z genów kodujących plastydowe białka są transkrybowane jako policistronowe jednostki, np. geny kodujące  $\beta$  i  $\epsilon$  podjednostki ATP-syntazy w plastydach kukurydzy i tytoniu transkrybowane są wspólnie, a ich transkrypty zawierają odpowiednio 2,2 i 2,7 tpz [45, 53]. Geny 16S rRNA i 23S rRNA plastydów w większości badanych roślin są transkrybowane razem, a ich pierwotny transkrypt ma ciężar cząsteczkowy około  $2,7 \times 10^6$  [59, 63, 110, 118]. Gen tRNA<sup>Wal</sup> występujący w rejonie przylegającym do końca 5' operonu rRNA plastydów kukurydzy stanowi odrębną jednostkę transkrypcyjną [96].

Sekwencje DNA biorące udział w terminacji transkrypcji genów plastydów nie są dokładnie poznane. W rejonach 3' niektórych genów plastydów DNA może tworzyć struktury pętli i ramion, które przypuszczalnie są miejscem terminacji dla plastydowych polimeraz. Terminatory takie były proponowane np. dla genu podjednostki RuDP [119, 120]. Mechanizm regulacji transkrypcji plastydowych genów nie jest dokładnie poznany. Wiadomo jednak, że światło jest jednym z czynników regulujących ekspresję genów plastydów. Wykazano, że np. poziom plastydowego mRNA dla polipeptydu związanego z fotosystemem II zwiększa się pod wpływem światła [62].

## VII. UWAGI KOŃCOWE

Znane są pełne sekwencje nukleotydowe kilku genów mitochondrialnych i plastydowych. Stanowi to doskonałą podstawę do dalszych prac nad wyjaśnieniem procesów replikacji i ekspresji organelowych genów, oraz wzajemnego współdziałania pomiędzy genomem organelowym a cytoplazmą i jądrem komórki.

Wiele organelowych białek jest kodowanych przez genom jądrowy, a dla niektórych z białek zbudowanych z podjednostek przynajmniej jedna z podjednostek jest kodowana przez genom jądrowy, zaś pozostałe przez genom organelowy. Rozwój i funkcja organeli komórkowych są więc uzależnione od ich współdziałania z genomem jądrowym oraz mechanizmów kontrolujących i regulujących ekspresję DNA w różnych przedziałach komórkowych.

Struktura i organizacja wielu genów plastydów jest podobna do genów prokariotycznych, a sekwencje uczestniczące w inicjacji i terminacji plas-

tydowych genów są podobne do sekwencji rozpoznawanych przez prokariotyczne polimerazy. Podobieństwo genomu plastydów do genomu bakterii wskazuje na ich endosymbiotyczne pochodzenie. Teoria endosymbiotycznego pochodzenia organeli komórkowych zakłada, że DNA mitochondrialny i plastydowy pochodzą od różnych wolnożyjących prokariotów, które zaczęły żyć w symbiozie z komórką gospodarza i z biegiem czasu przekształciły się w jej organele.

Z drugiej strony stwierdzono, że mitochondrialny DNA roślin wyższych zawiera fragmenty DNA homologiczne do DNA plastydów [25, 43, 64, 69, 94]. Występowanie sekwencji homologicznych w obu genomach wskazuje na wspólne pochodzenie plastydowego i mitochondrialnego DNA. Organelowy DNA mógł więc powstać w wyniku fragmentacji i kompartmentacji DNA prokariotycznego glonu (tzw. teoria wewnętrznej kompartmentacji).

Występowanie identycznych fragmentów DNA w różnych organelach komórkowych wskazuje także na wzajemne przemieszczanie się DNA i jego rekombinację, pomiędzy różnymi przedziałami komórkowymi.

TABELA 1

Wymiary cząsteczki mitochondrialnego DNA z różnych organizmów (ciężar cząsteczki wyrażono w daltonach) [106]

Organizm	Kształt cząsteczki	Długość cząsteczki w $\mu\text{m}$	Ciężar cząsteczki $\times 10^6$
<i>Podospora anserina</i>	kolisty	31	61–63
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	"	21–25	46–52
<i>Torulopsis glabrata</i>	"	6.0	12.8
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	liniowy	15	32.6
<i>Paramecium aurelia</i>	"	13.8	35
<i>Trypanosoma brucei</i>	kolisty		
	cząsteczka duża	6.3	13
	cząsteczka mała	0.32	0.56
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	kolisty	4.5	9.8
Owady	"	5.0–6.2	9.91–12.35
Ryby	"	5.1–5.4	10.2–10.8
Płazy	"	4.7–5.8	5.4–11.7
Gady	"	5.3	10.6
Ssaki	"	4.7–5.5	9.4–11
Rośliny wyższe	kolisty i liniowy		
Kukurydza ( <i>Zea mays</i> )			320
Groch ( <i>Pisum sativum</i> )			70
Ogórek ( <i>Cucurbita pepo</i> )			560
Melon ( <i>Cucumis melo</i> )			1600



TABELA 2

Wymiary cząsteczki plastydowego DNA z różnych organizmów (ciężar cząsteczki wyrażono w daltonach) [106]

Organizm	Kształt cząsteczki	Długość cząsteczki w $\mu\text{m}$	Ciężar cząsteczki $\times 10^6$
<i>Codium fragile</i>	kolisty	27	56
<i>Euglena gracilis</i>	"	44.5	92-150
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	"	63	170-200
Kukurydza ( <i>Zea mays</i> )	"	43	87
Burak ( <i>Beta vulgaris</i> )	"	44.9	97-100

## PIŚMIENICTWO

- [1] ANDERSON S., BANKIER A. T., BARRELL B. G., DE BRUIJN M. H. L., COULSON A. R., DRONIN J., EPERON J. C., NIERLICH D. P., ROE B. A., SANGE F., SCHREIER P. H., SMITH A. J. H., STADEN R., YOUNG J. G., Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, **290**, 457-465, 1981.
- [2] ARNBERG A. C., VAN DER HORST G., TABAK H. K., Formation of lariats and circles in self-splicing of the precursor to the large ribosomal RNA of yeast mitochondria, *Cell*, **44**, 235-242, 1986.
- [3] ATTARDI G., Organization and expression of the mammalian mitochondrial genome: a lesson in economy, *Trend. Biochem. Sci.*, **6**, 86-89, 1981.
- [4] BARRELL B. G., BANKIER A. T., DRONIN J., A different genetic code in human mitochondria, *Nature*, **282**, 189-194, 1979.
- [5] BEDBROOK J. R., KOLODNER R., The structure of chloroplast DNA, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **30**, 593-620, 1973.
- [6] BEDBROOK J. R., KOLODNER R., BOGORAD L., *Zea mays* chloroplast ribosomal RNA genes are part of a 22000 base inverted repeat, *Cell*, **11**, 739-749, 1977.
- [7] BERTHIER F., RENAND H., ALZIARI S., DURAND R., RNA mapping on *Drosophila* DNA: precursors and template strands, *Nucl. Acids Res.*, **14**, 4512-4533, 1986.
- [8] BIBB M. J., VAN ETEN R. A., WRIGTH C. T., WALBERG W., CLAYTON D. A., Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA, *Cell*, **26**, 167-186, 1981.
- [9] BOGENHAGEN D. F., APPLGATE E. F., YOZA B. K., Identification of a promoter for transcription of the heavy strand of human mtDNA: in vitro transcription and deletion mutagenesis, *Cell*, **36**, 1105-1113, 1984.
- [10] BOGENHAGEN D. F., YOZA B. K., CAIRUS S. S., Identification of initiation sites for transcription of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA, *J. Biol. Chem.*, **261**, 8488-8494, 1986.
- [11] BONEN L., GRAY M. W., Organization and expression of the mitochondrial genome of plants. I. The gene for wheat mitochondrial ribosomal and transfer RNA, evidence for an unusual arrangement, *Nucl. Acids Res.*, **8**, 319-335, 1980.
- [12] BONEN L., HUH T. Y., GRAY M. W., Can partial methylation explain the complex fragment patterns observed when plant mitochondrial DNA is cleaved with restriction endonucleases?, *FEBS Lett.*, **111**, 340-346, 1980.
- [13] BORST P., Biosynthesis of mitochondria and chloroplast. [w:] *Molecular Biology of the Cell*, (wyd. S. Alberts, Porter K., Raff M. C., Roberts K., Watson J. D.), New York, 1981.
- [14] BÖCKELMANN B., ESSER K., Plasmids of mitochondrial origin in senescent mycelia of *Podospora curvicolle*, *Curr. Genet.*, **10**, 803-810, 1986.

- [15] BRAUN C. J., SISCO P. H., SEDEROFF R. R., LEVINGS III Ch. S., Characterization on inverted repeats from plasmid like DNAs and the maize mitochondrial genome, *Curr. Genet.*, **10**, 625–630, 1986.
- [16] BROWN G. G., BUSSEY H., DES ROSIERS L. J., Analysis of mitochondrial DNA, chloroplast DNA, and double-stranded RNA in fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). *Can. J. Genet. Cytol.*, **28**, 121–129, 1986.
- [17] BROWN W. M., The mitochondrial genome of animals, [w:] *Molecular evolutionary genetics*, (wyd. Roos J. Mac Intyre), 95–130, 1985.
- [18] CLARY D. O., WOLSTENHOLME D. R., A cluster of six tRNA genes in *Drosophila* mitochondrial DNA that includes a gene for an unusual tRNA<sup>Ser</sup> AGU, *Nucl. Acids Res.*, **12**, 2367–2378, 1984.
- [19] CORRY M. J., PAYNE P. J., DYER T. A., The nucleotide sequence of 5S rRNA from blue-green alga *Anacystis nidulans*, *FEBS Lett.*, **46**, 63–66, 1974.
- [20] GREWS S., ATTARDI G., The sequence of the small ribosomal RNA gene and the phenylalanine tRNA are joined end to end in human mitochondrial DNA, *Cell*, **19**, 775–784, 1980.
- [21] DE JONG L., HOLTROP M., KROON R., The biogenesis of rat mitochondrial ATP-ase two subunits are synthesized inside the mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **608**, 32–38, 1980.
- [22] DE LA SALLE H., JACQ C., SLONIMSKI P. P., Critical sequences within mitochondrial introns: pleiotropic mRNA maturase and cis-dominant signals of the box controlling reductase and oxidase, *Cell*, **28**, 721–723, 1982.
- [23] DELIHAS N., ANDERSON I., SPROUSE H. M., DUDOCK B., The nucleotide sequence of the chloroplast 5S ribosomal RNA from spinach, *Nucl. Acids Res.*, **9**, 2801–2805, 1981.
- [24] DENO H., SUGIURA M., Chloroplast tRNA<sup>Gly</sup> gene contains a long intron in the D stem. Nucleotide sequences of tobacco chloroplast gene for tRNA<sup>Gly</sup> (UCC) and tRNA<sup>Arg</sup> (UCU), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 405–408, 1984.
- [25] DRON M., HARTMAN C., RODE A., SEVIGNAC M., Gene conversion as a mechanism for divergence of a chloroplast tRNA gene inserted in the mitochondrial genome of *Brassica oleracea*, *Nucl. Acids Res.*, **13**, 8603–8610, 1985.
- [26] DUBIN D. T., HSUCHEN Ch. Ch., CLEAVES G. R., TIMKO K. D., Sequence and structure of a serine transfer RNA with GCU Anticodon from mosquito mitochondria, *J. Mol. Biol.*, **176**, 251–260, 1984.
- [27] DUJON B., [w:] *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Life Cycle and Inheritance*, (wyd. Strathern J. W., Jones E. W., Broach J. R.), Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [28] EDWARDS K., BEDGROOK J., DYER T., KOSSEL H., 4.5S rRNA from *Zea mays* chloroplasts shows structural homology with 3' end of procaryotic 23S rRNA, *Biochem. Int.*, **2**, 533–538, 1981.
- [29] FISHER R. P., CLAYTON D. A., A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase: accurate initiation at the heavy and light strand promoters dissected and reconstituted in vitro, *J. Biol. Chem.*, **259**, 11330–11338, 1984.
- [30] FOX T. D., Multiple forms of mitochondrial DNA in higher plants, *Nature*, **307**, 415, 1984.
- [31] FOX T. D., LEAVER C. J., The *Zea mays* mitochondrial gene coding cytochrome oxidase subunit II has an intervening sequence, and does not contain TGA codons, *Cell*, **26**, 315–323, 1981.
- [32] GLOTZ G., ZWIEB C., BRIMACOMBE R., EDWARDS K., KOSSEL H., Secondary structure of the large subunit ribosomal RNA from *Escherichia coli*, *Zea mays* chloroplasts and human and mouse mitochondrial ribosomes, *Nucl. Acids Res.*, **9**, 3287–3306, 1981.
- [33] GORĄCZNIK R., AUGUSTYNIAK H., Małe cząsteczki DNA występujące w mitochondriach, *Post. Biol. Kom.*, **15**, 345–366, 1988.

- [34] GOŹDZICKA-JÓZEFIAK A., PĘDZIWIŁK K., AUGUSTYNIAK J., Estimation of tRNA genes in wheat chloroplast DNA. A fraction of chloroplast tRNA hybridizes both to the chloroplast and mitochondrial DNA, FEBS Congres, Brussel, 1983.
- [35] GRAY J., Wonders of chloroplast DNA, *Nature*, **322**, 501–502, 1986.
- [36] GRAY M. W., HALLICK R. B., Physical mapping of the *Euglena gracilis* chloroplast DNA and ribosomal RNA gene region, *Biochemistry*, **17**, 284–289, 1978.
- [37] GRAY M. W., SPENCER D. F., Wheat mitochondrial DNA encodes a eubacteria-like initiator methionine transfer RNA, *FEBS Lett.*, **161**, 323–327, 1983.
- [38] GRUISSEM W., NARTIA J. O., GREENBERG B. M., PRESCOTT D. M., HALLICK R. B., Selective in vitro transcription of chloroplast genes, *Can. J. C. B.*, 22131–22146, 1983.
- [39] HADDI A., Relationship of viroids and certain other plant nucleic acids to group I and II introns, *Plant. Mol. Biol.*, **7**, 129–141, 1986.
- [40] HALL B. B., Mitochondria spring surprises, *Nature*, **282**, 129–130, 1979.
- [41] HANSWIRTH W. W., LAIPIS P. J., GILMANN M. E., O'BRIEN T. W., MICHAELS G. S., RAYFIELD M. A., Genetic mapping of bovine mitochondrial DNA from a single animal, *Gene*, **8**, 193–209, 1980.
- [42] HOLLINGWORTH M. J., HALLICK R. B., *Euglena gracilis* chloroplast transfer RNA transcription units. Nucleotide sequence analysis of a tRNA<sup>Tyr</sup>-tRNA<sup>His</sup>-tRNA<sup>Met</sup>-tRNA<sup>Try</sup>-tRNA<sup>Glu</sup>-tRNA<sup>Gly</sup> gene cluster, *J. Biol. Chem.*, **257**, 12795–12799, 1982.
- [43] IAMS K. P., HECKMAN J. E., SINCLAIR J. H., Sequences of histidyl tRNA, present as a chloroplast insert in mtDNA of *Zea mays*, *Plant. Mol. Biol.*, **4**, 225–233, 1985.
- [44] JENNI B., STUTZ E., Physical mapping of the ribosomal DNA region of *Euglena gracilis* chloroplast DNA, *Eur. J. Biochem.*, **88**, 127–134, 1978.
- [45] JOLLY S. O., Mc INTOSH L., LINK G., BOGORAD L., Differential transcription in vitro and in vivo of two adjacent maize chloroplast genes: the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase and the 2.2 kilobase gene, *Proc. Natl Acad. Sci.*, **78**, 6821–6825, 1981.
- [46] KADOWAKI K., OSUMI I., NEMOTO H., HARADA K., SHINJŌGO C., Mitochondrial DNA polymorphism in male-sterile cytoplasm of rice, *Theor. Appl. Genet.*, **75**, 234–236, 1988.
- [47] KELLY J. L., LEHMAN I. R., Yeast mitochondrial polymerase purification and properties of the cathalic subunit, *J. Biol. Chem.*, **261**, 10340–10347, 1986.
- [48] KOCH W., EDWARDS K., KOSSEL H., Sequencing of the 16S–23S spacer in a ribosomal RNA operon of *Zea mays* chloroplast DNA reveals two split tRNA genes, *Cell*, **25**, 203–213, 1981.
- [49] KOLLER B., DELIUS H., *Vicia faba* chloroplast DNA has only one set of ribosomal RNA genes as shown by partial denaturation mapping and R loop analyses, *Mol. Gen. Genet.*, **178**, 261–269, 1980.
- [50] KOŁODNER R., TEWARI K. K., The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **402**, 372–390, 1975.
- [51] KOŁODNER R., TEWARI K. K., Inverted repeats in chloroplast DNA from higher plants, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **76**, 41–45, 1979.
- [52] KOSSEL H., NATT E., STRITTMATTER G., FRITSCH E., GOŹDZICKA-JÓZEFIAK A., PRZYBYŁ D., Structure and expression of rRNA operons from plastids of higher plants, [w:] Molecular form and function of the plant genome, (wyd. van Vloten-Doting L., Gert S. P., Groot T., Hall T. C.), 1985.
- [53] KREBBERS E. T., LARRINUA J. M., Mc INTOSH L., BOGORAD L., The maize chloroplast genes for the and subunits of the photosynthetic coupling factor CF<sub>1</sub> are fused, *Nucl. Acids Res.*, **10**, 4985–5002, 1982.
- [54] KRUSZEWSKA A., BOGUTA M., Struktura i funkcje mitochondrialnych genomów, *Post. Biol. Kom.*, **15**, 327–346, 1988.

- [55] KÖCHEL H. G., KÜNTZEL H., Mitochondrial L-rRNA from *Aspergillus nidulans*: potential secondary structure and evolution, *Nucl. Acids Res.*, **10**, 4795–4801, 1982.
- [56] KÖCHEL H. G., LAZARUS C. M., BASAK N., KUNTZEL H., Mitochondrial tRNA gene of *Aspergillus nidulans*. Organization and nucleotide sequences, *Cell*, **23**, 625–633, 1981.
- [57] LARRINUA J. M., MUSKAWITCH K. M. T., GUBBINS E. J., BOGORAD L., A detailed restriction endonuclease site of the *Zea mays* plastid genome, *Plant. Mol. Biol.*, **2**, 129–140, 1983.
- [58] LEAVER C. J., GRAY M. W., Mitochondrial genome organization and expression in higher plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 372–402, 1982.
- [59] LEAVER C. J., HARMEY M. A., Higher plant mitochondrial ribosomes RNA component, *Biochem. J.*, **157**, 275–277, 1976.
- [60] LEVINGS III Ch. S., The plant mitochondrial genome and mutants, *Cell*, **32**, 659–661, 1983.
- [61] LINK G., Cloning and mapping of the chloroplast DNA sequences for two messenger RNAs from mustard (*Sinapis alba* L.), *Nucl. Acids Res.*, **9**, 3681–3694, 1981.
- [62] LINK G., Phytochrome control of plastid mRNA in mustard (*Sinapis alba* L.), *Planta*, **15**, 725–731, 1982.
- [63] LOISEAUX S., ROZIER C., DALMON J., Plastidal origin of a large ribosomal precursor molecule in the brown alga *Phyladiella littoralis* (L.), *Plant. Sci. Lett.*, **18**, 381–388, 1980.
- [64] MAARSE A. C., GRIVELL L. A., Nucleotide sequence of the gene encoding the 11KDa subunit of the ubiquinol-cytochrome-C oxidoreductase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.*, **165**, 419–425, 1987.
- [65] MAC KAY R. M., SALGADO D., BONEN L., STRACKERBRANDT E., DOOLITTLE W. F., The 5S ribosomal RNAs of *Paracoccus denitrificans* and *Prochloron*, *Nucl. Acids Res.*, **10**, 2963–2970, 1982.
- [66] MARECHAL L., GUILLEMAUNT P., GRIENENBERGER J. M., JEANNIN G., WEIL J. H., Structure of bean mitochondrial tRNA<sup>Phe</sup> and localization of the mitochondrial genomes of maize and wheat, *FEBS Lett.*, **184**, 289–293, 1985.
- [67] MARECHAL L., GUILLEMAUNT P., GRIENENBERGER J. M., JEANNIN G., WEIL J. H., Sequence and codon recognition of bean mitochondria and chloroplast tRNA<sup>Trp</sup>: evidence for a high degree of homology, *Nucl. Acids Res.*, **13**, 4411–4416, 1985.
- [68] MARECHAL L., GUILLEMAUNT P., GRIENENBERGER J. M., JEANNIN G., WEIL J. H., Sequences of initiator and elongator methionine tRNAs in bean mitochondria, *Plant Mol. Biol.*, **7**, 245–253, 1986.
- [69] MARECHEAL L., GUILLEMAUNT P., WEIL J. H., Sequences of two bean mitochondria tRNA<sup>Tyr</sup> which differ in the level of post-transcriptional modification and have a prokaryotic like large extra loop, *Plant. Mol. Biol.*, **5**, 347–351, 1985.
- [70] MICHEL F., DUJON B., Conservation of RNA secondary structures in two intron including mitochondria, chloroplast and nuclear members, *EMBO*, **2**, 33–38, 1983.
- [71] NETZKER R., KÖCHEL H. G., BASAK N., KÜNTZEL H., Nucleotide sequence of *Aspergillus nidulans* mitochondrial genes coding for ATPase subunit 6, cytochrome oxidase subunit 3, seven unidentified proteins, four tRNAs and L rRNA, *Nucl. Acids Res.*, **10**, 4783–4794, 1982.
- [72] OHMA K., FUKUZAWA H., KOHCHI T., SHIRAI H., SANO T., SANO S., UMESONO K., TAKEUCHI M., CHANG Z., AOTA S., INOKUCHI H., OZEKI H., Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA, *Nature*, **322**, 572–574, 1986.
- [73] OHMA M., KAMOGASHIRA T., SHINOZAKI K., SUGIURA M., Location and sequences of tobacco chloroplast genes for tRNA<sup>Pro</sup> (UGG), tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Met</sup> and tRNA<sup>Gly</sup> (GCC). The tRNA<sup>Gly</sup> contains only two base pairs in the D stem, *Nucl. Acids Res.*, **12**, 6741–6749, 1984.

- [74] OROZCO E. M., HALLICK R. B., *Euglena gracilis* chloroplast transfer RNA transcription units II. Nucleotide sequence analysis of a tRNA<sup>Val</sup>-tRNA<sup>Asn</sup>-tRNA<sup>Arg</sup>-tRNA<sup>Leu</sup> gene cluster, *J. Biol. Chem.*, **257**, 3265-3275, 1982.
- [75] OSINGA K. A., DE HANN M., CHRISTIANSON T., TABAK H. F., A nonnucleotide sequence involved in promotion of ribosomal RNA synthesis and RNA priming of DNA replication in yeast mitochondria, *Nucl. Acids Res.*, **10**, 7993-8006, 1982.
- [76] PALMER J. D., Comparative organization of chloroplast genomes, *Ann. Rev. Genet.*, **19**, 325-354, 1985.
- [77] PALMER J. D., SHIELDS C. R., Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome, *Nature*, **307**, 437-440, 1984.
- [78] PARKS T. D., DOUGHERTY G., LEVINGS III C. S., TIMOTHY D. H., Identification of two methionine transfer RNA genes in the maize mitochondrial genome, *Plant. Physiol.*, **76**, 1079-1082, 1984.
- [79] PRING D. R., LEVINGS III C. S., HU W. W.-L., TIMOTHY D. H., Unique DNA associated with mitochondria in the S type cytoplasm of malesterile maize, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74**, 2904-2908, 1977.
- [80] PRING D. R., LONSDALE D. M., The higher plant mitochondrial genome, *Int. Rev. Cytol.*, **97**, 1-46, 1985.
- [81] PRING D. R., LONSDALE D. M., GRACEN V. E., SMITH A. G., Mitochondrial DNA duplication/deletion events and polymorphism of the C group of male sterile maize cytoplasm, *Theor. Appl. Genet.*, **73**, 646-653, 1987.
- [82] RAMIREZ J. L., DAWID I. B., Mapping of mitochondrial DNA in *Xenopus laevis* and *X. borealis* the position of ribosomal genes and D-Loops, *J. Mol. Biol.* **263**, 119-146, 1987.
- [83] RAWSON J. R. Y., KUSHNER S. R., VAPNEK D., ALTON N. K., BOERMA C. L., Chloroplast ribosomal RNA genes in *Euglena gracilis* exist as three clustered tandem repeats, *Gene*, **3**, 191-209, 1978.
- [84] ROE B. A., MA D. P., WILSON R. K., WANG J. H., The complete nucleotide sequence of *Xenopus laevis* mitochondrial genome, *J. Biol. Chem.*, **260**, 9759-9774, 1985.
- [85] ROCHAIX J. D., DARLIX J. L., Composite structure of the chloroplast 23S rRNA genes of *Chlamydomonas reinhardtii*: evolutionary and functional implications, *J. Mol. Biol.*, **159**, 383-395, 1982.
- [86] SACCONI C., CANTATORE P., GADALETA G., GALLERANI R., LANQVE C., PEPE G., KROON A. M., The nucleotide sequence of the large ribosomal RNA gene and the adjacent tRNA genes from rat mitochondria, *Nucl. Acids Res.*, **9**, 4139-4148, 1981.
- [87] SCHATZ G., How mitochondria import proteins from the cytoplasm, *FEBS Lett.*, **103**, 201-210, 1979.
- [88] SCHARDL L., LONSDALE D. M., PRING D. R., ROSE K. R., Linearization of maize mitochondrial chromosomes by recombination with linear episomes, *Nature*, **310**, 292-296, 1984.
- [89] SCHWARZ Z., KOSSEL H., The primary structure of 16S rDNA *Zea mays* chloroplast i homologous to *E. coli* 16S rRNA, *Nature*, **283**, 739-742, 1980.
- [90] SCHWARZ Z., KOSSEL H., SCHWARZ E., BOGORAD L., A gene coding for tRNA<sup>Val</sup> is located near 5' terminus of 16S rRNA gene in *Zea mays* chloroplast genome, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **78**, 4748-4752, 1981.
- [91] SLONIMSKI P. P., BORST P., ATTARDI G., Mitochondrial genes, Cold Spring Harbor Lab., New York, 1981.
- [92] SMITH A. G., PRING D. R., Nucleotide sequence and molecular characterization of a maize mitochondrial plasmid-like DNA, *Curr. Genet.*, **12**, 617-623, 1987.
- [93] SOR F., FUKUHARA H., Nature an inserted sequence in the mitochondrial gene coding for the 15S ribosomal RNA of yeast, *Nucl. Acids Res.*, **10**, 1626, 1982.

- [94] STERN D. B., LONSDALE D. M., Mitochondrial and chloroplast genomes of maize have a 12 kilobase DNA sequence in common, *Nature*, **299**, 698–702, 1982.
- [95] STERN D. B., PALMER J. D., Tripartite mitochondrial genome of spinach: physical structure, mitochondrial gene mapping and location of transposed chloroplast DNA sequences, *Nucl. Acids Res.*, **14**, 5651–5666, 1986.
- [96] STRITTMATTER G., GOŹDZICKA-JÓZEFIAK A., KOSSEL A., Identification an rRNA operon promoter from *Zea mays* chloroplast which excludes the proximal tRNA<sup>Val</sup> GAC from the primary transcript, *EMBOJ*, **4**, 599–604, 1985.
- [97] SUGITA M., SHINOZAKI K., SUGIURA M., Tobacco chloroplast tRNA<sup>Lys</sup> UUU gene contain a 2.5 kilobase-pair intron. An open reading frame and a conserved boundary sequence in the intron, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**, 3557–3561, 1985.
- [98] TABAK H. F., VAN DER HORST G., OSINGA K. A., ARNBERG A. C., Splicing of large ribosomal precursor RNA and processing of intron RNA in yeast mitochondria, *Cell*, **39**, 623–629, 1984.
- [99] TAKAIWA F., KUSUDA M., SUGIURA M., The nucleotide sequence of chloroplast 4,5S rRNA from fern, *Dryopteris acuminata*, *Nucl. Acids Res.*, **10**, 2257–2260, 1982.
- [100] TAKAIWA F., SUGIURA M., The complete nucleotide sequence of a 23S rRNA gene from tobacco chloroplast, *Eur. J. Biochem.*, **124**, 13–19, 1982.
- [101] TOHDON N., SUGIURA M., The complete nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene from tobacco chloroplasts, *Gene*, **17**, 213–218, 1982.
- [102] TEWARI K. K., [w:] *Nucleic Acids in Plants*, (wyd. Hall T. C., Davies J. W.), t. I, 41–108, CRC Press Boca Raton, 1979.
- [103] TZAGOLOFF A., MACINO G., SEBALD W., Mitochondrial genes and translation products, *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 419–441, 1979.
- [104] TZAGOLOFF A., MYERS A. M., Genetics of mitochondrial biogenesis, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 249–285, 1986.
- [105] WALBERG M. W., CLAYTON D. A., In vitro transcription of human mitochondrial DNA: identification of specific light strand transcripts from the displacement loop region, *J. Biol. Chem.*, **258**, 1268–1275, 1983.
- [106] WALLACE D. C., Structure and evolution of organelle genomes, *Microbiol. Rev.*, **46**, 208–240, 1982.
- [107] WEIL J. H., Organization and expression of the chloroplast genome, *Plant Science*, **49**, 149–157, 1987.
- [108] WETTSTEIN-EDWARDS J., TICHO B. S., MARTIN N. C., NAJARIAN D., GETZ G. S., In vitro transcription and promoter strength of five mitochondrial tRNA promoters in yeast, *J. Biol. Chem.*, **25**, 2905–2911, 1986.
- [109] Whitfeld P. R., BOTTOMLEY W., Organization and structure of chloroplast genes, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **34**, 279–310, 1983.
- [110] WRIGHT R. M., LAPING J. L., HOORUM M. A., CUMMINGS D. J., Mitochondrial DNA from *Podospora anserina*. III. Cloning, physical mapping and localization of the ribosomal RNA genes, *Mol. Gen. Genet.*, **185**, 56–64, 1984.
- [111] VAN DER VEEN R., ARNBERG A. C., VAN DER HORST G., BONEN L., TABAK H. F., GRIVELL L. A., Excised group II introns in yeast mitochondria are lariats and can be formed by self-splicing in vitro, *Cell* **44**, 225–234, 1986.
- [112] VAN DER VEEN R., KWAKMAN J. H. J. M., GRIVELL L. A., Mutations at the lariat acceptor site allow self splicing of a group II intron without lariat formation, *EMBO J.*, **6**, 3827–3831, 1987.
- [113] VILLS J. H., TROUTMAN W. B., RIBBSBY W. S., Circular mitochondrial genome of *Candida albicans* contains a large inverted duplication, *J. Biol. Chem.*, **164**, 7–13, 1985.
- [114] YAMADA K., SHINOZAKI K., SUGIURA M., DNA sequences of tobacco chloroplast

- genes for tRNA<sup>Ser</sup> GGA, tRNA<sup>Thr</sup> UGU, tRNA<sup>Leu</sup> UAA, tRNA<sup>Phe</sup> GAA, tRNA<sup>Leu</sup> gene contains a 503 bp intron, *Plant. Mol. Biol.*, **6**, 193–199, 1986.
- [115] YAMAGUCHI H., KAKIUCHI H., Electrophoretic analysis of mitochondrial DNA from normal and male sterile cytoplasm in rice, *Jpn. J. Genet.*, **58**, 607–611, 1983.
- [116] YOUNG E. G., HANSON M. R., A Fuseol mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated, *Cell*, **50**, 41–49, 1987.
- [117] ZASSENHAUS H. P., MARTIN N. C., BUTOW R. A., Origin of transcripts of the yeast mitochondrial vac 1 gene, *J. Biol. Chem.*, **9**, 6019–6027, 1984.
- [118] ZENKE G., EDWARDS K., LANGRIDGE P., KOSSEL H., The rRNA operon from maize chloroplast: analysis of in vivo transcription products in relation to its structure, [w:] *Cell Function and Differentiation*, (wyd. Akayunoglou G.), New York. 1982.
- [119] ZURAWSKI G., BOTTOMLEY W., WHITFELD P. R., Structure of the genes for the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of spinach chloroplast ATPase indicates a dicistronic mRNA and an overlapping translation stop star signal, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **79**, 6260–6264, 1982.
- [120] ZURAWSKI G., PERROT B., BOTTOMLEY W., WHITFELD P. R., The structure of the gene for one large subunit of ribulose 1,5 biphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA, *Nucl. Acids Res.*, **9**, 3251–3270, 1981.

*Otrzymano: 4 maja 1989.*

*Przyjęto: 15 czerwca 1989.*

*Adres autorki: ul. Fredry 10, 61-701 Poznań.*





Redakcja „Postępów Biologii Komórki” uprzejmie prosi o zgłaszanie pod adresem:

Redakcja „Postępów Biologii Komórki”  
ul. Marymoncka 99/103  
01-813 Warszawa

chęci prenumeraty czasopisma w 1990 r. Ceny rocznej prenumeraty nie znamy, chociaż jest szacowana na 20–40 tys. zł. Instytucjom i osobom prywatnym zgłaszającym się przekazemy w terminie późniejszym nr konta i dokładną należność za prenumeratę czasopisma.

*Redakcja*

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

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise  
ARS POLONA  
00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland.

Our bankers:  
BANK HANDLOWY S.A. 20 1061-710-15107-787

## TREŚĆ

M. VAN DER PLOEG, Hybridocytochemistry — state of the art . . . . .	349
Z. M. RUPNIEWSKA, M. KOWAL, Białaczka o mieszanym fenotypie . . . . .	365
M. POREBSKA-BUDNY, Powstawanie melanosomów w komórkach barwnikowych oraz ich udział w biosyn-tezie melaniny u ssaków . . . . .	417
A. GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, Organizacja i transkrypcja genów mitochondriów i plastydów . . . . .	431