

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

TOM 18-NR 3'91
(153 – 200)

Postępy Biologii Kórnórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium:

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

Rada Redakcyjna:

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

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

Fundacja • ROZWÓJ SGGW-AR •

Ark. wyd. 4,5 Ark. druk. 3,0

Oddano do składu w czerwcu 1991 r. Podpisano do druku w lipcu 1991 r. Druk ukończono w sierpniu 1991 r.

Wykonano w Zakładach Graficznych Wydawnictw Naukowych, Łódź, ul. Żwirki 2

WSPÓŁCZESNE POGLĄDY NA TEMAT REGULACJI CYKLU KOMÓRKOWEGO

CONTEMPORARY VIEW OF THE CELL CYCLE CONTROL REGULATION

Cezary WÓJCIK

Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie. Ostatnie lata przyniosły szereg nowych odkryć dotyczących zjawisk zachodzących w trakcie cyklu komórkowego zarówno komórek somatycznych, jak i embrionalnych. Doprowadziło to, z jednej strony, do poznania zasad działania MPF (*maturation promoting factor*), a z drugiej – do poznania grupy genów *cdc* (*cell division control*) u drożdży. Początkowo niespójne wyniki zaczęły się układać w logiczną całość umożliwiając tym samym sformułowanie uniwersalnej teorii kontroli cyklu komórkowego, opierającej się na założeniu, iż istnieją dwa stabilne stany komórki: metafazowy i interfazowy, zdeterminowane poziomem aktywności kinazy zawierającej w swoim składzie $p34^{cdc2}$.

Summary. The last few years brought a number of new discoveries concerning facts occurring in the cell cycle, both somatic and embrionic. It resulted, from one side, in the knowledge of the MPF (maturation promoting factor) action principles, and from the other – in a *cdc* (cell division control) genes groups in yeasts. At the beginning the incoherent results have begun to make one logical and universal theory of the cell cycle control based on the presumption that there exist only two stable cell states: the metaphase one and an interphase one. They are determined by the activity level of the $p34^{cdc2}$ containing kinase.

WSTĘP

Przez długi okres badania nad kontrolą cyklu komórkowego toczyły się dwoma oddzielnymi torami, z jednej strony dotyczyły one cyklu somatycznego, a z drugiej strony wczesnego cyklu embrionalnego. Uzyskane wyniki pozostawały ze sobą w zasadniczej sprzeczności, doprowadzając do powstania dwóch odmiennych hipotez tłumaczących obserwowane zjawiska.

Badania nad cyklem somatycznym prowadzone były przede wszystkim na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Schizosaccharomyces pombe*, jak również na różnych liniach komórkowych, przeważnie fibroblastów mysich hodowanych *in vitro*. Doprowadziły

one do sformułowania tezy, iż na cykl komórkowy można patrzeć jak na szereg etapów, gdzie rozpoczęcie każdego jest uzależnione od ukończenia poprzedniego [27]. Ta zależność cyklu komórkowego może polegać na tym, że produkt każdego etapu jest jednocześnie substratem do następnego (podobnie jak w tradycyjnie opisywanych szlakach przemian biochemicznych), jak również na systemie kontroli typu sprzężenia zwrotnego. Opierając się na tym ostatnim założeniu wyodrębniono trzy główne punkty uchwytu kontroli cyklu: mianowicie punkt Start w trakcie G1 (w dużej mierze pozostający pod kontrolą egzogenną, np. czynników wzrostu, dostępności substancji odżywczych), punkt na pograniczu G2/M uzależniony od ukończenia syntezy DNA oraz różnych endogennych czynników niezbędnych do wejścia w mitozę oraz punkt na pograniczu metafazy i anafazy uzależniony od sprawności aparatu mitotycznego [34, 54].

Badania nad wczesnym cyklem embrionalnym prowadzone były na zarodkach żab, roztwiarz, mięczaków i jeźowców. Doprowadziły one do wykrycia kompleksu białkowego, nazwanego MPF (*maturation promoting factor* lub *M-phase promoting factor*), zdolnego do indukowania fazy M, a wykazującego wysoką aktywność na przejściu G2/M do przejścia metafaza/anafaza. Wykazano także powszechne występowanie grupy białek zwanych cyklinami, których poziom w komórce ulega wahaniom synchronicznym z przebiegiem cyklu i poziomem aktywności MPF. Nie zdołano jak dotychczas wykryć w tym cyklu wyraźnych kontroli typu sprzężenia zwrotnego, gdyż ani inhibicja syntezy DNA, ani zniszczenie układu mikrotubuli, ani nawet enukleacja jaja nie zapobiegły oscylacji cytoplazmy pomiędzy stanem interfazowym a stanem charakterystycznym dla fazy M. Wykazano w ten sposób istnienie autonomicznego oscylatora cytoplazmatycznego, który wyzwała zmiany strukturalne i czynnościowe w jądrze komórkowym, jednakże nie zależy od nich [1, 22, 26, 31, 32, 57].

W ostatnich latach można było pogodzić ze sobą te dwa odmienne punkty widzenia i pokusić się o stworzenie jednolitej teorii, tłumaczącej zjawiska zachodzące zarówno w cyklu somatycznym, jak i embrionalnym [23, 38, 43].

FAZA G1

Komórka, która rozpoczyna cykl, startuje albo z fazy M poprzez G1 albo z Go. Fazy Go i G1 wykazują podobieństwo, gdyż w obydwu przypadkach komórka ma niezduplikowany DNA i musi przejść fazę S, aby ostatecznie ulec podziałowi. Między tymi stanami istnieją jednak zasadnicze różnice. Komórki znajdujące się w Go zmniejszają stopniowo swój rozmiar, gdyż współczynnik degradacji RNA i białek przewyższa współczynnik ich syntezy, która wynosi zaledwie 1/3 szybkości, z jaką komórki w G1 resyntetyzują swoje makrocząsteczki. W fazie Go jest bardzo niska aktywność enzymów i transporterów błonowych w porównaniu z fazą G1, a rybosomy występują przeważnie w stanie monosomalnym. Wykazano także, iż w Go pojawiają się pewne, bliżej nie zidentyfikowane białka oraz mRNA nieobecne w pozostałych fazach cyklu. Wreszcie przejście z Go do S trwa dłużej niż z M do S. Można się nie zgodzić z częścią wymienionych tu postulatów dotyczących fazy Go, argumentując, że pewne komórki, np. nerwowe, cechują się bardzo wysokim metabolizmem, pomimo iż są w tej fazie. Oczywiście, jest to pewne uogólnienie wyników otrzymanych z badań *in vitro* ustabilizowanej linii fibroblastów mysich, ale wydaje się ono słuszne,

jeżeli spojrzymy na losy tych komórek w ciągu wystarczająco długiego przedziału czasowego [5, 27].

W fazie G1 odbywa się kontrola proliferacji komórek, przełączanie na Go i odwrotnie oraz uruchomienie różnicowania się komórek, a więc procesy zależne w znacznej mierze od czynników zewnątrzkomórkowych, a przy tym niezwykle ważne w kontroli wszystkich populacji komórkowych makroorganizmu. Dość długo toczył się spór o to, czy we wczesnym cyklu embrionalnym, przed tzw. *midblastula transition*, występuje w ogóle faza G1, jak również G2. Dziś można powiedzieć, że z całą pewnością występują obydwie te fazy, a pozorny ich brak wynika z tego, że zdarzenia charakterystyczne dla np. G1 zaszły w większości wcześniej, jeszcze w poprzednim cyklu w fazie S i przygotowaniu się komórki do podziału [62]. Mamy tu więc do czynienia w zasadzie z sytuacją, gdy komórka znajduje się jednocześnie w dwóch fazach cyklu. Jedynie faza M nie może zachodzić na fazę S i vice versa, co jest zresztą oczywiste. To "zachodzenie na siebie" (*overlapping*) faz cyklu tłumaczy nam różną długość trwania fazy G1 i G2 w komórkach różnych tkanek tego samego organizmu, przy względnie stałym czasie trwania fazy S i M na danym etapie rozwoju filogenetycznego. Czas trwania przede wszystkim G1 jest odpowiedzialny za czas, w którym zachodzi cały cykl, gdyż jest to faza, której długość trwania ulega największym modyfikacjom.

Faza G1 nie jest jednorodna i wyróżnia się obecnie w niej podokresy, przy czym podział ten jest różny u różnych autorów. Pomiedzy poszczególnymi podokresami występują tzw. punkty zwrotne, spośród których kluczowe znaczenie zdaje się mieć punkt R, czyli Start, gdyż występuje on w normalnie proliferujących komórkach, podczas gdy pozostałe punkty określono u populacji zahamowanych w Go, a dążących do S. Wyróżnia się więc następujące etapy: kompetencja, punkt C (*control*), wejście (G1a), punkt V (*verification*), progresja (G1b), punkt R (*restriction*) i montaż [62].

Kompetencja jest to stan spowodowany w fibroblastach działaniem płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF), u innych komórek wyzwalany przez bombeszynę, a u większości jeszcze nie udowodniony, w którego czasie zachodzi reorganizacja struktury chromatyny, przyspieszenie transportu przez błony oraz pojawiają się nowe mRNA. Po przejściu punktu C, kompetentne komórki poddane działaniu EGF oraz insuliny osiągają fazę S. Jeżeli jednak ograniczy się im podaż czynników odżywczych (np. egzogenicznych aminokwasów), to zatrzymują się one w punkcie V po okresie wejścia. Gdy umieści się je w pełnowartościowej pożywce, osiągają S w ciągu czasu równego trwaniu G1 u normalnie proliferujących komórek. Biochemia tego okresu jest mało poznana, choć wykazano wzrost zawartości enzymów glikolitycznych i nagromadzenie polisomów w cytoplazmie. Okres ten jednak prawdopodobnie nie odpowiada jakiegóż określonej fazie G1 u normalnie proliferujących komórek pomimo zbieżności w czasie. Po przejściu punktu V następuje okres progresji, w której czasie wymagane jest działanie insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (IGF1) oraz wzmożona dostawa aminokwasów, gdyż zachodzi intensywne synteza białek, w tym enzymów niezbędnych w fazie S. Komórki łatwo jest zablokować na tym etapie inhibitorami syntezy białek.

Komórki, które przeszły fazę progresji, zatrzymują się w punkcie R, który mogą przejść dopiero po nagromadzeniu się bliżej nie poznanego białka do poziomu progowego. Mechanizm ten przypomina gromadzenie cyklin niezbędne do przejścia G2/M (patrz dalej). Ostatnio wykryto białko, które odpowiada tym wymaganiom, a mianowicie p68 [38]. Jest ono syntetyzowane w G1, ale ma krótki T 1/2, natomiast jest stabilne w komórkach

nowotworowych. Czy jest to rzeczywiście poszukiwane białko regulatorowe, tego na pewno nie wiadomo. Ponieważ punkt R odpowiada punktowi Start w cyklu drożdży, dalsze badania nad mutantami *cdc* mogą odpowiedzieć na to pytanie.

Przypuszcza się, że oprócz MPF, kontrolującego fazę M istnieje również SPF (*S-phase promoting factor*). Sugestia ta opiera się na fakcie, iż u drożdży *S. cerevisiae* mutanty genu CDC28 wykazują zaburzenia kontroli cyklu w punkcie Start. Opierając się na założeniu, że partner p34 wymagany do przejścia G1/S powinien być w zasadzie podobny do cyklin, rozpoczęto poszukiwania białek, które ulegają z nim asocjacji w tej fazie cyklu [38].

Odkryto trzy niezależne geny CLN1, CLN2 i DAF1/WHI1, których produkty wykazują homologię do cyklin [68]. Ich inaktywacja może zablokować przejście G1/S u drożdży pączkujących, natomiast mutacje tylko jednego lub dwóch spośród powyższych genów nie wywołują znaczniejszych zaburzeń cyklu komórkowego. CLN2 łączy się z p34 tworząc stabilny kompleks odznaczający się aktywnością kinazy histonowej H1. Pozostaje jednak wciąż kwestia sporna, czy uzyskanie takich wyników *in vitro* upoważnia do uwzględnienia SPF jako czynnika o takim samym znaczeniu jak MPF. Spowodowałoby to gruntowną rewizję dotychczasowego modelu cyklu komórkowego.

Końcowym etapem G1 jest montowanie, w którego czasie zachodzi przegrupowanie enzymów z cytoplazmy do jądra, ich modyfikacja i formowanie odpowiednich kompleksów (np. replikazy). Towarzyszy temu wzrost aktywności enzymów odpowiedzialnych za syntezę substratów syntezy DNA (np. kinaza tymidynowa, reduktaza rybonukleotydowa). Montowanie jest niezależne od wpływu czynników egzogennych.

ONKOGENY

Podczas kolejnych faz G1 zachodzi ściśle rozmieszczone w czasie oddziaływanie białek będących produktami większości znanych onkogenów [44, 76]. Nie znamy dokładnych danych na temat takich, które by regulowały przejście G2/M, co zresztą wydaje się oczywiste, gdyż z punktu widzenia ewentualnego powstawania nowotworu byłoby wielce niekorzystnym przyspieszenie mitozy przy niedokończonej replikacji DNA [76]. Niektórzy badacze twierdzą, że produkt *src* jest kinazą fosforylującą zwrotnie MPF, zaś produkt *mos* jest fizjologicznym aktywatorem MPF w przebiegu mejozy u żab i myszy. Ta ostatnia sugestia znalazła potwierdzenie. Otóż w oocytach *X. laevis* wyróżniano od dawna występowanie czynnika cytostatycznego CSF, który powodował zatrzymanie ich w metafazie II poprzez stabilizację MPF. Okazało się, że aktywność CSF może być zastąpiona obecnością produktu *c-mos*, protoonkogenu kodującego kinazę serynowo/treoninową [69].

Uwikłany w regulację przejścia G1/S wydaje się być również produkt antyonkogeny Rb. Oprócz Rb, kandydatem na antyonkogen jest też białko p53, koprecypitujące z antygenem T w materiale pochodzącym z komórek transformowanych wirusem SV40. W odróżnieniu od onkogenów, antyonkogeny są to takie części genomu, które kodują białka ograniczające proliferację komórek i których brak może być związany z transformacją nowotworową. Poznano dokładnie ludzki gen RB1 kodujący białko Rb o masie 105 kDa i T_{1/2} 10 h, którego synteza odbywa się we wszystkich stadiach cyklu komórkowego. Nowo syntetyzowany produkt Rb jest nisko ufosforylowany w komórkach znajdujących się w G₀ oraz w G₁, ulega natomiast wielokrotnej fosforylacji w późnym G₁, na przejściu G₁/S oraz w czasie

trwania fazy S. Komórki linii HL-60, które zostały indukowane do ostatecznego różnicowania się za pomocą odpowiednich środków chemicznych, straciły zdolność do fosforylowania wciąż powstającego Rb, gdy tylko przestały się dzielić, podczas gdy komórki zablokowane afidicholiną na granicy G1/S przez 24 h były w pełni kompetentne dalej produkując i utrzymując wysoko ufosforylowaną formę Rb. Produkt tego antyonkogenu wykazuje lokalizację jądrową i stwierdzono dotychczas jego interakcje z transformującymi białkami onkogennych wirusów (np. E1A adenowirusów, duży Ag T SV 40, E7 Papillomavirus hominis, 16). Używając sondy cDNA dla RB1 oraz przeciwciał anti-Rb stwierdzono delecję tego genu i brak ekspresji w komórkach retinoblastoma oraz osteosarcoma, a także w części przypadków drobnokomórkowego raka płuc i guzów gruczołu sutkowego. Wszystkie te dane sugerują, że Rb jest bardzo ważnym regulatorem proliferacji komórek, zwłaszcza gdy występuje w postaci ufosforylowanej, a jego dokładne poznanie wymaga dalszych intensywnych badań. Oddziałuje on na przejściu G1/S, gdyż co prawda na przejściu G2/M przeważała forma nisko ufosforylowana, ale nawet komórki zablokowane w mitozie wykazywały chromatograficznie więcej niż jedną formę Rb [48, 62, 76].

ROLA I ZNACZENIE MPF

Na początku lat siedemdziesiątych wykazano, że cytoplazma dojrzałych pod wpływem progesteronu oocytów żaby zawiera czynnik, zdolny indukować dojrzewanie oocytów, których nie poddawano działaniu tego hormonu [45, 72]. Podobne właściwości wykryto następnie w cytoplazmie jaj jeżowców i rozgwiazd, stosując podobnie jak w pierwszym przypadku technikę mikroiniekcji oraz fuzji komórkowych. Czynnik wywołujący te zmiany nazwano MPF (*maturation promoting factor*), czyli czynnik wywołujący dojrzewanie, sądząc zrazu, że jest to rodzaj swoistego wtórnego przekaźnika o ograniczonym działaniu. Fuzję interfazowych komórek HeLa z dojrzałymi oocytami *Xenopus laevis* i z komórkami HeLa będącymi w fazie mitotycznej wykazały jednak zachodzenie pod wpływem MPF zjawisk, takich jak: rozpad otoczki jądrowej, kondensacja chromatyny oraz formowanie się wrzeciona kariokinetycznego, co zasugerowało badaczom szersze znaczenie tego czynnika przemianowanego na *M-phase promoting factor* [51, 65].

Definicja MPF wynika z jego działania oraz z metody stosowanej do oznaczania jego aktywności, mianowicie uważa się za MPF substancję zdolną do indukowania drugiego podziału mejotycznego przy zablokowanej syntezie białek. Odróżnia to zdecydowanie MPF od całego arsenału środków, takich jak: inhibitory kinaz zależnych od cAMP, odczynniki sulphydrylowe lub białko Ras, które wstrzyknięte do niedojrzałych oocytów wywołują wprawdzie ich dojrzewanie, ale nie jest to ich działanie bezpośrednie, lecz uzależnione od całego bliżej nie zidentyfikowanego łańcucha przemian drogi progesteronowej [54].

Zidentyfikowano przy pomocy tej definicji obecność MPF we wczesnym cyklu embrionalnym zarodków *X. laevis*, małż *Spisula solidissima* oraz jeżowca *Arbacia punctulata*, następnie wykazano jego występowanie u ssaków, a pośrednio także u człowieka.

Przełom w badaniach nad MPF został spowodowany wprowadzeniem jako dogodnego modelu doświadczalnego ekstraktów bezkomórkowych z jaj *X. laevis* [30, 41, 42, 47, 58].

Zaobserwowano, że gdy do tego ekstraktu wprowadzić pozbawioną otoczki jądrowej chromatynę plemników, otacza się ona pseudootoczką jądrową, dając w efekcie prosty model jądra komórkowego. Działanie takie tłumaczy się tym, iż cytoplazma niezapłodnionego oocytu różni się od cytoplazmy komórki somatycznej. Jest ona mianowicie mieszaniną elementów pochodzenia cytoplazmatycznego i substancji jądrowych, które rozpraszają się w ooplazmie w momencie rozpadu pęcherzyka zarodkowego (GVB – *germinal vesicle breakdown*). Dowodem tego jest fakt, że jaja enukleowane po GVB i następnie aktywowane wykazują rytmiczne skurcze powierzchni (*surface contraction waves* – SCW) zbieżne w czasie z brudkowaniem kontrolnych zygot, podczas gdy jaja, z których usunięto pęcherzyk zarodkowy i poddano je następnie aktywacji, wykazują wprawdzie typową reakcję korową i oscylację zawartości aktywnego MPF, lecz nie wykazują SCW. Pojawiały się one nieregularnie dopiero po dość długim czasie od zadziałania bodźca aktywującego, prawdopodobnie na skutek resyntezy odpowiedzialnego za nie białka (białek) [55].

Gdy do takiego ekstraktu otrzymanego z oocytów nieaktywowanych dodać nawet niewielką ilość MPF, masa cytoplazmatyczna ulega aktywacji prowadząc do rozpadu pseudootoczki jądrowej w ciągu ok. 30 min, przy czym na niezbędny okres działania MPF przypada tylko kilka pierwszych minut, a resztę czasu zajmują zjawiska związane z kondensacją chromatyny i rozproszeniem pseudootoczki. Wysznięto wniosek, że sam MPF występuje w cytoplazmie w formie nieaktywnej w ciągu całego cyklu, a synteza białek jest niezbędna do produkcji jakiegoś jego aktywatora. Podobny efekt można osiągnąć działając niewielką ilością zaktywowanego MPF. Wykazano, że jest on prawdopodobnie fosfoproteiną, co jednak niewiele wyjaśniało, zważywszy że wiele strukturalnych białek, takich jak histony i laminy jądrowe, ulega hyperfosforylacji przy wejściu w mitozę [19]. Okazało się także, iż MPF jest termolabilny, gdyż po 10 min inkubacji w 45°C ulegał całkowitej inaktywacji. W postaci tiofosforylowanej MPF jest stabilny, przy braku ATP, który jest także niezbędny do procesu rozpadu otoczki jądrowej [40].

Zdefiniowano jednostkę MPF jako największe rozcieńczenie, w którym występował rozpad otoczki jądrowej w modelu bezkomórkowym. Przykładowo, niezapłodniony oocyt *X. laevis* zawiera 100 jednostek MPF w objętości 0,6 μl . W 2 h po zapłodnieniu cytoplazma blastomerów zawiera już tylko 30 j/ μl , u 11 h gastruli poziom wynosił 20 j/ μl , a u 20 h neuruli już tylko 2,5 j/ μl . Stąd wynika wniosek, że im wolniej dzielą się komórki, tym niższy poziom MPF wystarcza do podtrzymania cyklu [19]. Na podstawie wyników tej serii badań postulowano, że MPF wywiera swoje działanie w dwóch fazach. Pierwsza obejmuje aktywację (czyli *priming*) cytoplazmy interfazowej, natomiast druga zakłada działanie aktywnych czynników cytoplazmatycznych na jądro i prawdopodobnie wymaga pośrednictwa enzymów kondensujących chromosomy, kinaz laminowych oraz czynnika MVF (*membrane-vesicularization factor*).

Wysiłki badaczy ukierunkowały się po poznaniu tych faktów na zidentyfikowanie białka lub białek, które wykazywałyby aktywność MPF. Wiadomo było, że we wczesnym cyklu embrionalnym żab i jeźowców wymagana jest synteza białek za każdym obrotem cyklu, gdyż przy jej braku komórki zatrzymują się ze zduplikowanym DNA, ale przed mitozą. Synteza tych białek wymagana była tylko we wczesnej interfazie, co sugerowało zachodzenie procesów posttranslacyjnych. Mikroiniekcja MPF do zablokowanych w ten sposób komórek indukowała mitozę, co znaczyło, iż w wyniku tej syntezy powstaje MPF albo raczej jakiś aktywator MPF, a także to, że właśnie MPF jest kluczowym regulatorem cyklu.

Kolejne badania potwierdziły pierwsze doniesienia. Ekstrakcja MPF z wyciągów komórkowych przygotowanych w obecności 5'-(γ -tio)-trifosforanu adenozy (ATP (γ -5')) ulega wzmocnieniu, gdy doda się inhibitorów fosfataz i przeciwciał przeciwko tiofosforanowym immunoprecypitatom MPF. Obecność ATP (γ -5') była niezbędna w celu utrzymania stabilności MPF podczas dalszego oczyszczania. Inhibitory fosfataz, takie jak β -naftylofosforan i NaF, trzeba było usuwać drogą dializy z oczyszczonych preparatów MPF przed testowaniem ich w ekstraktach bezkomórkowych z oocytów *X. laevis*, podczas gdy obecność w nich trzeciego używanego inhibitora, mianowicie β -glicerofosforanu, wzmacniała działanie MPF. Ponieważ sam β -glicerofosforan nie indukuje fazy M, musi on mieć poza zdolnością blokowania fosfataz jakieś dodatkowe niepoznane właściwości [40].

Metodą chromatografii w żelu poliakrylamidowym wykryto, że we frakcji o aktywności MPF występują zawsze dwa białka, o relatywnej masie cząsteczkowej 45 kDa i 32 kDa. Aktywność tę testowano zarówno w systemie bezkomórkowym, jak i na nienaruszonych oocytach *X. laevis*, traktowanych cykloheksimidem. Okazało się, że część frakcji, zawierających wyłącznie białko 45 kDa, wykazywała co prawda aktywność MPF w systemie bezkomórkowym, lecz nie wywoływała dojrzewania oocytów.

Frakcja białkowa najbardziej bogata w komponentę 45 kDa mającą właściwości MPF, wykazującą jednak zawsze obecność białka 32 kDa, ma silne właściwości kinazowe. Fosforyzuje ona *in vitro* białko 45 kDa, histon H1 oraz mieszane histony i inhibitor fosfatazy-1. Nie fosforyluje natomiast foswityny, inhibitora fosfatazy 2, syntazy glikogenowej, kazeiny, białka rybosomalnego S6, laminy lub wimentyny [10, 30, 40].

MUTANTY CDC DROŻDŻY

Niezależnie od powyższych badań zajmowano się genetyczną analizą temperaturowrażliwych mutantów cyklu komórkowego drożdży (*cdc-ts-cell division control - temperature sensitive mutants*), które umieszczone w określonej temperaturze restrykcyjnej blokowały się odpowiednio w różnych fazach cyklu. Badania przeprowadzono z początku na drożdżach pączkujących *Saccharomyces cerevisiae*, jednak dogodniejszym modelem okazały się drożdże dzielące się przez normalną cytokinezę *Schizosaccharomyces pombe* (*fission yeast*) [7, 8, 15, 27, 45, 54].

Na podstawie zebranych danych wyizolowano szereg genów uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego, które zwyczajowo określa się u *S. cerevisiae* dużymi literami, a u *S. pombe* małymi. Najbardziej interesującym okazał się *cdc2*, ponieważ jego działanie było wymagane zarówno w punkcie Start, jak i na przejściu G2/M [6]. Stwierdzono jego ścisłą homologię do wcześniej opisanego genu *CDC28*, z którym jest wzajemnie wymienialny, tj. *CDC28* może uratować letalne mutacje *cdc2 S. pombe*, a pozbawiony intronów *cdc2* letalne mutacje *CDC28 S. cerevisiae* [9]. Obydwa te geny kodują białka o relatywnej masie cząsteczkowej $M_r = 34$ kDa, identyczne pod względem sekwencji aminokwasów w 62%. Szczególnie konserwatywne okazały się regiony charakterystyczne dla kinaz serynotreoniowych. Jak się można było spodziewać, obydwie te białka wykazywały *in vitro* aktywność kinazową.

Gen *suc1*, którego homologiem u *S. cerevisiae* jest CSK1 [24], został wyizolowany jako sekwencja DNA, która zapobiega letalnym skutkom ekspresji niektórych alleli mutantów

cdc2, gdy wprowadzi się ją do komórki pod postacią zamplifikowanego plazmidu. Kodowane przez *suc1* białko ma $M_r = 13$ kDa i składa się z 113 aminokwasów. $p13^{suc1}$ wykazuje bardzo duże powinowactwo do $p34^{cdc2}$ i tworzy z nim kompleksy wykazujące aktywność kinazową. Właściwość ścisłego łączenia się tych dwóch białek wykorzystano do izolowania $p34^{cdc2}$ z różnych ekstraktów komórkowych, przez użycie kolumn sefarozowych z przyłączonym $p13^{suc1}$. U niektórych szczepów drożdży mających zmutowany gen *cdc2*, kompleksy te wykazują znacznie mniejszą stabilność, lecz jak już wspomniano, nadmiar $p13^{suc1}$ przesuwa równowagę w stronę powstawania kompleksów i umożliwia przeżycie komórki. Ostatnio uważa się, że $p13^{suc1}$ odgrywa dwie zasadnicze role. Może on mianowicie ułatwiać powstawanie kompleksów $p34^{cdc2}$ z $p60^{cdc13}$, a następnie pełni rolę inhibitora tak powstałej kinazy, do czasu gdy w fazie M kompleks ten staje się niewrażliwy na jego działania [16, 28].

Kolejne geny to *wee1*, *nim1* i *cdc25*. Jeżeli u *S. pombe* wystąpi nadekspresja *wee1* w stosunku do *cdc25* obserwuje się, iż komórki, które rozpoczynają mitozę, są znacząco większe od komórek kontrolnych. Sytuację odwrotną obserwuje się natomiast, gdy nadekspresji ulega *cdc25*, przy nie zmienionej ekspresji *wee1*. Komórki, które osiągają fazę M, są wówczas o wiele mniejsze od kontroli. Do genu *cdc25* wykazuje znaczącą homologię gen *String* u *Drosophila melanogaster*, który jednakże zdaje się tam spełniać odmienną rolę, gdyż jego akumulacja determinuje każdy następny podział we wczesnym cyklu zarodkowym. Homolog *cdc25* występuje również u *S. cerevisiae*, równoczesna delecja tego genu i nadekspresja genu *wee1* powoduje u tych drożdży blok w G2. To ostatnie doniesienie popiera tezę, że również *S. cerevisiae* ma dwa oddzielne punkty uchwytu kontroli cyklu (dawniej sądzono, że kontrola odbywa się tylko w punkcie Start, gdzie wyłącznie oddziałuje CDC28). Wreszcie wykryto też gen *nim1*, którego superekspresja zdaje się niwelować działanie produktu *wee1*. Obydwa te białka, mianowicie produkty *nim1* oraz *wee1*, wykazują homologię do sekwencji charakterystycznych dla kinaz białkowych. Produktem genu *cdc25* jest białko p80, mogące tworzyć multiheterokompleksy z p13, p34 i p60. Poziom $p80^{cdc25}$ wzrasta 4-5-krotnie, gdy komórka osiąga granice G2/M i ulega dalszemu wzrostowi w czasie trwania fazy M, co sugeruje, że białko to powinno być obecne, zanim komórka nie ukończy mitozy. Ostatnio wykryto białko homologiczne do p80 w komórkach HeLa, które wykazują również cykliczne wahania stężenia w cytoplazmie oraz jest zdolne zastąpić brakujące białko u defektywnych mutantów *S. pombe* [60, 61].

CYKLINY*

Na podstawie analiz zawartości białek oocytów jeżowca *A. punctulata* metodą chromatografii na żelu poliakrylamidowym wykazano, że po zapłodnieniu zanika znaczące pasmo o $M_r = 45$ kDa, które następnie ulega resyntezie w ciągu pierwszego cyklu zarodkowego, by ponownie zaniknąć w fazie M. Ze względu na cykliczny charakter procesu syntezy i degradacji tego białka nazwano je cykliną [3, 20, 74].

*Pewne zamieszanie nomenklaturowe wynikało z tego, iż nazwę "cyklina" przypisuje się również czynnikowi białkowemu PCNA (*Proliferating Cells Nuclear Antigen*) będącemu kofaktorem DNA polimerazy Delta, u drożdży *S. cerevisiae*. PCNA jest kodowany przez gen *CDC2*, co jeszcze bardziej komplikuje nazewnictwo. PCNA nie ma żadnego związku z omawianymi tu cyklinami [36, 39, 75].

Wkrótce wykazano obecność dwóch białek o podobnym zachowaniu także u mięczaka *S. solidissima*, a następnie u *X. laevis*, a ostatnio za pomocą przeciwciał monoklonalnych również u większości eukariontów, w tym u człowieka. U drożdży natomiast okazało się, że cyklinom odpowiadają produkty genów *suc1* i *cdc13*, a według niektórych autorów także *cdc25* [48].

Obecnie znane cykliny podzielono na dwie grupy: A i B w zależności od podobieństwa sekwencji aminokwasów, ustalonej na podstawie izolowanego cDNA dla tych białek. Podział ten wywodzi się od dwóch cyklin pierwotnie wykrytych u *S. solidissima*. Do grupy A należy cyklina A *S. solidissima*, cyklina 1 *A. punctulata*, cykliny A1 i A *X. laevis* oraz produkt genu *cdc13* *S. pombe*, podczas gdy do grupy B cyklina B *S. solidissima*, cyklina 2 *A. punctulata*, p13, cykliny B1 i B *S. laevis* oraz cyklina B ludzka z komórek HeLa [25, 37, 73].

Cykliny są ogólnie białkami o wysokim stopniu konserwacji sekwencji, zwłaszcza w środkowej 1/3, jak zdołano ustalić przy użyciu techniki *DIAGON blotts*. Dla przykładu, na odcinku pomiędzy aminokwasami 166 a 294 cykliny B występuje 50% homologii z cykliną A, podczas gdy aż 65% homologii z cykliną 1 [79]. U wszystkich poznanych cyklin 56 z kluczowych 148 reszt aminokwasowych jest identyczne, co stanowi 38%. Liczba ta wzrasta do 60%, jeśli nie weźmiemy pod uwagę drożdży. Dalszych 26 reszt [17] wykazuje jedynie różnice w zakresie tzw. konserwatywnych substytucji [64]. Bardzo duże różnice wykazuje natomiast u poszczególnych cyklin region 100 N-terminalnych reszt aminokwasowych, gdzie występują tylko nieliczne wyspy konserwacji. Ogólna liczba aminokwasów tworzących łańcuch polipeptydowy cyklin waha się w granicach 390–410 przy zastanawiająco dużych wahaniami względnej masy cząsteczkowej w granicach od 44 kDa dla cykliny B1 do 62 kDa dla cykliny ludzkiej, przy oznaczaniu jej rutynową metodą na SDS-PAGE. Ważną cechą odróżniającą cykliny typu A od B jest występowanie u tych ostatnich sekwencji FLRR-SK o nieznannej funkcji oraz sekwencji RRXXS, która jest potencjalnym miejscem fosforylacji przez kinazy zależne od cAMP [63, 64].

Istotna różnica pomiędzy ekspresją obydwu grup cyklin polega na tym, że u mięczaka *S. solidissima* cyklina A przechowywana jest w oocytach jako matczynej mRNA, podczas gdy cyklina B występuje już pod postacią gotowego białka, tyle że skompleksowanego w nieaktywne, łatwo sedymentujące agregaty. W momencie zapłodnienia przechodzą one w rozproszoną, rozpuszczalną formę, prawdopodobnie pod wpływem przejściowego zwiększenia wartości pH. Takie rozmieszczenie obydwu cyklin tłumaczy fakt, dlaczego możliwe jest zachodzenie I podziału mejotycznego u *S. solidissima* bez syntezy białek [79]. Dotychczas nie wykazano podobnych różnic w rozmieszczeniu cyklin z grup A i B u innych organizmów, lecz jest to prawdopodobne i sugeruje, że być może mają różne funkcje, choć mogą się nawzajem uzupełniać. Można to poprzeć faktem, że wprowadzone osobno do oocytów *X. laevis* są mniej efektywne niż wprowadzone razem (patrz niżej) [29].

Wykazano, że mikroiniekcja transkryptu sklonowanego genu cykliny A do oocytów *X. laevis* indukuje pierwszy podział mejotyczny, co wskazuje że cykliny są MPF lub jego bezpośrednim aktywatorem [46, 77]. Część autorów uważało natomiast, że cykliny są tylko jednym z pośredników na drodze progesteronowej aktywacji MPF popierając to faktem, że upływa jeszcze znaczący okres (1–3 h) od momentu zakończenia syntezy cyklin do chwili rozpoczęcia mitozy [49]. Wskazuje na to fakt, że inhibitory syntezy białek zapobiegają wejściu w mitozę tylko wtedy, gdy oddziałują we wczesnej interfazie, co znaczy, gdy stężenie

cyklin przekroczy pewien próg, zachodzą procesy posttranslacyjne prowadzące nieuchronnie do ujawnienia się aktywności MPF [59].

Inne doświadczenia wykazały natomiast, że jeżeli zablokować komórki w fazie M, to pasmo cyklin nie zanika, lecz utrzymuje się na stałym poziomie przez czas trwania bloku, do momentu podjęcia przez komórkę dalszej części mitozy lub mejozy, tj. do początków anafazy. Degradacja cyklin zbiega się w czasie z gwałtownym zanikiem aktywności MPF w cytoplazmie. Gdy umieszczono pozbawioną otoczki jądrowej chromatynę plemników w bezkomórkowym ekstrakcie z oocytów *X. laevis*, do którego dodano antysensowne oligonukleotydy komplementarne do mRNA jednej z cyklin typu B, nastąpiło opóźnienie wystąpienia mitozy. W momencie, gdy użyto ekstraktu zawierającego anty-mRNA, zarówno dla cykliny B1 jak i B, nie zaobserwowano ani kondensacji chromosomów, ani rozpadu pseudootoczki jądrowej. W czasie trwania doświadczenia nie zaobserwowano, aby DNA zablokowanego w ten sposób systemu ulegał choćby częściowej duplikacji. Efekt uzyskany poprzez zapobieżenie syntezie cyklin jest identyczny do efektu uzyskanego wskutek dodania np. edeiny, która jest inhibitorem syntezy białek [51, 52, 53].

Ostatecznie udowodniono tezę, iż degradacja cyklin jest niezbędna do wyjścia z fazy M otrzymując sztucznie sklonowaną cyklinę CYCΔ90 (delecja 90 N-końcowych aminokwasów). Jest ona odporna na proteolizę, a jej obecność w oocytach *X. laevis* utrwała stan metafazy [55].

MODEL REGULACJI CYKLU

W świetle przedstawionych danych wydaje się jasne, iż MPF jest w rzeczywistości kompleksem pomiędzy p34 a cykliną (lub cyklinami) [18, 21, 35]. Poziom MPF jest stały w ciągu całego cyklu komórkowego, natomiast wahaniom ulega poziom cyklin, które akumulują się w interfazie, aby następnie ulec gwałtownej degradacji na przełomie metafazy i anafazy. Powstanie kompleksu p34-cykliny nie jest jednoznaczne z uczynieniem się MPF w komórce i wzrostem aktywności kinazowej. Niezbędna jest do tego defosforylacja reszty tyrozynowej białka p34, usytuowanej w pozycji 15 łańcucha polipeptydowego, w regionie służącym do wiązania ATP. Defosforylacja ta uzależniona jest u *S. pombe* od obecności p80^{cdc25}, chociaż nie wykazano, aby to ostatnie białko wykazywało jakąkolwiek aktywność fosfatazową. Niemniej jednak, podstawienie reszty tyrozynowej resztą fenyloalaninową u jednego z mutantów *cdc2*, uniemożliwia przemiany typu fosforylacji/defosforylacji, zaś mutanty, będąc niezależne od stężenia produktu *cdc25*, wchodzą przedwcześnie w mitozę. Wynika stąd wniosek, iż defosforylacja tyrozyny w pozycji 15 łańcucha p34 jest bezpośrednią przyczyną fizjologicznej aktywacji MPF [17, 33].

p34^{cdc2} ulega również fosforylacji na reszcie treoninowej w pozycji 167 łańcucha polipeptydowego, prawdopodobnie w czasie trwania fazy G₂, natomiast jej defosforylacja następuje pod koniec mitozy. Obecność reszty fosforanowej jest w tym przypadku warunkiem sine qua non aktywności kinazowej każdego kompleksu zawierającego w swym składzie białko p34 [71]. Badania na homologu produktu genu *cdc2* występującego w komórkach myszy potwierdziły, że zmiany stopnia ufosforylowania kinazy mitotycznej wydają się mieć znaczenie uniwersalne. Jedyna różnica pomiędzy zachowaniem się p34 u myszy z obserwowanym u *S. pombe* polega na tym, iż oprócz reszty tyrozynowej, usytu-

wanej w pozycji 15, defosforylacji premitotycznej ulega zlokalizowana w pozycji 14 dodatkowa reszta treoninowa [61, 67]. Najnowsze badania wskazują, że białko p34 ulega również fosforylacji na reszcie serynowej w pozycji 277 w czasie fazy G1. Defosforylacja w tym miejscu następuje w czasie fazy S, co wskazuje na ewentualną rolę p34 na przejściu G1/S [38].

Białko p34 ulega asocjacji z cykliną A w fazie S, a z cykliną B podczas fazy G2. Cyklina B może połączyć się z p34 niezależnie od stopnia ufosforylowania tego białka, podczas gdy cyklina A asocjuje z nim jedynie, gdy jest ono w postaci defosforylowanej. Również same cykliny ulegają fosforylacji niedługo przed rozpoczęciem mitozy, ale znaczenie tego zjawiska pozostaje nierozstrzygnięte. Ostatnio wykryto, że *in vitro* produkt onkogenu *c-src* fosforyluje reszty tyrozynowe p34, natomiast produkt *c-mos* fosforyluje cyklinę B2 [50, 69, 70].

Model cyklu komórkowego zaproponowany przez A. W. Murraya i M. W. Kirschnera w roku 1989 zakłada, że istnieją dwa zasadnicze stany, w których znajdować się może komórka: stan o wysokiej aktywności MPF, zwany mitozą (w odróżnieniu od klasycznego, morfologicznego ujęcia mitozy chodzi tu o czasokres między profazą a początkiem anafazy) oraz stan o niskiej aktywności MPF, zwany interfazą (włączając w to anafazę i telofazę). Zarówno niski, jak i wysoki poziom aktywności MPF w cytoplazmie charakteryzuje stany o względnej stabilizacji, podczas gdy poziomy pośrednie są zdecydowanie niestabilne [52, 53, 54, 55].

Przemiany jądra interfazowego są niewątpliwie procesem dynamicznym, natomiast komórka, która osiągnęła metafazę, może w niej pozostawać przez długi czas. Wszystkie zmiany składające się na profazę i prometafazę wydają się być zainicjowane aktywacją MPF uruchamiającą kaskadę dalszych mechanizmów. Spadek aktywności MPF inicjuje szereg zjawisk doprowadzających w efekcie do stabilnego stanu interfazowego. Strukturalne przemiany zarówno na przejściu G2/M, jak i na przejściu M/G1 zależą najprawdopodobniej od szeregu niezależnych procesów działających na zasadzie klasycznych szlaków biochemicznych (tj. mających kontrolę typu sprzężenia zwrotnego), których jedyną cechą wspólną jest to, iż są zapoczątkowywane przez zmianę aktywności MPF.

Powyżej przedstawiona koncepcja cyklu komórkowego jest na tyle uniwersalna, że tłumaczy zjawiska zachodzące w czasie wczesnego cyklu embrionalnego, jak i cyklu somatycznego. Główne różnice polegają na pojawieniu się systemu kontroli zwrotnych oraz uzależnieniu autonomii komórki od czynników pochodzenia egzogenego, co jest szczególnie zaznaczone u komórek pochodzących z wysoko zorganizowanych wielokomórkowców.

Mechanizm fosforylacji/defosforylacji nie tylko odpowiada za wahania aktywności MPF, lecz również jest podstawą jego działania, gdyż jak wiadomo, podjednostka p34 jest kinazą serynowo-treoninową [56]. Również przypuszczalny SPF miałby działać na tej samej zasadzie. Funkcjonowanie takich kinaz mogłoby się odbywać dwojako: albo są one tak zwanymi kluczowymi regulatorami uruchamiającymi poprzez fosforylację kaskadę reakcji, albo same bezpośrednio fosforylują wszystkie niezbędne substraty potrzebne w reorganizacji komórki w związku z progresją cyklu. To drugie rozwiązanie wydaje się jednak mniej prawdopodobne. Specyficzność kinazy mitotycznej na poziomie struktury pierwszorzędowej jest stosunkowo niska, gdyż może to być sekwencja R/K-S-P-X-R/K lub S-P-K. Sprowadza się to do rozpoznania reszty serynowej albo treoninowej, po której występuje reszta prolinowa, a następnie jakiś aminokwas zasadowy. Co się tyczy defosforylacji

substratów kinaz zawierających p34, to wydaje się, iż zachodzi ona wskutek stałego działania fosfataz różnego typu, których poziom aktywności nie ulega większym zmianom w ciągu cyklu komórkowego [38].

Najlepiej poznanym substratem kinazy mitotycznej jest histon H1, który ulega fosforylacji na dwóch resztach aminokwasowych w czasie fazy S, a następnych czterech tuż przed mitozą. Powinowactwo kinazy p34 do tego białka jest tak duże, że jedynym z synonimów MPF stała się nazwa H1-kinaza, a szybkość, z jaką to białko ulega fosforylacji, jest łatwą ilościową metodą oznaczania stopnia aktywności MPF w preparatach biologicznych. Nie wykazano bezpośredniego związku fosforylacji histonu H1 a kondensacją chromosomów.

Dwie reszty serynowe lamin jądrowych też są bezpośrednimi celami działania kinazy p34, co tłumaczyłoby jej rolę w rozpadzie otoczki jądrowej. W czasie trwania fazy M kinaza ta fosforyluje prawdopodobnie również lekkie łańcuchy miozyny, nukleoinę oraz białko pp60 – produkt onkogenu *src*. Indukowałoby to zahamowanie cytokinezy oraz syntezy rybosomów, jak również aktywację następnej kinazy. Podczas fazy S pod wpływem kompleksów zawierających p34 ulega fosforylacji antygen T, co miałyby na celu inicjację replikacji DNA. U drożdży *S. cerevisiae* fosforylacji w czasie faz S, G2 i M zależnej od genu CDC28 podlega czynnik SW15, będący regulatorem transkrypcji genu HO kodującego endonukleazę niezbędną w przełączaniu się tych drożdży na szlak podziału płciowego [38]. Ostatnio wykazano, iż kinaza p34 inaktywuje poprzez fosforylację białko X-MAP, co wywołuje modulację dynamicznych właściwości mikrotubul, symulując *in vitro* powstawanie wrzeciona podziałowego [8, 48]. Substratem kinaz zawierających p34 jest również u myszy jedna z polimeraz RNA [11].

Za pomocą przeciwciał otrzymanych zarówno przeciw N-końcowym, jak i C-końcowym domenom białka p34 udało się zlokalizować je w dzielących się w hodowli komórkach jelenia azjatyckiego (*Muntiacus muntjac*) w powiązaniu z konkretnymi strukturami morfologicznymi. Poza centrosomami [67] zlokalizowano p34 w kinetochorach, wzdłuż pęczków mikrotubul ciągnących się od kinetochorów do biegunów, wokół pęcherzyków zlokalizowanych pomiędzy rozchodzącymi się chromatydami oraz wewnątrz mostu międzykomórkowego powstającego pod koniec cytokinezy. W regionach tych zlokalizowane są prawdopodobnie substraty kinazy p34, gdyż równocześnie ze wzrostem reaktywności przeciwciał anti-p34 wzrasta w nich reaktywność przeciwciał antyfosfoproteinowych MPM-2 [34], co wskazuje na wzrost stopnia ufosforylowania białek. Wart uwagi jest również fakt, że rozmieszczenie miejsc wiążących anti-p34 pokrywa się z miejscami występowania kalmoduliny w aparacie mitotycznym, jednak znaczenie tego faktu jest na razie nieznane [66]. Trwają intensywne poszukiwania dalszych substratów kinaz zawierających p34 w celu bliższego powiązania ich ze zjawiskami morfologicznymi.

PODZIĘKOWANIE

Bardzo dziękuję p. dr Ewie T. Mystkowskiej za bezinteresowną pomoc i krytyczne uwagi w czasie pisania niniejszej pracy.

LITERATURA

- [1] AIMAR C. Control of cell cycle length in amphibian eggs: evidence for a temporal relationship between the nucleus and egg cytoplasm. *Development* 1988; **104**: 415–422.
- [2] ANGELP, HATTORI K, SMEAL T, KARIN M. The jun protooncogene is positively autoregulated by its product, jun AP1. *Cell* 1988; **55**: 875.
- [3] ARION D, MEIJER L. M-phase specific protein kinase from mitotic sea urchin eggs: cyclic activation depends on protein synthesis and phosphorylation but does not require DNA or RNA synthesis. *Exp Cell Res* 1989; **183**: 361–375.
- [4] ARION D, MEIJER L, BRIZUELA L, BEACH D. cdc2 is a component of the M-phase specific histone-Histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* 1988; **55**: 371–378.
- [5] BASERGA R. Molecular biology of the cell cycle. *Int J Radiat Biol* 1986; **49**: 219–226.
- [6] BEACH D, BURDACZ B, NURSE P. Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* 1982; **300**: 706–709.
- [7] BOOHER R, BEACH D. Interaction between cdc 13 + and cdc2 + in the control of mitosis on fission yeast: dissociation of the G1 and G2 roles of the cdc2 + protein kinase. *EMBO J* 1987; **6**: 3441–3447.
- [8] BOOHER R, BEACH D. Involvement of cdc13 + in mitotic control in *Schizosaccharomyces pombe*: possible interaction of the gene product with microtubules. *EMBO J* 1988; **7**: 2321–2327.
- [9] BOOHER R, BEACH D. Site-specific mutagenesis of cdc2 +, a cell cycle control gene of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molec Cell Biol* 1986; **6**: 3623–3630.
- [10] CAPONY TP, PICARD A, PEAUCELLIER G, LABBE JC, DOREE M. Changes in the activity of the maturation-promoting factor during meiotic maturation of amphibian and starfish oocytes: their correlations with protein phosphorylation. *Dev Biol* 1986; **117**: 1–12.
- [11] CISEK LJ, CORDEN JL. Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell cycle control protein cdc2. *Nature* 1989; **339**: 679–684.
- [12] CRECHET JB, POULLET P, CAMONIS J, JACQUET M, PARMEGGIANI A. Different kinetic properties of the two mutants, RAS 211e152 and RAS 2Val19, that suppress the CDC25 requirement in RAS Adenylate cyclase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1990; **265**: 1563–1568.
- [13] CURRANT T, FRANZA jr BR. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 1988; **55**: 395.
- [14] DRAETTA G, BEACH D. Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* 1988; **54**: 17–26.
- [15] DRAETTA G, BEACH D. The mammalian cdc2 protein kinase: mechanisms of regulation during the cell cycle. *J Cell Sci Suppl* 1989; **12**: 21–27.
- [16] DRAETTA G, BRIZUELA L, POTASHKIN J, BEACH D. Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeasts encoded by cdc2 + and suc 1 +. *Cell* 1987; **50**: 319–325.
- [17] DRAETTA G, PIWNICA-WORMSH, MORRISON D, DRUCKER B, ROBERTST, BEACH D. Human cdc2 protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosine kinase substrate. *Nature* 1988; **336**: 738–744.
- [18] DUNPHY WG, BRIZUELA L, BEACH D, NEWPORT J. The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 1988; **54**: 423–431.
- [19] DUNPHY WG, NEWPORT JW. Fission yeast p13 blocks mitotic activation and tyrosine dephosphorylation of the *Xenopus* cdc2 protein kinase. *Cell* 1989; **58**: 181–191.
- [20] EVANS T, ROSENTHAL ET, YOUNGBLOM J, DISTEL D, HUNT T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983; **33**: 389–396.
- [21] GAUTIER J, NORBURY C, LOHKA M, NURSE P, MALLER J. Purified maturation-promoting factor contains the product of the fission yeast cell cycle control gene cdc2 +. *Cell* 1988; **54**: 433–439.
- [22] GERHART J, WU M, KIRSCHNER M. Cell cycle dynamics of an M-phase specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J Cell Biol* 1984; **98**: 1247–1255.
- [23] GILBERT DA. The cell cycle. Oscillatory basis of mitosis confirmed. *S Afr J Sci* 1989; **85**: 491–493.
- [24] HADWIGER JA, WITTENBERG C, MENDENSHALL MD, REED SI. The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* suc1 + gene, encodes a subunit of the CDC28 protein kinase complex MO1. *Cell Biol* 1989; **9**: 2034–2041.
- [25] HAGAN IM, HAYLES J, NURSE P. Cloning and sequencing of the cyclin related cdc13 + gene and a cytological study of its role in fission yeast mitosis. *J Cell Sci* 1988; **91**: 587–595.
- [26] HARA K, TYDEMAN P, KIRSCHNER M. A cytoplasmic clock with the same period as the division cycle in *Xenopus* eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 462–466.

- [27] HARTWELL LH, WEINERT TA. Checkpoints: control that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; **246**: 629–634.
- [28] HAYLES J, BEACH D, DURKACH B, NURSE P. The fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*: isolation of a sequence *suc1+* that supresses *cdc2* mutant function. *Mol Gen Genet* 1986; **202**: 291–293.
- [29] HOWLETT SK et al. Nuclear and cytoplasmic localization of newly synthesized proteins in the early mouse embryo. *Development* 1988; **103**: 129–139.
- [30] HUTCHISON CJ, COX R, DREPAUL RS, GOMPERTS M, FORD CC. Periodic DNA synthesis in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *The EMBO Journal* 1987; **6**: 2003–2010.
- [31] KAWIAK J. Regulacja cyklu mitotycznego. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 325–333.
- [32] KIRSCHNER M, NEWPORT J, GERHART JC. The timing of early developmental events in *Xenopus*. *Trends Genet* 1985; **1**: 41–47.
- [33] KREK W, NIGG EA. Differential phosphorylation of vertebrate p34 *cdc2* kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *The EMBO Journal* 1991; **10**: 305–316.
- [34] KUANG J, ZHAO JY, WRIGHT DA, SAUNDERS GF, RAO PN. Mitosis-specific monoclonal antibody MPM-2 inhibits *Xenopus* oocyte maturation and depletes maturation promoting factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 4982–4986.
- [35] LABBE JC, CAPONY JP, CAPUT D, CAVADORE JC, DERANCOURT J, KAGHAD M, LELIAS JM, PICARD A, DOREE M. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of *cdc2* and one molecule of cyclin B. *The EMBO Journal* 1989; **8**: 3053–3058.
- [36] LASKEY RA, FAIRMAN MP, BLOW JJ. S-phase of the cell cycle. *Science* 1989; **246**: 609–614.
- [37] LEHNER CF, O'FARELL P. Expression and function of *Drosophila* cyclin A during embryonic cell cycle progression. *Cell* 1989; **56**: 957–968.
- [38] LEWIN B. Driving the cell cycle: M-phase kinase, its partners and substrates. *Cell* 1990; **61**: 743–752.
- [39] LLOYD D. Biochemistry of the cell cycle. *Biochem J* 1987; **242**: 313–321.
- [40] LOHKA MJ, HAYES MK, MALLER JL. Purification of MPF, and intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 3009–3013.
- [41] LOHKA MJ, MALLER JL. Induction of nuclear envelope breakdown, chromosome condensation, and spindle formation in cell-free extracts. *J Cell Biol* 1985; **101**: 518–523.
- [42] LOHKA MJ, MASUI Y. Role of cytosol and cytoplasmic particles in nuclear envelope assembly and sperm pronuclear formation in cell-free preparations from amphibian eggs. *J Cell Biol* 1984; **98**: 1222–1230.
- [43] MARX JL. Research news: cell cycle coming under control. *Science* 1989; **245**: 252–255.
- [44] MARS JL. The oncogene connection. *Science* 1989; **245**: 253.
- [45] MASUI Y, MARKERT CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971; **177**: 129–146.
- [46] MEIJER L, ARION D, GOLSTEYN R, PINES J, BRIZUELA L, HUNT T, BEACH D. Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. *The EMBO Journal* 1989; **8**: 2275–2282.
- [47] MIAKE-LEE R, KIRSCHNER MW. Induction of early mitotic events in a cell-free system. *Cell* 1985; **41**: 165–175.
- [48] MIHARA K, CAO XR, YEN A, CHANDLERS, DRISCOLI B, MURPHEE AL, T'ANG A, FUNG YKT. Cell-cycle dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* 1989; **246**: 1300–1303.
- [49] MINSHULL J, BLOW JJ, HUNT T. Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis. *Cell* 1989; **56**: 947–956.
- [50] MORENO S, HAYLES J, NURSE P. Regulation of p34^{cdc2} protein kinase during mitosis. *Cell* 1989; **58**: 361–372.
- [51] MURRAY AW. Cyclins in meiosis and mitosis. *Nature* 1987; **326**: 542–543.
- [52] MURRAY AW. Cyclin synthesis and degradation and the embryonic cell cycle. *J Cell Sci Suppl* 1989; **12**: 65–76.
- [53] MURRAY AW, KIRSCHNER MW. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 1989; **339**: 275–280.
- [54] MURRAY AW, KIRSCHNER MW. Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* 1989; **246**: 614–621.
- [55] MURRAY AW, SALOMON MJ, KIRSCHNER MW. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of MPF activity. *Nature* 1989; **339**: 280–286.
- [56] NEANT I, CHARBONNEAU M, GUERRIER P. A requirement for protein phosphorylation in regulating the meiotic and mitotic cell cycles in echinoderms. *Dev Biol* 1989; **132**: 304–314.

- [57] NEWPORT J, KIRSCHNER MW. Regulation of the cell cycle during early *Xenopus* development. *Cell* 1984; **37**: 731–742.
- [58] NEWPORT J, SPANNT. Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly and chromosome condensation are independent processes. *Cell* 1987; **48**: 219–230.
- [59] NORTH G. Regulating the cell cycle. *Nature* 1989; **339**: 97–98.
- [60] NURSE P. Cell cycle control in yeast. *Trends Genetics* 1986; **1**: 51–55.
- [61] NURSE P. Genetic control of the cell size at division in yeast. *Nature* 1975; **256**: 547–551.
- [62] PARDEE AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989; **246**: 603–608.
- [63] PINES J, HUNT T. Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs. *The EMBO Journal* 1987; **6**: 2987–2995.
- [64] PINES J, HUNT T. Isolation of human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34^{cdc2}. *Cell* 1989; **58**: 833–846.
- [65] RAO PN, JOHNSON RT. Regulation of cell cycle in hybrid cells. *Cold Spring Harbor Conf Cell Prolif* 1974; **1**: 785–800.
- [66] RATNER JH, LEW J, WANG JR. p34 kinase is localized to distinct domains within the mitotic apparatus. *Cell Mot Cytoskeleton* 1990; **17**: 227–235.
- [67] RIABOWOL K, DRAETTA G, BRIZUELA L, VANDRE D, BEACH D. The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell* 1987; **57**: 393–401.
- [68] RICHARDSON HE, WITTENBERG C, CROSS R, REED SI. An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell* 1989; **59**: 1127–1133.
- [69] ROY LM, SINGH B, GAUTIER J, ARLINGHAUS RB, NORDEEN SK, MALLER JL. The cyclin B2 component of MPF is a substrate for the c-mos Proto-Oncogene Product. *Cell* 1990; **61**: 825–831.
- [70] SAGATA N, OSKARSSON M, COPELAND T, BRUMBAUGH J, WOODE GV. Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* 1988; **335**: 519–525.
- [71] SIMANIS V, NURSE P. The cell cycle control gene cdc2+ of yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell* 1986; **45**: 261–268.
- [72] SMITH LD, ECKER RE. The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol* 1971; **25**: 233–247.
- [73] SOLOMON M, BOHNER R, KIRSCHNER M, BEACH D. Cyclin in fission yeast. *Cell* 1988; **54**: 738–739.
- [74] STANDART N, MINSHULL J, PINES J, HUNT T. Cyclin synthesis, modification and destruction during meiotic maturation of the starfish oocyte. *Dev Biol* 1987; **124**: 248–258.
- [75] STILLMAN B. Initiation of Eukaryotic DNA Replication in Vitro BioEssays. 1988; **9**: 56–60.
- [76] STUDZINSKI GP. Oncogenes, growth and the cell cycle: an overview. *Cell Tissue Kinet* 1989; **22**: 405–424.
- [77] SWENSON KI, RARELL KM, RUDERMAN JV. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M-phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 1986; **47**: 861–870.
- [78] VERDE F, LABBE JC, DOREE M, KARSENTI E. Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature* 1990; **343**: 233–238.
- [79] WESTENDORF JM, SWENSON KI, RUDERMAN JV. The role of cyclin B in meiosis I. *J Cell Biol* 1989; **108**: 1431–1444.

Otrzymano 10 marca 1991 r.

Przyjęto 17 maja 1991 r.

Adres autora: ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

GEN *bcl-2* W PATOFIZJOLOGII LIMFOCYTÓW B

Bcl-2 GENE IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF B LYMPHOCYTES

Janusz KOCKI, Danuta ROŻYŃKOWA

Zakład Genetyki Medycznej Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie. Nazwa i zainteresowanie genem *bcl-2* (od *B-cell leukemia/lymphoma*) wynikały z powodu wykrycia rearanzacji nieznanego dotychczas genu w komórkach chłoniaka B-limfocytowego z translokacją t(14; 18), zestawiającą ten locus genu z genem ciężkiego łańcucha immunoglobuliny. Na podstawie piśmiennictwa przedstawiono możliwą rolę *bcl-2* w onkogenezie oraz w biologii komórek linii B w centrum rozrodczym grudki chłonnej. Opisano strukturę, transkrypty i produkty genu *bcl-2* oraz przedstawiono pogląd i doświadczenia na temat lokalizacji komórkowej białka Bcl-2. Opisano punkty złamań w genie *bcl-2* wykrywalne przez sondy molekularne w patologicznych sytuacjach i przedstawiono pewne różnice w geograficznym rozmieszczeniu przypadków chłoniaków grudkowych z translokacją t(14, 18). Rekonstrukcja molekularnych następstw tej translokacji została zrealizowana przez transfekcję linii komórkowych *in vitro* i komórek rozrodczych myszy *in vivo* konstruktami *bcl-2-Ig* lub *bcl-2-myc*. Przytoczono m.in. hipotezę, wg której produkty deregulowanego genu *bcl-2* hamują proces apoptozy w centrach rozrodczych grudek chłonnych. Przetrwale klony komórkowe byłyby dłużej narażone na inne patogeny w ewolucji chłoniaków.

Summary. The name and growing interest in *bcl-2* gene locus results from the rearrangement of this hitherto unknown gene in human follicular B-cell lymphoma carrying a interchromosomal 14; 18 translocation juxtaposing the Ig_H gene locus with *bcl-2* gene. Literature about the possible role of deregulated *bcl-2* gene in oncogenic transformation capacity and in the biology of B-derived follicular centre cells has been presented. Molecular structure, transcripts and products of the *bcl-2* gene have been referred. Opinions and experimental proofs about the cellular localisation of Bcl-2 protein are reviewed. Studies of break cluster regions in *bcl-2* gene detectable with molecular genetical probes reflect a geographic difference in lymphoma genesis with molecular events related to the translocation 14; 18. The molecular consequences of the t(14; 18) was reconstructed by generating minigene constructs of the *bcl-2-Ig* fusion gene and introducing it into cell lines cultures and germ line cells of mice. Resulting hypothesis points to a survival advantage of B cells in transgenic mice and follicular lymphoproliferation due to suppressed apoptosis processes in lymph node germinal centres. The deregulated *bcl-2-Ig* transgene prolongs the survival of clonal B cell population thereby increasing their exposition to other pathogens during lymphoma evolution.

WPROWADZENIE

Region q32 chromosomu 14 zawierający locus genu ciężkiego łańcucha immunoglobuliny jest najczęściej opisywanym miejscem translokacji chromosomowych w B-komórkowych chłoniakach nieziarniczych [21, 26, 54, 55]. Rekombinacja jednego z alleli tego genu w wyniku aktywności rekombinazy DNA jest istotnym etapem w prawidłowym dojrzewaniu komórki pre-B do dojrzałego limfocytu B [53]. Translokacja w tym miejscu nie jest więc przypadkowym zdarzeniem w rozwoju chłoniaków, ponieważ powoduje przemieszczenie do regionu ciężkiego łańcucha immunoglobuliny innych genów, znajdujących się dotychczas w swoich typowych locus w innych chromosomach (tabela 1).

TABELA 1. Mechanizmy aktywacji onkogenów komórkowych w chłoniakach i białaczkach B-komórkowych

Onkogen	Translokacja	Gen zestawiony z onkogenem	Znacznie wzmóŜona ekspresja onkogeny	Rozłączenie z regionami kontroli	Hybrydowy gen; zmieniony produkt
<i>c-myc</i>	t(2; 8)	Ig κ	+	+	
<i>c-myc</i>	t(8; 14)	IgH	+	+	
<i>c-myc</i>	t(8; 22)	Ig λ	+	+	
<i>c-abl</i>	t(9; 22)	bcr	+	+	+
<i>bcl-1</i>	t(11; 14)	IgH	+	+	
<i>bcl-2</i>	t(14; 18)	IgH	+	+	
<i>bcl-2</i>	t(18; 22)	Ig λ	+	+	

W chłoniakach takie złamania chromosomu 14 często dotyczą równocześnie chromosomów: 8, 11 i 18. W miejscach tych złamań znajdują się odpowiednio geny: *c-myc*, *bcl-1* i *bcl-2*. Deregulacja komórkowego protoonkogeny *c-myc* z translokacją t(8; 14) została szczególnie udokumentowana w guzie Burkitta [17, 21, 25]. Genom *bcl-1* i *bcl-2* przypisano hipotetyczną rolę w rozwoju chłoniaków, wynikającą z naruszenia tych loci odpowiednio w translokacjach t(11; 14) lub t(14; 18) [17].

SzczególŃą uwagę w ostatnich latach poświęcono transkryptom kodowanym przez sekwencje przyległe do punktów złamań w chromosomie 18, nazwanym w 1984 r. locus *bcl-2* (od *B-cell leukemia/lymphoma*) [55]. Nie ma on retrowirusowego homologu, a na jego onkogeny potencjał wskazują doświadczenia z wykorzystaniem transfekcji DNA [44, 58, 63, 64]. Węzłowe zagadnienie sprowadza się obecnie nie tylko do roli, jaką deregulacja genu *bcl-2* może odgrywać w onkogenezie, ale przede wszystkim do funkcji prawidłowego produktu tego genu w biologii limfocytów B.

STRUKTURA, TRANSKRYPTY I PRODUKTY GENU *bcl-2*

LUDZKI GEN *bcl-2*

Ludzki gen *bcl-2* składa się z trzech eksonów, oddzielonych dwoma intronami [15, 58, 65]. Znana jest sekwencja genu *bcl-2*.*

*Cleary i wsp. [14] przeprowadzili analizę sekwencji cDNA genu *bcl-2* o długości 6030 pz, wyizolowanego z komórek linii białaczkowej SUP-B2. Pierwszy kodon -ATG- zajmuje pozycje od 32 do 34 i odpowiada -AUG-

W procesie transkrypcji genu *bcl-2* powstają różnej długości mRNA: 3500 pz, 5500 pz i 8500 pz. W wyniku mechanizmu alternatywnych miejsc złożenia (ang. *splicing*) powstają następnie dwa białka: p26 alfa (26000 daltonów) i p22 beta (22000 daltonów) [58]. Sekwencje 196 N-końcowych aminokwasów obu białek są identyczne. Były porównywane z sekwencjami DNA znanych genów z banku danych komputerowych w Uniwersytecie w Wisconsin (USA) [14, 58].

Analiza sekwencji cDNA genu *bcl-2* wykazała, że część wspomnianych N-końcowych aminokwasów jest homologiczna z białkiem BHRF1 wirusa Epsteina-Barra (EBV) [37]. Skrót "BHRF1" zawiera oznaczenie dla części jednego z eksonów późnego antygeny EBV, mianowicie dla fragmentu restrykcyjnego H enzymu BamHI, w którym znajduje się jedna z większych ramek odczytu (RF – ang. *reading frame*). Sekwencja nukleotydów odcinka BHRF1 zajmuje pozycje od 54376 do 54948 w nici DNA wirusa Epsteina-Barra [7, 49, 52]. Jest ona zgodna w 25% z sekwencją DNA dla 149 aminokwasów białka Bcl-2. Można sugerować ewolucyjny związek obu białek [14].

Grupa Croce [30, 60] zaproponowała koncepcję, według której niskocząsteczkowe białka wiążące GTP w limfocytach B miałyby odpowiadać białku Bcl-2, której jednak nie potwierdzono. Korsmeyer i wsp. [31] wykazali, że istotnie Bcl-2 nie wiąże GTP i nie ma żadnego motywu w budowie cząsteczkowej dla łączenia się z nukleotydami.

Najważniejszym z ostatnich doniesień było opisanie subkomórkowej lokalizacji białka Bcl-2 w wewnętrznej błonie mitochondrialnej jako jej integralnego składnika [31]. Użyto pośredniej metody immunocytochemicznej posługując się przeciwciałami monoklonalnymi 6C8 chomika przeciw ludzkiemu białku Bcl-2 a wykrywanymi fluoresceinowaną surowicą kozią z przeciwciałami przeciw chomiczym IgG. Taka lokalizacja potwierdziła wcześniejsze obserwacje komórek ludzkiej linii RL-7 z translokacją t(14; 18), w których produkt immunofluorescencyjnego barwienia był rozmieszczony w cytoplazmie w postaci punkcików, odpowiadających rozmieszczeniu mitochondriów [31].

MYSI GEN *bcl-2*

Negrini i wsp. [40] analizowali strukturę mysiego genu *bcl-2* (*mbcl-2*) w locus mysiego chromosomu 1. Gen *mbcl-2* ma dwa eksony, oddzielone odcinkiem 15000 pz, niosące informację dla dwóch białek różniących się tylko sekwencją C-końcowych aminokwasów (podobnie jak w ludzkim genie *bcl-2*). Sekwencja mRNA długości 7500 pz koduje białko Mbcl-2 alfa, złożone z 236 aminokwasów. Drugi transkrypt, mRNA długości 2400 pz, zawiera informację dla białka Mbcl-2 beta zbudowanego ze 199 aminokwasów. Gen *mbcl-2* ma długie regiony nie ulegające translacji (koniec 5' – 1400 pz, koniec 3' – 5100 pz) otaczające krótkie regiony kodujące podobnie jak w ludzkim *bcl-2*.

W badaniu komórek wielu tkanek transgenicznych myszy transfekowanych *mbcl-2* okazało się, że najwyższy poziom ekspresji gen ten uzyskiwał w komórkach śledziony i grasicy, niższy – w komórkach nerwowych mózgu, śladowe ilości transkryptów stwierdzono w komórkach serca, nerek i wątroby [40].

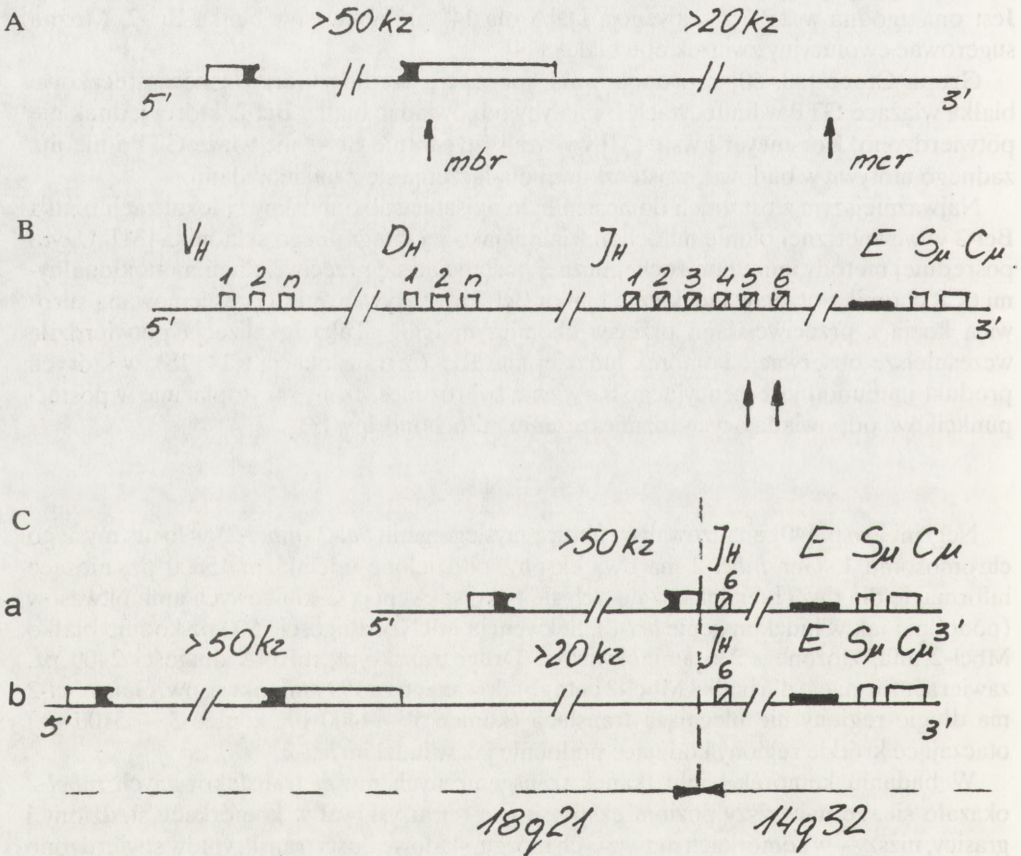
inicjującemu translację polipeptydów *bcl-2*. Sekwencje TATA i CCAAT promotora genu znajdują się o 50–75 nukleotydów dalej w kierunku 5'. Koniec 5' znajduje się więc wewnątrz odcinka 20–30 nukleotydów – licząc od miejsca startu transkrypcji. Kodon kończący ramkę odczytu znajduje się w pozycjach od 715 do 717, a sekwencja poli(A) znajduje się między nukleotydami w pozycjach od 6026 do 6030. Możliwa jest dodatkowa sekwencja poli(A) w pozycjach od 6007 do 6012. Sekwencja zawarta w eksonach zawiera informację dla 239 aminokwasów.

MECHANIZM TRANSLOKACJI T(14; 18)

REGIONY ZŁAMAŃ GENÓW *IgH* i *bcl-2*

Zaproponowano, że przyczyną translokacji t(14; 18) może być błędne odczytanie skewencji DNA genu łańcucha ciężkiego immunoglobuliny (*IgH*) przez rekombinazy Ig podczas rearanżacji i łączenia się segmentów VD z J w komórkach pre-B [19, 56, 57, 61].

Punkty złamań chromosomu 14 występują w miejscach fizjologicznych rekombinacji (wewnątrz segmentów J4 lub J6 genu łańcucha ciężkiego immunoglobuliny), co ilustruje rysunek 1B. W pobliżu znajdują się sekwencje sygnałowe rozpoznawane przez rekombinazy Ig [8, 12, 46, 61, 67].



Rys.1. Schemat budowy genów *IgH* i *bcl-2* wg Cottera [15]: A – schemat budowy genu *bcl-2*, pola zaczernione reprezentują region kodujący białka Bcl-2, pola niezaczernione odpowiadają segmentowi nie ulegającemu translacji w jednostce transkrypcyjnej *bcl-2*, strzałki pokazują regiony złamań mbr i mcr (opis w tekście); B – schemat budowy genu łańcucha ciężkiego Ig, strzałki pokazują miejsca złamań genu w regionie J, wielkimi literami oznaczono regiony genu, E – sekwencje wzmacniające (*enhancer*) genu *IgH*; C – zestawione geny po translokacji t(14; 18): a – po złamaniu genu *bcl-2* w regionie mbr, b – po złamaniu genu *bcl-2* w regionie mcr

W procesach tych może mieć również udział końcowa transferaza dezoksynukleotydo-
wa (TdT), odpowiedzialna za losowe wbudowywanie nukleotydów tworzących oligonu-
kleotydowe segmenty N w złączach rekombinacyjnych podczas rearanżacji genów *Ig* w
komórkach pre-B [11, 22, 32, 45, 48, 53, 66, 68, 69].

W badaniach molekularnych stwierdzono, że w miejscu połączenia chromosomów 14 i
18 występują wspomniane segmenty N, prawdopodobnie dołączone przez transferazę TdT
[3, 9, 10]. Obecność segmentów N wydaje się być dodatkowym argumentem, że translokacja
ta występuje już od wczesnego etapu rozwoju komórek pre-B, w którym są aktywne
rekombinazy *Ig* i transferaza TdT [22].

Na taki mechanizm translokacji t(14; 18) wskazują trzy obserwacje podane wg Croce i
wsp. [62]:

1. W większości chłoniaków typu nie-Burkitta punkty złamań chromosomu 14 leżą w
regionie 5' segmentu J genu *IgH*.

2. Dodatkowe nukleotydy (regiony N) były wykrywane w miejscach fuzji chromosomów
w translokacjach t(14; 18) i t(11; 14).

3. Sekwencje sygnałowe hepta- i nanomerów występujące w sąsiedztwie punktów fuzji
chromosomów 14 i 18 były podobne do sekwencji występujących w fizjologicznych połą-
czeniach VDJ.

Powyzsze sugestie wskazują, że rekombinazy *Ig* istotnie mogą omyłkowo łączyć segmen-
ty J genu *IgH* z genem *bcl-2* zamiast właściwego segmentu D genu *IgH*, dając początek
deregulacji procesów komórkowych i wzrostu. Fizjologiczne połączenia podczas rearan-
żacji genu *IgH* występują najczęściej między końcem 3' segmentu D i końcem 5' segmentu
J [9, 19, 32]. Stwierdzono, że fragment wywodzący się z chromosomu 18q- powstaje w
wyniku niewzajemnej translokacji [7, 15]. Następuje utrata DNA genu *IgH* w odcinku
między segmentami D i J w taki sposób, że region D łączy się z genem *bcl-2* (rys. 1C).
Delecji genu *bcl-2* nie obserwowano [15].

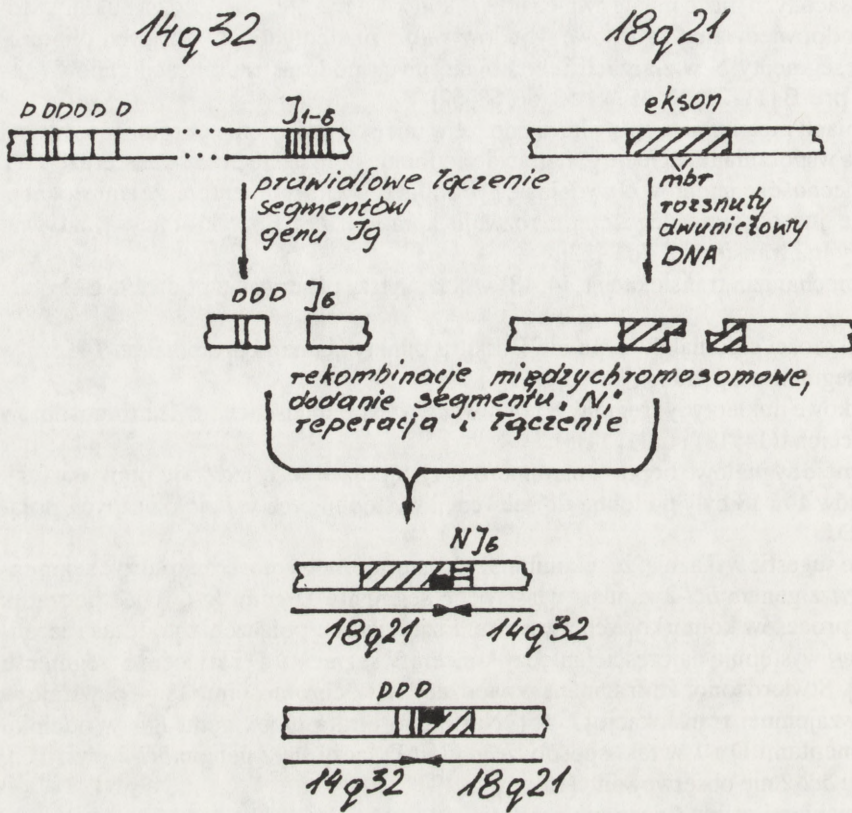
Z wyjaśnieniami grupy Croce nie zgadzają się Bakhsi i wsp. [8], którzy dowodzą, że
przerwanie chromosomu 18 nie może być związane z błędnym rozpoznawaniem sygnału
podobnego do sekwencji genów *Ig* czy też z przełączaniem dokonywanym przez rekombi-
nazę *Ig*, gdyż:

- region złamań 18q21 nie ma sekwencji hepta- czy nanomerów podobnych do
występujących w genach *Ig*, a Croce analizował sekwencje tych oligonukleotydów jedynie
w loci *Ig* w chromosomie 14, a nie w miejscach złamań chromosomu 18;

- region 18q21 nie ulega rekombinacji w normalnym rozwoju limfocytów B, wskazuje
na to brak aktywności rekombinacyjnej w tym regionie [8].

W związku z powyższym zaproponowano inny mechanizm translokacji t(14; 18). Punkt
złamań w chromosomie 18 nie byłby wynikiem działania rekombinaz *Ig*, a raczej działania
naturalnych enzymów reperacyjnych endonukleaz na rozsnuty (niestabilny, ang. *staggered*)
DNA [9]. Dowodem działania reperaz DNA w tym modelu mają być delecje kilku
nukleotydów w miejscu fuzji chromosomów 14 i 18, mechanizm ten przedstawiono na
rysunku 2.

Segment q21 chromosomu 18 należy do konstytutywnych miejsc łamliwych (*c-fra*) [72].
Sekwencje DNA punktów złamań chromosomu 18 były określane w materiale uzyskiwa-
nym z guza drogą biopsji lub pochodzącym z komórek linii wyprowadzonej z chłoniaków
grudkowych [8, 12, 55, 61].



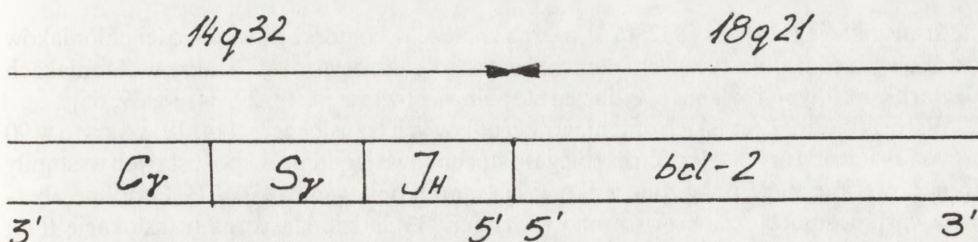
Rys. 2. Mechanizm translokacji t(14; 18) wg Bakhsiego [9]: połączenie czterech fragmentów chromosomów wytworzonych przez endonukleazę Ig w regionie 14q21 (po lewej stronie) oraz przez pęknięcie rozsnutego DNA w regionie mbr (po prawej stronie); w wyniku działania reperatury i transferazy TdT powstają segmenty N (opis w tekście, oznaczenia jak na rys. 1)

Punkty złamań w genie *bcl-2* grupują się w dwa regiony:

- w 50–60% znajdują się wewnątrz regionu mbr (ang. *major breakpoint region*), długości 150 par zasad, leżącym wewnątrz eksonu 3’;
- w 10–25% lokalizują się wewnątrz regionu mcr (ang. *minor cluster region*), długości 500 par zasad, leżącym w odległości większej niż 20000 pz od regionu mbr w kierunku 3’ w regionie nietranskrybowanym genu *bcl-2* [12, 13, 14, 16, 36, 59], co ilustruje rysunek 1A. Dotychczas nie znaleziono innych regionów złamań genu *bcl-2* [10, 15].

WYNIK TRANSLOKACJI

W większości przypadków chłoniaków grudekowych gen *bcl-2* jest włączony poniżej locus J genu *IgH* (*downstream*) w kierunku od 3’ do 5’ [56, 58, 61], co przedstawia rysunek 1C. W jednym tylko przypadku chłoniaków grudekowych z translokacją t(14; 18), w komórkach linii 989 [59], zaobserwowano włączenie genu *bcl-2* w kierunku od 5’ do 3’ (*upstream*, rys. 3) punkt złamania chromosomu 18 leżał w okolicy końca 5’ genu *bcl-2*.



Rys. 3. Wzajemne położenie genów w translokacji t(14; 18) w komórkach linii FL 989 wg Tsujimoto [59] (opis w tekście)

Gen *bcl-2* może być więc przeniesiony i zestawiony z genem *Ig* niezgodnie lub zgodnie z kierunkiem transkrypcji DNA. Ponieważ odległość między eksonami 3' i 5' genu *bcl-2* wynosi ok. 50000 pz, a ekson 5' jest długości 8500 pz, to odległość promotora *bcl-2* i sekwencji wzmacniających (*enhancer*) genu *Ig* jest większa niż 60000 pz. Wydaje się więc, że wpływ genu *Ig* na gen *bcl-2* nie zależy od odległości i może wiązać się z występowaniem elementów pośredniczących [59].

W 1989 roku opublikowano nowe dane dotyczące translokacji t(18; 22), w której *bcl-2* jest przeniesiony w pobliże genu lekkiego łańcucha lambda *Ig* (*Ig_L*) znajdującego się w chromosomie 22. Translokację tę wykryto w komórkach linii 1446 wyprowadzonej od pacjenta z przewlekłą białaczką limfatyczną B-komórkową [2]. Struktura połączenia genów *bcl-2/Ig_L* w pozycji jeden za drugim (tandem) odpowiada translokacji wymiennej z delecją dwóch i piętnastu par zasad. W translokacji t(18; 22) sekwencja *bcl-2* ma odwrotny kierunek transkrypcji w stosunku do sekwencji genu *Ig_L*. Punkt złamania w chromosomie 18 znajduje się wewnątrz regionu mbr genu *bcl-2*, podobnie jak we wspomnianej wyżej translokacji t(14; 18) w komórkach linii 989 [59]. Punkt złamania chromosomu 22 zlokalizowano w genie *Ig_L* w odległości 2200 pz od końca regionu J. Takie położenie zestawionych genów może być argumentem potwierdzającym hipotezę grupy Croce [1] na temat genezy tego przemieszczenia podczas fizjologicznej rekombinacji genu *Ig*.

Amakawa i wsp. [6] prowadzili badania cytogenetyczne komórek linii ciągłych wyprowadzonych z chłoniaków grudkowych. Kariotypy komórek tych linii cechował naddatek dwóch, trzech i czterech chromosomów 18q-. Ich wzory prążkowe były identyczne jak chromosomu 18q-, którego delecja była wynikiem translokacji t(14; 18). Analiza molekularna 18q- oraz 14q+ wykazała, że dodatkowe chromosomy 18q- nie są wynikiem braku rozdziału mitotycznego ani nie powstają de novo z translokacji t(14; 18). Są wynikiem reduplikacji jedynej kopii chromosomu 18q-, podobnie jak dodatkowy chromosom Ph' w kariotypach chorych z przewlekłą białaczką szpikową i pozachromosomowe fragmenty *double minutes* w komórkach nowotworowych.

ROZMIESZCZENIE GEOGRAFICZNE

Translokację t(14; 18) (q32; q21) można znaleźć w komórkach większości chłoniaków grudkowych centroblastycznych i centroblastyczno-centrocytowych, a także w chłoniakach nieziarnicznych typu rozlanego, o dużym stopniu złośliwości [4, 18, 29, 34, 38, 39, 65].

Wśród 106 amerykańskich chłoniaków grudkowych translokację t(14; 18) wykryto w 90 przypadkach, z których tylko 25 przebiegało stosunkowo łagodnie. U pozostałych wystąpiły dodatkowe aberracje połączone z aktywacją innych onkogenów [70, 71]. Podobne aberracje chromosomowe zaobserwowano w Szwecji [33], gdzie klasyczną translokację t(14; 18) znaleziono w 10 na 14 przypadków chłoniaków grudkowych. Grupa Japończyków w swoim materiale opisała tę translokację w 5 przypadkach z 10 chłoniaków grudkowych [5]. Na terenie Niemiec [29] przeprowadzono analizę molekularną 61 chłoniaków o różnej złośliwości. Translokacja t(14; 18), wykryta hybrydyzacją sondy molekularnej *bcl-2*, występowała w 12 guzach wywodzących się z komórki ośrodków rozmnażania grudek chłonnych (ang. *follicular centre cell*) [29]. Odmienne od powyższych wyników badań wypadły doniesienia autorów radzieckich [27]. W grupie 60 chłoniaków nie było żadnego przypadku chłoniaków grudkowych i translokacji t(14; 18).

Są również różnice geograficzne w występowaniu miejsc złamań genu *bcl-2*. W chłoniakach grudkowych w Japonii [5] i w Ameryce [65] złamania chromosomu 18 częściej lokalizują się w regionie mbr, natomiast w chłoniakach w Niemczech [29] częściej w regionie mcr. W związku z dużą odległością regionów mbr i mcr Cleary i wsp. [13] sugerują możliwość potencjalnie różnych mechanizmów patogenezy chłoniaków grudkowych (tab. 2).

TABELA 2. Rearanżacje genu *bcl-2* w komórkach chłoniaków grudkowych w Niemczech, Japonii i USA

Miejsce badań	Liczba przypadków	Rearanżacje w regionie			
		mbr		mcr	
		+	%	+	%
Uniwersytet Christiana Albrechta (Niemcy) [29]	18	4	22	6	33
Uniwersytet Kyoto Japonia [5]	30	8	26	2	7
Uniwersytet Stanford USA [65]	36	21	58	11	31
Instytut Wistar (USA) [56]	17	9	53	nie badano	
Narodowy Instytut Raka USA [8]	11	6	55	nie badano	
Uniwersytet Texas USA [5]	31	21	68	nie badano	

Dane powyższe jak również znaczące różnice w częstości występowania chłoniaków grudkowych w różnych populacjach świata wskazują na ewentualne geograficzne zależności patogenezy chłoniaków, na które mogą wpływać specyficzne warunki klimatyczne, środowiskowe, żywienia, wirusy latentne i inne nieznanne.

BADANIA ROLI GENU *bcl-2* IN VITRO I IN VIVO

LINIE KOMÓRKOWE

Aktywacja ludzkiego genu *bcl-2* towarzyszy stymulacji mitogennej prawidłowych limfocytów B i T [40, 43, 56, 63]. Wysoki poziom ekspresji tego genu obserwowano w przebiegu wzrostu limfocytów B unieśmiertelnionych zakażeniem wirusem Epsteina-Barra [63]. Podobnie wysoki poziom ekspresji genu *bcl-2* umożliwił przeżycie i wzrost komórek ludzkich linii limfoidalnych i mielopoetycznych pomimo braku w hodowlach odpowiedniego czynnika wzrostu oraz ubogiego składu pożywek [2, 63, 64].

Wyniki tych badań pozwalają przypuszczać, że białko Bcl-2 alfa uczestniczy w cyklu komórkowym i reguluje tor przekaźnikowy sygnałów mitogennych. Możliwy jest udział produktu genu *bcl-2* w przesyłaniu sygnału śródkomórkowego, wyzwolonego przez czynniki wzrostowe obecne w surowicy lub wyzwolone interakcjami międzykomórkowymi. Wniosek taki sugeruje Tsujimoto [63] na podstawie wyników hodowli komórek, które w drodze transfekcji otrzymały wektor ekspresji z wbudowanym genem *bcl-2* i których proliferacji towarzyszyło zwiększenie ekspresji tego genu.

Według Vaux i wsp. [64] produkty genu *bcl-2* umożliwiają przedłużone trwanie limfocytów B prawdopodobnie w stadium G₀. Wniosek taki wypłynął z doświadczenia, w którym ludzki gen *bcl-2* wprowadzono do komórek linii limfoidalnej i oddzielnie do komórek linii mieloidalnej – linii komórkowych, które potrzebują do wzrostu interleukiny 3. Okazało się, że *bcl-2* w nieobecności interleukiny 3 podtrzymywał przeżycie komórek w stadium G₀. Można spekulować, że przetrwały w ten sposób klon komórek w centrum rozrodczym grudki chłonnej mógłby być prekursorowym w proliferacji nowotworowej – pod warunkiem jednak aktywacji innego onkogenu, np. *c-myc* w tych komórkach [20, 41, 42].

W celu określenia, czy *bcl-2* ma właściwości onkogenu, gdy działa sam lub w kooperacji z deregulowanym genem *c-myc*, wprowadzono za pomocą retrowirusowego wektora cDNA ludzkiego *bcl-2* do komórek szpiku myszy normalnych i komórek szpiku myszy transgenicznym E_{mi}-myc (cechujących się konstytutywną ekspresją genu *c-myc*). W wyniku tych manipulacji na poziomie ukierunkowanych linii dojrzewania okazało się, że gen *bcl-2* istotnie kooperował z *c-myc* w proliferacji komórek pre-B szpiku in vitro. Niektóre klonokreślono nawet jako tumorogenne [64].

W związku z tymi doświadczeniami powstało pytanie, czy wysoki poziom ekspresji genu *bcl-2*, do którego dochodzi w następstwie translokacji t(14; 18) i deregulacji funkcji genu *bcl-2*, może być odpowiedzialny za onkogenezę?

Na to pytanie częściowo odpowiada doświadczenie Reeda i wsp. [44]. Sekwencje DNA kodujące białka Bcl-2 alfa i Bcl-2 beta subklonowano w wektor ekspresji pSV-CAT (plazmid ten zawierał wczesny region promotora wirusa SV 40 oraz część genu acetylotransferazy chloramfenikolu (CAT), służącego jako marker transkrypcji połączonych genów *bcl-2*-CAT), i transfekowano do fibroblastów mysiej linii NIH 3T3. Jako pozytywne kontrole służyły komórki transfekowane aktywnym ludzkim onkogenem Ha-ras i mysim *c-myc*. W hodowli jednowarstwowej nie zaobserwowano rosnących kolonii transformowanych komórek po transfekcji *bcl-2*, w odróżnieniu od ognisk wielowarstwowej proliferacji transformowanych komórek po transfekcji Ha-ras. Jednak gdy komórki linii NIH 3T3, transfekowane DNA *bcl-2*, wszczepiono podskórnie bezgrasiczym myszom napromienionym dawką 300 radów, to po czterech tygodniach latencji pojawiły się guzy różnej

wielkości, które rosły z różną szybkością i powodowały śmierć gospodarza w ciągu 8–12 tygodni. Po przeprowadzeniu badań molekularnych transkryptów i ich produktów nie stwierdzono jednak żadnych rearanżacji genu *bcl-2*, które mogłyby wyjaśnić jego onkogenność w warunkach *in vivo* [44].

Reasumując opisane doświadczenie, w przeciwieństwie do innych onkogenów kodujących białka błonowe z rodziny *ras* czy *erb* produkt genu *bcl-2* nie okazał się bezpośrednim induktorem transformacji nowotworowej komórek linii NIH 3T3 [54, 58]. *In vivo* indukował jednak wzrost nowotworu – może przy współdziałaniu czynników, których nie było w hodowli.

MODEL MYSZY TRANSGENICZNYCH

Wprowadzenie do genomu myszy transgenicznego konstrukt zlożonego z genu *bcl-2* i regionu J genu *IgH* powodowało, że u dorosłych myszy gromadziły się w grudekach chłonnych dojrzałe limfocyty B [35]. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że produkty genu *bcl-2* mogą hamować procesy apoptozy w centrach rozrodczych grudek chłonnych. W związku z tym Liu i wsp. [35] zaproponowali, że z patogenezą chłoniaków grudkowych mógłby być związany defekt w systemie fizjologicznej selekcji komórek w centrach rozrodczych grudek chłonnych, polegający na eliminacji nadmiaru niekompletnych limfocytów.

Grupa Korsmeyera [23] dostarczyła pierwszego dowodu na onkogenność *bcl-2*. Utworzono konstrukt o składzie: intron I i region *mbr* genu *bcl-2*, segment J6, sekwencje wzmacniające (*enhancer*) i region stały gamma 1 genu *IgH*. Otrzymany w ten sposób minigen wprowadzono do jąder komórek zarodków myszy, które reimplantowano do jamy macicy pseudociężarnych myszy. W okresie od ośmiu do trzynastu tygodni pobierano metodą biopsji komórki różnych tkanek – wątroby, śledziony, grasicy, mózgu i płuc – i zakładano hodowle. Metodą hybrydyzacji wykryto wzmożoną ekspresję transgenu *bcl-2/IgH* w komórkach grasicy i śledziony. Komórki te tworzyły w hodowli utkanie podobne do guzkowego rozrostu w chłoniakach i przeżywały dosyć długo mimo ubogiej pożywki. Natomiast w śledzionach trzynastotygodniowych transgenicznych myszy zaobserwowano nadmierny rozrost grudek chłonnych miazgi białej oraz zmiany utkania w węzłach chłonnych przyaortalnych i kręzkowych charakterystyczne dla chłoniaków guzkowych [23].

W następnej serii badań tych samych autorów po dłuższej obserwacji myszy transgenicznych okazało się, że obecność w genomie deregulowanego genu *bcl-2* prowadzi do przejścia z proliferacji poliklonalnej do monoklonalnej [24]. Po okresie długiej latencji łagodny chłoniak grudkowy uległ progresji w złośliwą postać chłoniaka o typie rozlanym wywodzącym się z komórek o niższym stopniu różnicowania. U połowy złośliwych guzów znaleziono dodatkowo rearanżacje genu *c-myc*. Opisany zwierzęcy model progresji chłoniaków grudkowych jest istotnym dowodem na to, że wydłużone życie limfocytów B wynikające z ciągłej ekspresji genu *bcl-2*, może częściej prowadzić do wyższej złośliwości chłoniaków, której przyczyną jest dłuższa ekspozycja na patogeny.

Synergizm między genami *bcl-2* i *c-myc* obserwowano w badaniach podwójnie transgenicznych myszy *E_{mi}-bcl-2/myc* [51]. U myszy tych wystąpiła także hiperproliferyacja limfocytów pre-B i B. Makroskopowo widoczne były guzy nowotworowe nawet znacznie większe niż u myszy transgenicznych *E_{mi}-myc* [23]. Guzy te wywodziły się z wczesnych komórek hemopoetycznych, prawdopodobnie limfoidalnych komórek macierzystych. Opisane guzy mogą być odpowiednikami chłoniaków o dużym stopniu złośliwości, w których występują

obie chromosomowe translokacje t(14; 18) i t(8; 14) dotyczące rearanżacji genów *bcl-2* i *c-myc* [42].

UWAGI KOŃCOWE

Udział genu *bcl-2* wysunął się na pierwszy plan wśród postulowanych zmian genetycznych w komórkach chłoniaka guzkowego. Udowodnienie jednak pierwotnego znaczenia w inicjacji złośliwego klonu i progresji procesu nowotworowego nie jest łatwe chociażby z dwóch względów: niewyjaśniona jest biologiczna rola tego genu i nie zawsze jego naruszenie, manifestowane translokacją t(14; 18), zostało odnotowane w kariotypie chłoniaka guzkowego.

Badania genu *bcl-2* rozszerzyły się zatem na podejście molekularne tak w hodowli stymulowanych prawidłowych limfocytów, jak i w badaniach nowotworów B-komórkowych. Obejmują one przede wszystkim reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) [47], która pozwala wykryć translokację t(14; 18) w obu regionach chromosomu 18 – mbr i mcr – z czułością 1 na 100 000 komórek [28, 29, 50]. Otwiera to nowe możliwości diagnostyczne procesów wznowy chłoniaków guzkowych oraz ich molekularnej progresji w początkowej fazie choroby, gdy nie występują jeszcze kliniczne objawy zezłośliwienia [10, 16, 50].

PIŚMIENICTWO

- [1] ADACHI M, COSSMAN J, LONGO D, CROCE CM, TSUJIMOTO Y. Variant translocation of the *bcl-2* gene to immunoglobulin lambda light chain gene in chronic lymphocytic leukaemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2771–2774.
- [2] ADACHI M, TSUJIMOTO Y. Juxtaposition of human *bcl-2* and immunoglobulin lambda light chain gene in CLL is the result of reciprocal chromosome translocation between chromosome 18 and 22. *Oncogene* 1989; **4**: 1073–1075.
- [3] AISENBERG AC, WILKES BM, JACOBSON JO, HARRIS NL. Immunoglobulin gene rearrangements in adult non-Hodkin's lymphomas. *Am J Med* 1987; **82**: 738–744.
- [4] AISENBERG AC, WILKES BM, JACOBSON JO. The *bcl-2* gene is rearranged in many diffuse B-cell lymphomas. *Blood* 1988; **71**: 969–972.
- [5] AMAKAWA R, FUKUHARA S, OHNO H, DOIS, OGUMA S, TANABE S, YAMABE H, EDAMURA S, TOMONO N, NASU K, KONAKA Y, SHIOMURA T, ABEM, WAKASA H, UCHINO H. Involvement of *bcl-2* gene in Japanese follicular lymphomas. *Blood* 1989; **73**: 987–991.
- [6] AMAKAWA R, FUKUHARA S, OHNO S, TANABE S, HORII M, MATSUYAMA F, KATO J, KAKITO T, NAGAUCHI O. Amplified and rearranged *bcl-2* gene in two lymphoma cell lines, FL-218 and FL-318 carrying a 14; 18 translocation. *Cancer Res* 1990; **50**: 2423–2428.
- [7] BAER B, BANKIER AT, BIGGIN MD, DEININGER PL, FARRELL PJ, GIBSON TJ, HUTFUL G, HUDSON GS, SATCHWELL SC, SEQUIN C, TUFFNELL PS, BARRELL BG. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 1984; **310**: 207–211.
- [8] BAKHSI A, JENSEN JP, GOLDMAN P, WRIGHT JJ, Mc BRIDE OW, EPSTEIN AL, KORSMEYER SJ. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14; 18) human lymphomas: clustering around J_H on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; **41**: 899–906.
- [9] BAKHSI A, WRIGHT JJ, GRANINGER W, SETO M, OWENS J, COSSMAN J, JENSEN JP, GOLDMAN P, KORSMEYER SJ. Mechanism of the t(14; 18) chromosome translocation: structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 2396–2400.

- [10] BO-YEE N, NOURSE J, CLEARY ML. Detection of chromosomal translocation t(14; 18) within the minor cluster region of bcl-2 by polymerase chain reaction and direct genomic sequencing of the enzymatically amplified DNA in follicular lymphomas. *Blood* 1989; **73**: 1759–1762.
- [11] CLARK SS, Mc LAUGHLIN J, CRIST WM, CHAMPLIN R, WRITTE OW. Unique forms of the abl tyrosine kinase distinguish Ph⁺-positive CML from Ph⁺-positive ALL. *Science* 1987; **235**: 85–88.
- [12] CLEARY ML, SKLAR J. Nucleotide sequence of a t(14; 18) chromosome breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 7439–7443.
- [13] CLEARY ML, GALILIN, SKLAR J. Detection of a second t(14; 18) breakpoint cluster region in follicular lymphoma. *J Exp Med* 1986; **164**: 315–320.
- [14] CLEARY ML, SMITH SD, SKLAR J. Cloning and structural analysis of cDNA for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14; 18) translocation. *Cell* 1986; **47**: 19–28.
- [15] COTTER FE. The role of the bcl-2 gene in lymphoma. *Brit J Hematology* 1990; **75**: 449–453.
- [16] CRESCENZI M, SETO M, HERZIG GP, WEISS PD, GRIFFITH RC, KORSMEYER SJ. Termostable DNA polymerase chain amplification of t(14;18) chromosome breakpoints and detection of minimal residual disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 4869–4873.
- [17] CROCE CM, THIERFELDER W, ERIKSON J, NISHIKURA K, FINAN J, LENOIR G, NOWELL PC. Transcriptional activation of an unrearranged and untranslocated c-myc oncogene by translocation of a C lambda locus in Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 6922–6926.
- [18] CROCE CM, NOWELL PC. Molecular basis of human neoplasia. *Blood* 1985; **65**: 1–7.
- [19] CROCE CM. Role of chromosome translocations in human neoplasia. *Cell* 1987; **49**: 155–156.
- [20] CROCE CM. Genetic mechanisms in B-cell neoplasia. [w] Bird G, Calvert JE [red] B lymphocytes in human disease. Oxford University Press 1988: 345–379.
- [21] DALLA-FAVERA R, BREGNI M, ERIKSON J, PATTERSON D, GALLO RC, CROCE CM. Assignment of the human c-myc oncogene to the region of chromosome 8 which is translocated in Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 7824–7827.
- [22] DESIDERIO SV, YANCOPOULOS DG, PASKIND M, THOMAS E, BOSS MA, LANDAU N, ALF FW, BALTIMORE D. Insertion of N regions into heavy chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* 1984; **311**: 752–755.
- [23] Mc DONNELL TJ, DEANE N, PLATT FM, NUNEZ G, JEAGER U, Mc KEARN JP, KORSMEYER SJ. Bcl-2-Immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B-cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989; **57**: 79–88.
- [24] Mc DONNELL TJ, KORSMEYER SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 1991; **349**: 254–256.
- [25] ERIKSON J, NISHIKURA K, ar-RUSHDI A, FINAN J, EMANUEL B, LENOIR G, NOWELL PC, CROCE CM. Translocation of an immunoglobulin locus to a region 3' of an unrearranged c-myc oncogene enhances c-myc transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 7581–7585.
- [26] ERIKSON J, FINGER L, SUN L, ar-RUSHDI A, NISHIKURA K, MINOWADA J, FINAN J, EMANUEL BS, NOWELL PC, CROCE CM. Deregulation of c-myc by translocation of the alpha-locus of the T cell receptor in T cell leukaemias. *Science* 1986; **232**: 884–886.
- [27] FLEISCHMANN EW, PRIGOGINA EL, LLYNSKAYA GW, PROBATORA NA, KONSTANTINOVA LN, KRUGLOVA GV, VOLKOVA MA, OSMANOV DS. Chromosomal characteristic of malignant lymphomas. *Hum Genet* 1989; **82**: 343–348.
- [28] GRIESSER H, TKACHUK D, REIS MD, MAK TW. Gene rearrangements and translocations in lymphoproliferative disease. *Blood* 1989; **73**: 1402–1415.
- [29] GRIESSER H, LENNERT K. Bcl-2 gene rearrangements in malignant B-cell lymphomas. *Brit J Hematology* 1990; **75**: 142–143.
- [30] HALDAR S, BEATY C, TSUJIMOTO Y, CROCE CM. The bcl-2 gene encodes a novel G protein. *Nature* 1989; **342**: 195–199.
- [31] HOCKENBURY D, NUNEZ G, MILLIMAN G, SCHREIBER RD, KORSMEYER SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; **348**: 334–336.
- [32] HOOD L, KRONENBERG M, HUNKAPILLER T. T cell antigen receptor and the immunoglobulin supergene family. *Cell* 1985; **40**: 225–229.
- [33] KRISTOFFERSSON U, HEIM S, MANDAHL N, OLSSON H, RANSTAM J, AKERMAN M, MITELMAN F. Prognostic implication of cytogenetic findings in 106 patients with non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; **25**: 55–64.

- [34] KRISTOFFERSSON U, HEIM S, OLSSON H, AKERMAN M, MITELMAN F. Relationship between cytogenetic findings and histopathology in non-Hodgkin's lymphoma. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect A* 1987; **95**: 1-5.
- [35] LIU Y-J, JOSHUA DE, WILLIAMS GT, SMITH CA, GORDON J, MAC LENNAN ICM. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 1989; **342**: 929-931.
- [36] LIPFORD E, WRIGHT JJ, URBA W, WHANY-PENY J, KIRSCH JR, RAFFELD M, COSSMAN J, LONGO DL, BAKHSHI A, KORSMEYER SJ. Refinement of lymphoma cytogenetics by the chromosome 18 q21 major breakpoint region. *Blood* 1987; **70**: 1816-1823.
- [37] LIPMAN DJ, PERSON WR. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 1985; **227**: 1433-1441.
- [38] MING-SHENG L. The gene located of chromosom 18 q21 is uncultured diffuse lymphomas as well as follicular lymphomas. *Blood* 1987; **70**: 90-98.
- [39] National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphoma: Summary and description of a working formulation for clinical usage. The non-Hodgkin's lymphomas pathologic classification project. *Cancer* 1982; **49**: 2112-2135.
- [40] NEGRINI M, SILINI E, KOZAK C, TSUJIMOTO Y, CROCE CM. Molecular analysis of mbcl-2 structure and expression of the murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. *Cell* 1987; **49**: 455-463.
- [41] NUNEZ G, SETO M, SEREMETIS S, FERRERO D, GRIGNANI F, KORSMEYER SJ, DALLA-FAVERA R. Growth- and tumor-promoting effects of deregulated BCL2 in human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 4589-4593.
- [42] PEGORARO L, PALUMBO A, ERIKSON J, FALDA M, GIOVANAZZO B, EMANUEL BS, ROVERA G, NOWELL PAC, CROCE CM. A t(14; 18) and t(8; 14) chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukaemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 7166-7170.
- [43] REED JC, TSUJIMOTO Y, ALPERS JD, CROCE CM, NOWELL PC. Regulation of bcl-2 proto-oncogene expression during normal human lymphocyte proliferation. *Science* 1987; **236**: 1295-1299.
- [44] REED JC, CUDDY M, SLABIAK T, CROCE CM, NOWELL PC. Oncogenic potential of bcl-2 demonstrated by gene transfer. *Nature* 1988; **336**: 259-261.
- [45] RETH MG, AMIRATI P, JACKSON S, ALF FW. Regulated progression of a cultured pre-B cell line to the B cell stage. *Nature* 1988; **317**: 353-355.
- [46] ROŻYŃKOWA D, RUPNIEWSKA ZM. Wieloletapowa patogeneza chłoniaków. *Post Biol Kom* 1989; **16**: 225-267.
- [47] SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULIS KB, EREICH HA. Primer direct enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; **239**: 487-491.
- [48] SHOWELC, CROCE CM. Chromosome translocations in B and T cell neoplasias. *Seminars in Hematology* 1986; **23**: 237-244.
- [49] SPECK SH, STROMINGER JL. Analysis of the transcript encoding the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen I: A potentially polycistronic message generated by long-range splicing of several exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 8305-8309.
- [50] STETTLER-STEVENSON M, RUFFELD M, COHEN P, COSSMAN J. Detection of occult follicular lymphoma by specific DNA amplification. *Blood* 1988; **72**: 1822-1825.
- [51] SRASSER A, HARRIS AW, BATH ML, CORY S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 1990; **348**: 331-333.
- [52] SUGDEN B, YATES J, MARK W. Transforming functions associated with Epstein-Barr virus. *J Invest Dermatol* 1984; **83**: 82s-87s.
- [53] TONEGAWA S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; **302**: 575-581.
- [54] TSUJIMOTO Y, YUNIS JJ, ONORATO-SHOWE L, ERIKSON J, NOWELL PC, CROCE CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B cell lymphomas and leukaemias with the t(11; 14) chromosome translocations. *Science* 1984; **224**: 1403-1406.
- [55] TSUJIMOTO Y, FINGER LR, YUNIS JJ, NOWELL PC, CROCE CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14; 18) chromosome translocations. *Science* 1984; **226**: 1097-1099.
- [56] TSUJIMOTO Y, COSSMAN J, JAFFE E, CROCE CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; **228**: 1440-1443.
- [57] TSUJIMOTO Y, JAFFE E, COSSMAN J, GORHAM J, NOWELL PC, CROCE CM. Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B cell neoplasms with t(11; 14) chromosome translocation. *Nature* 1985; **315**: 340-343.

- [58] TSUJIMOTO Y, CROCE CM. Analysis of the structure, transcripts and protein products of bcl-2, the gene involved in follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **82**: 5214–5218.
- [59] TSUJIMOTO Y, BASHIR MM, GIVOL J, COSSMAN J, JAFFE E, CROCE CM. DNA rearrangements in human follicular lymphoma can involve the 5' or the 3' region of the bcl-2 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 1329–1331.
- [60] TSUJIMOTO Y, IKEGAKI N, CROCE CM. Characterisation of the protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Oncogene* 1987; **2**: 3–7.
- [61] TSUJIMOTO Y, GORHAM J, COSSMAN J, JAFFE E, CROCE CM. The t(14; 18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1988; **229**: 1390–1393.
- [62] TSUJIMOTO Y, LOUIE E, BASHIR MM, CROCE CM. The reciprocal partners of both the t(14; 18) and the t(11; 14) translocations involved in B cell neoplasms are rearranged by the same mechanism. *Oncogene* 1988; **2**: 347–351.
- [63] TSUJIMOTO Y. Overexpression of the human bcl-2 gene product result in growth enhancement of Epstein-Barr virus - immortalized B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1958–1962.
- [64] VAUX DL, CORY S, ADAMS JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; **335**: 440–442.
- [65] WEISS LM, WARNKE RA, SKLAR J, CLEARY ML. Molecular analysis of the t(14; 18) chromosome translocation in malignant lymphomas. *N Eng J Med* 1987; **317**: 1185–1189.
- [66] WYLLIE AH, MORRIS RG, SMITH AL, DUNLOP D. Chromatin cleavage in apoptosis associated with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Path* 1984; **142**: 67–77.
- [67] YANCOPOULOS GD, BLACKWELL TK, SUH H, HOOD L, ALF FW. Intruded T cell receptor variable gene segments recombine in pre-B cells, evidence that B and T cells use common recombinase. *Cell* 1986; **44**: 251–259.
- [68] YUNIS JJ, MARTIN MM, OKEN MM, KAPLAN ME, ENSRUD KM, HOWE RR, THEOLOGIDES A. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Eng J Med* 1982; **307**: 1231–1236.
- [69] YUNIS JJ, OKEN MM, THEOLOGIDES A, HOWE RB, KAPLAN ME. Recurrent chromosomal defects are found in most patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; **13**: 17–28.
- [70] YUNIS JJ, FRIZZERA G, OKEN MM, Mc KENNA J, THEOLOGIDES A, ARNESEN M. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Eng J Med* 1987; **316**: 79–84.
- [71] YUNIS JJ, MAYER MG, ARNESEN MA, AEPPLI DP, OKEN MM, FRIZZERA G. Bcl-2 and other genomic alternation in the prognosis of large-cell lymphomas. *N Eng J Med* 1989; **320**: 1047–1054.
- [72] YUNIS JJ, SORENG AL. Fragile sites a targets of diverse mutagens and carcinogens. *Oncogene* 1987; **1**: 59–69.

Otrzymano kwiecień 1991 r.

Przyjęto maj 1991 r.

Adres autorów: 20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8

SYNTETYCZNE OLIGONUKLEOTYDY W LECZENIU NOWOTWORÓW – NADZIEJE I TRUDNOŚCI

SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES IN THE TUMOUR SPECIFIC THERAPY – PROMISES AND DIFFICULTIES

Zofia M. RUPNIEWSKA

Klinika Hematologii II Katedry Chorób Wewnętrznych AM w Lublinie

Streszczenie. Wykrycie, że podstawową różnicą genetyczną między prawidłowymi a nowotworowymi komórkami jest przemiana proto-onkogenów w zmienione lub aktywne onkogeny, stwarza nowe możliwości prowadzenia specyficznego leczenia chorób nowotworowych. Jeśli bowiem zostanie zahamowana ekspresja odpowiednich aktywnych onkogenów, prawdopodobna staje się hipoteza, że nowotworowe komórki powrócą do prawidłowego fenotypu i ulegną dalszemu różnicowaniu do końcowych komórek efektorowych. Konieczne jest jednak wcześniejsze udowodnienie słuszności tej hipotezy w stosunku do różnych rodzajów komórek nowotworowych in vitro. Pod tym względem, jak się wydaje, poważne szanse mają antysensowe oligodeoksynukleotydy jako sekwencje specyficznie hamujące ekspresję onkogenów.

Summary. The identification of altered or activated cellular protooncogenes as the basic biochemical difference between tumour cells and normal cells has opened the possibility for development of tumour specific therapy. It may be hypothesized that malignant cells would revert to a more normal phenotype and might even be triggered into terminal differentiation to effectors cells. It is clear that the above suggestion must be verified in relation to different tumour cell types in vitro. For this purpose antisense oligonucleotide analogues appear to offer considerable promise as sequence specific inhibitors of oncogene expression

Obecnie rysuje się możliwość wykorzystania różnic genetycznych między prawidłowymi a nowotworowymi komórkami do wprowadzenia wybiórczej chemioterapii. Dotychczas stosowane metody chemioterapii, o ile są wybiórcze, to tylko w tym znaczeniu, że działają na komórki będące w cyklu mitotycznym, ale nie odróżniają komórek prawidłowych od komórek nowotworowych, co z jednej strony ogranicza wielkość dawki leku, a z drugiej powoduje uszkodzenie prawidłowych, ale intensywnie dzielących się tkanek.

Dokonane w ostatnim dwudziestoleciu postępy w genetyce molekularnej pozwalają przypuszczać, że za transformację nowotworową komórek jest odpowiedzialna przemiana prawidłowych proto-onkogenów w aktywne, nowotworowe onkogeny. Dotychczas wyizolowano ponad 40 różnych proto-onkogenów, tzw. *c-onc*, z których część wykazuje homologie z transformującymi onkogenami retrowirusów wywołujących nowotwory u zwierząt

tw. *v-onc*. Inna część tych onkogenów pochodzi z nowotworów człowieka lub linii komórek nowotworowych. Znana jest też lokalizacja wielu *c-onc* w ludzkich chromosomach. Przemiana proto-onkogeny w aktywny onkogen może zachodzić albo drogą zmian tak subtelných, jak punktowa mutacja (np. w raku drobnokomórkowym oskrzeli), lub wynikać ze zmian większych, takich jak częściowa delecja lub zmiana pozycji w następstwie translokacji (np. w chłoniaku Burkitta, w przewlekłej białaczce szpikowej), czyli przemieszczenia proto-onkogeny wewnątrz genomu. Translokacja proto-onkogeny może prowadzić do zmiany ekspresji, tj. do zmiany ilościowej i/lub jakościowej produktu protoonkogeny wymuszonej sąsiedztwem innych genów. Jeszcze innym mechanizmem aktywacji proto-onkogeny jest jego amplifikacja (np. w neuroblastoma) – wielokrotnienie kopii genu, które zachodzi podczas progresji nowotworu.

Z drugiej strony w scenariuszu genetycznym nowotworzenia ważną rolę odgrywają geny supresorowe, hamujące transformację nowotworową komórek, tzw. anty-onkogeny – geny przeciwnowotworowe. Utrata i/lub mutacja tych genów predysponują bezpośrednio lub pośrednio do wzrostu nowotworowego. Mechanizm bezpośredni odgrywa rolę w postaciach rodzinnych nowotworów, zwykle wieku dziecięcego lub guzów embrjonalnych. Mechanizm pośredni odgrywa rolę w zespołach wadliwej syntezy naprawczej DNA, w zespołach zwiększonej łamliwości.

W świetle powyższej dyskusji nad genetyką nowotworów uzasadnione jest założenie, że zahamowanie ekspresji odpowiednich onkogenów w komórce nowotworowej powinno zmniejszyć jej stopień transformacji, a nawet umożliwić wejście takiej komórki w proces różnicowania, kończący się w warunkach prawidłowych etapem dojrzałej komórki. Istnieją już dowody, że powyższe założenie jest prawdziwe, z czym wiąże się możliwość nowego sposobu terapii nowotworów. Terapia taka byłaby zarówno mniej toksyczna, jak i nowotworowo-specyficzna. Obecnie jednak jest za wcześnie na wdrażanie jej u ludzi, a prowadzone są badania udowadniające słuszność powyższego założenia w różnych układach modelowych *in vitro*. Podstawowe znaczenie ma wybór tych onkogenów, których ekspresja ma być zahamowana, ponieważ np. mutacja, która zapoczątkowuje transformację nowotworową, może zostać wyparta przez późniejsze zmiany genetyczne i staje się mniej istotna dla zachowania transformowanego fenotypu [30, 44].

Funkcja genu może być hamowana na poziomie DNA (transkrypcja), mRNA (translacja) lub białka (ekspresja). Najczęstszym sposobem bezpośrednich badań jest mikroiniekcja do komórki przeciwciał skierowanych przeciw produktowi genu. Na przykład Feramisco i wsp. [13] wykazali, że transformowane komórki z aktywnym genem *ras* po mikroiniekcji przeciwciała anty-RAS zmniejszają proliferację, a ich cechy morfologiczne stają się zbliżone do prawidłowych.

Innym podejściem jest zastosowanie [1, 16, 26, 32, 50] antysensowych (*antisense*) oligonukleotydów komplementarnych wobec sekwencji mRNA. Oligonukleotydy antysensowe znane jako "blokery" kodu genetycznego są przeznaczone do wiązania mRNA (na wzór hybrydyzacji) i blokowania dalszej przemiany RNA lub translacji. W ten sposób m.in. uniemożliwiają one syntezę tego białka, które jest chorobotwórczym produktem zmienionego genu. Natomiast długie, polinukleotydowe, antysensowe sekwencje mRNA syntetyzowane na matrycach wektorów ekspresji są mało przydatne ze względu na silne oddziaływanie z prawidłowym RNA niezmutowanego genu (*wild type gene*).

Obecnie największe nadzieje wiąże się z syntetycznymi oligonukleotydami lub ich analogami, które mogą być wytwarzane w dużych ilościach jako krótkie sekwencje 15–18-nukleotydowe o masie cząsteczkowej rzędu 5000. Ich zalety lecznicze będą zależały od:

- skuteczności wiązania danej sekwencji mRNA lub DNA (wydajności hybrydyzacji),
- oporności na działanie nukleaz,
- skutecznego przedostawania się do wnętrza komórki.

Spełnienie tych wymogów zostaje osiągnięte przez różne modyfikacje końców 3' oligonukleotydów wraz z zastąpieniem grupy fosforanowej przez izosteryczne grupy (np. mrowczanową) ze zmianą ładunku (analogi oligonukleotydów).

W tabeli 1, cytowanej z pracy Tidda [42], przedstawiono właściwości, które są pożądane oraz wady różnych oligonukleotydów.

TABLE. I. Właściwości niezmodyfikowanych oligodeoksynukleotydów antysensowych i ich strukturalnych analogów jako potencjalnych efektorów hamowania syntezy białka w nieuszkodzonych komórkach [wg 42]

Właściwości	Fosfodwuestry niezmodyfikowanych oligodeoksynukleotydów	Metylofosfonowe analogi oligodeoksynukleotydów	Tiolowe analogi oligodeoksynukleotydów	Alfa-analogi oligodeoksynukleotydów
Rozpuszczalność	+++	+	+++	+++
Pobieranie przez komórki	+	++	-	?
Stabilność biologiczna	-	+++	++	+++
Brak toksyczności	+	+++	-	?
Wydajność hybrydyzacji	+++	+	++	++
Aktywacja rybonukleazy H	+++	-	+++	-

(-) oznacza brak danej właściwości w stosunku do nieuszkodzonych komórek, (+) i (++) oznaczają słabo i nieco lepiej zaakcentowaną właściwość, (+++) oznacza dobrze lub bardzo dobrze zaakcentowaną cechę

● Fosfodwuestry niezmodyfikowanych oligodeoksynukleotydów (*normal phosphodiester oligonucleotides*) cechuje: dobra rozpuszczalność, sprawna i stabilna hybrydyzacja oraz działanie poprzez aktywację rybonukleazy H. Enzym ten podczas hybrydyzacji powoduje degradację RNA, co jest uważane za potencjalny mechanizm działania antysensowych oligonukleotydów na cząsteczki RNA. Z drugiej strony niezmodyfikowane oligodeoksynukleotydy są biologicznie niestabilne (podatne na działanie nukleaz), źle pobierane przez nieuszkodzone komórki w hodowli, a ponadto produkty ich rozkładu mogą działać toksycznie [11].

● Przeciwnie natomiast, metylofosfonowe analogi oligodeoksynukleotydów (*methylphosphonate oligodeoxynucleotide analogues*) są bardziej odporne na nukleazy niż struktury niezmodyfikowane oraz łatwiej pobierane przez komórki. Do ich wad należą: gorsza rozpuszczalność, zła hybrydyzacja z docelowym kwasem nukleinowym i oporność na bezpośrednie rozszczepienie RNA przez rybonukleazę H. Jak się wydaje, miejscem docelowym dla działania analogów metylofosfonowych jest koniec 5' inicjujący kodon i miejsce wycinania (*splitting*) intronów w mRNA przez rybonukleazę H. To niespecyficzne działanie może powodować zahamowanie syntezy białka [3, 6, 24, 25, 27, 38, 39]. Okazało się jednak, że niektóre analogi metylofosfonowe mogą mieć także działanie specyficzne, jak np. w doświadczeniu hamowania translacji białka p 21 RAS w układzie bezkomórkowym (*cell-free protein synthesizing system*) [52].

- Tiolowe analogi oligodeoksynukleotydów (*phosphorothioate oligodeoxynucleotide analogues*) są odporne na egzogenne nukleazy i aktywują rybonukleazę H [7, 40]. Z drugiej strony są źle pobierane przez nieuszkodzone komórki, tworzą mniej stabilne hybrydy niż niezmodyfikowane oligodeoksynukleotydy, są toksyczne i hamują syntezę białka w sposób niespecyficzny w stężeniach zbliżonych do tych, jakie są potrzebne dla działania specyficznego.

- Alfa-analogi oligodeoksynukleotydów (*alpha-oligodeoxynucleotide analogues*) są odporne na nukleazę i tworzą stabilne hybrydy z komplementarnym kwasem nukleinowym. Natomiast nie są zdolne do hamowania syntezy docelowego białka, co prawdopodobnie wiąże się z niezdolnością rybonukleazy H do rozpoznania hybrydy złożonej z alfaoligodeoksynukleotydu i mRNA [36].

Dalszego postępu wg Tidda [42] można oczekiwać od połączenia pożądaných właściwości dwu typów oligodeoksynukleotydów i stworzenia cząsteczek hybrydowych np. przez połączenie analogów metylofosfonowych i niezmodyfikowanych oligodeoksynukleotydów. Takie cząsteczki hybrydowe są bardziej odporne na działanie egzogennych nukleaz niż odpowiadające im niezmodyfikowane oligodeoksynukleotydy, a także mogą być równie łatwo pobierane przez komórki jak analogi metylofosfonowe. Z drugiej strony podobnie jak niezmodyfikowane oligodeoksynukleotydy są dobrze rozpuszczalne i mają zdolność aktywacji rybonukleazy H i rozszczepiania mRNA, z którym tworzą stabilną hybrydę [14, 35, 43]. Zdaniem Tidda [42] zakładając, że rybonukleaza H uczestniczy w mechanizmach działania sensowych w nieuszkodzonych komórkach, to być może oligodeoksynukleotydy mieszańcowe działając wyłącznie na zmutowany mRNA, a nie naruszając niezmutowanego mRNA (dzikiego allelu) sprzyjają jego hamującym wpływom.

Sprawność oligodeoksynukleotydów antysensowych w hamowaniu ekspresji genu może zostać zwiększona przez sprzężenie z nimi reaktywnych cząsteczek zdolnych do zniszczenia kwasu nukleinowego, z którym hybrydują. W takich strukturach cząsteczka oligodeoksynukleotydu jest aktywna tylko jako sekwencja rozpoznająca docelowy element, podczas gdy grupa reaktywna będzie odpowiedzialna za mechanizm efektorowy.

Oligodeoksynukleotydy zawierające grupy chelatujące połączone z jodem Fe^{++} pośredniczą *in vitro* w specyficznym rozszczepieniu pojedynczej lub podwójnej nici DNA w obecności czynników redukujących i tlenu oraz po hybrydyzacji i utworzeniu podwójnej lub potrójnej spirali [4, 8, 12, 29]. Rozszczepienie docelowego kwasu nukleinowego jest następstwem powstania rodników hydroksylowych w sąsiedztwie komplementarnego miejsca. Inną możliwością dla uruchomienia dodatkowych mechanizmów hamowania ekspresji genu przez sekwencje antysensowe stwarza sprzężenie ich z cząsteczkami światłoczułymi, które po napromienianiu światłem o odpowiedniej długości fali mogą indukować kowalencyjne, nieodwracalne wiązania krzyżowe (*cross-linking*) z docelowym mRNA w komórkach [22, 23, 28, 33, 34]. W ten sposób źle hybrydujące analogi, takie jak analogi metylofosfonowe, mogą stać się bardziej skuteczne [28]. Oligodeoksynukleotydy antysensowe mogą zostać także sprzężone z aktywnymi grupami alkilującymi lub związkami platyny, które są zdolne do tworzenia komplementarnych wiązań krzyżowych [5, 10, 17, 21, 46, 47, 48, 49]. W tych przypadkach konieczne jest ustalenie równowagi między aktywnością skierowaną przeciw cząsteczkom docelowym a niespecyficzną aktywnością wobec innych biocząsteczek, co może ograniczać stabilność aktywnych grup w ich biologicznym środowisku. Wreszcie oligodeoksynukleotydy mogą zostać związane z enzymami

[9, 31]. Na przykład rozszczepienie specyficznego miejsca w RNA można osiągnąć *in vitro* przez sprzężenie oligodeoksynukleotydu antysensowego z rybonukleazą S [53].

Na końcu zostaną omówione wyniki uzyskane po ekspozycji komórek nowotworowych na oligodeoksynukleotydy antysensowe w warunkach *in vitro*. Badania nad działaniem tych sekwencji zarówno na prawidłowe, jak i nowotworowe komórki limfo- i hemopoetyczne były prowadzone m.in. przez grupę Calabretty [2, 15]. Autorzy ci badali wpływ specyficznych oligodeoksynukleotydów antysensowych na protoonkogeny *myb*, *myc* i *abl*, które mają znaczenie zarówno w prawidłowej limfo- i hemopoezie, jak i w transformacji nowotworowej tych komórek. Należy tu dodać, że:

- *c-myb* jest homologiczny z onkogenem *v-myb* dwu retrovirusów wywołujących mieloblastozę i erytroblastozę u ptaków i koduje białko związane z jądrem komórkowym;
- *c-myc* jest homologiczny z *v-myc* czterech retrovirusów mielocytomatozy ptaków i podobnie jak *c-myb* koduje białko związane z jądrem komórkowym;
- *c-abl* wykazuje homologię z *v-abl* retrowirusa białaczki Abelsona myszy i koduje fosfokinazę tyrozynową, białko o sekwencji odpowiadającej sekwencji cytoplazmatycznej części receptorów dla czynników wzrostu.

Proto-onkogen *c-myb* odgrywa ważną rolę w proliferacji prawidłowych limfocytów T, ponieważ synteza białka kodowanego przez *c-myb* jest konieczna dla przejścia z fazy G₁ w fazę S cyklu komórkowego i proliferacji tych komórek po stymulacji fitohemaglutyniną lub antygenem [15].

Wykazano [45], że także komórki T ostrych białaczek limfoblastycznych dzieci i młodocianych wymagają działania *c-myb* do syntezy DNA i proliferacji. Ekspozycja białaczkowych komórek T na oligodeoksynukleotyd antysensowy *c-myb* powoduje w większości, chociaż nie we wszystkich przypadkach białaczki T komórkowej, zahamowanie syntezy DNA. W przypadkach, w których zahamowanie ekspresji *c-myb* przez oligodeoksynukleotyd antysensowy nie hamuje syntezy DNA, prawdopodobnie w komórkach białaczkowych zachodzą jakieś dodatkowe zmiany genetyczne, które zastępują czynność *c-myb*.

Anfossi i wsp. [2] badali rolę *c-myb* w regulacji wzrostu i różnicowania linii komórkowych wyprowadzonych z ostrych białaczek szpikowych. Były to linie: HL-60, ML-3, KG-1 i KG-1a. Komórki tych linii eksponowano na oligodeoksynukleotyd antysensowy *c-myb*. We wszystkich badanych liniach proliferacja komórek T uległa znamiennej obniżeniu, przy czym najwyższy stopień zahamowania (ok. 75%) obserwowano w linii HL-60. Linia HL-60 jest ustaloną linią komórkową wyprowadzoną od chorego z ostrą białaczką promielocytową i jest uważana za linię promielocytów, w której można wywołać różnicowanie w granulocyty i makrofagi np. za pomocą czynników wzrostu pobudzających wytwarzanie kolonii (CSF-s). W linii tej występuje wybitna amplifikacja onkogenów *myc* i *myb*, przy czym transkrypcja *myc* ulega zahamowaniu, gdy komórki zostają pobudzone do różnicowania. Autorzy badali także wpływ oligodeoksynukleotydu antysensowego *c-myc* na wzrost linii HL-60. Jednakże hamujące działanie tego oligonukleotydu na proliferację komórkową było wyraźnie słabsze niż sekwencji antysensowych *c-myb*. Przy czym antysensowy *c-myc* indukował dojrzewanie komórek HL-60 i w ten sposób hamował ich proliferację. Tego działania nie wykazywały antysensowe sekwencje *c-myb*. A zatem jądrowe białko kodowane przez *c-myb* jest konieczne dla wzrostu niektórych linii komórek białaczkowych, natomiast białko C-myc nie wystarczy dla utrzymania białaczkowego wzrostu komórek przy braku białka C-myb. Wyniki te potwierdzają także hipotezę, że interakcja między

poszczególnymi genami jest konieczna dla powstania i dalszego utrzymania złośliwego fenotypu.

U ponad 90% chorych z przewlekłą białaczką szpikową w komórkach hemopoetycznych występują nieprawidłowości strukturalne protoonkogenu *c-abl*. Nieprawidłowości te są następstwem translokacji *c-abl* z długich ramion chromosomu 9 w rejon *bcr* (od *break-point cluster region*) znajdujący się w długich ramionach chromosomu 22 – t/9; 22//q34.1; q11.21/. W wyniku tej translokacji powstaje hybrydowy gen *bcr-abl*, który koduje nowy polipeptyd [19, 20] wykazujący podobnie jak produkt *v-abl* retrowirusa białaczki Abelsona myszy silną aktywność fosfokinazy tyrozynowej i prawdopodobnie indukuje transformację nowotworową. Niedawne badania na myszach potwierdziły także istotną rolę hybrydowego genu *bcr-abl* w rozwoju przewlekłej białaczki szpikowej [18]. W badaniach tych wprowadzano konstrukt *bcr-abl* w macierzyste komórki hemopoetyczne myszy, którymi rekonstruowano układ krwiotwórczy letalnie napromienionych zwierząt. U rekonstruowanych osobników rozwijał się zespół mieloproliferacyjny przypominający przewlekłą białaczkę szpikową z wielką masą komórek szpikowych pochodzenia klonalnego i z aktywnym genem *abl*.

Autorzy z grupy Calabretta [45] eksponowali komórki pochodzące od chorych z przewlekłą białaczką szpikową w okresie transformacji blastycznej na sekwencje oligodeoksynukleotydy antysensowe wobec hybrydowego genu *bcl-abl* (sekwencje izolowano z linii komórkowych K 28 i J 6). Ten oligodeoksynukleotyd zniemnił hamował proliferację komórek białaczkowych.

Należy jeszcze wspomnieć o badaniach nad działaniem antysensowych sekwencji oligodeoksynukleotydy wobec *bcl-2* [37]. Gen *bcl-2* (skrót od *B-cell lymphoma-leukemia 2*) sam bezpośrednio nie indukuje transformacji nowotworowej i stanowi przykład jednego z pierwszych onkogenów nie mających odpowiednika wśród onkogenów retrowirusów (jak *v-myb*, *v-myc*, czy *v-abl*). Został on zidentyfikowany dzięki translokacji t/14; 18//q32; q21/, która występuje w chłoniaku grudkowym, a także sporadycznie w chłoniakach B komórkowych o rozlanym typie proliferacji. Jak się wydaje, produkt genu *bcl-2* bezpośrednio lub pośrednio hamuje śmierć komórki zaprogramowaną przez mechanizm apoptozy, zwłaszcza w centrach rozrodczych komórek B w grudkach chłonnych [51]. Wydaje się więc, że w procesie onkogenezy *bcl-2* odgrywa rolę czynnika ułatwiającego przetrwanie klonu komórkowego aż do wystąpienia aktywacji innych onkogenów, jak np *myc* i transformacji nowotworowej. Antysensowe sekwencje oligodeoksynukleotydy wiążące mRNA *bcl-2* w hodowli komórek ludzkiej linii białaczkowej 697 obniżały poziom białka Bcl-2 i hamowały proliferację komórek [37].

Powyżej przedstawione wyniki badań nad wpływem antysensowych sekwencji oligodeoksynukleotydy na komórki nowotworowe przynajmniej w warunkach *in vitro* są dostatecznie zachęcające, aby je kontynuować i być może w inżynierii genetycznej leży przyszłość specyficznej terapii nowotworów u ludzi. Konieczne oczywiście jest uwzględnienie warunku, że właściwe geny zostaną wyizolowane i dokładnie poznane, a niekontrolowana rekombinacja wprowadzonych oligonukleotydy nie będzie dodatkowym zagrożeniem dla komórki.

PIŚMIENICTWO

- [1] ANDERSON SK, STANKOVA J, RODER JC. Decreased p 21 levels in anti-sens *ras* transfectants augments NK sensitivity. *Mol Immunol* 1989; **26**: 985–991.
- [2] ANFOSSI G, GEWIRTZ AM, CALABRETTA B. An oligomer complementary to *c-myb* encoded mRNA inhibits proliferation of human myeloid leukemia cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 3379–3383.
- [3] BLAKE KR, MURAKAMI A, SPITZ SA, GLAVE SA, REDDY MP, TS'O POP, MILLER PS. Hybridization arrest of globin synthesis in rabbit reticulocyte lysates and cells by oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochem* 1985; **24**: 6139–6145.
- [4] BOIDOT-FORGET M, CHASSIGNOL M, TAKASUGI M, THUONG NT, HÉLÈNE C. Site-specific cleavage of single-stranded and double-stranded DNA sequences by oligodeoxyribonucleotides covalently linked to an intercalating agent and an EDTA-Fe chelate. *Gene* 1988; **72**: 361–371.
- [5] BOUTORIN AS, GUSKOVA LV, IVANOVA EM, KOBETZ ND, ZARYTOVA VF, RYTE AS, YURCHENKO LV, VLASSOV VV. Synthesis of alkylating oligonucleotide derivatives containing cholesterol or phenazinium residues at their 3'-terminus and their interaction with DNA within mammalian cells. *FEBS Lett* 1989 **254**: 129–132.
- [6] BROWN D, YU Z, MILLER P, BLAKE K, WEI C, KUNG H-F, BLACK RJ, TS'O POP, CHANG EH. Modulation of *ras* expression by antisense, nonionic deoxynucleotide analogs. *Oncogene Res* 1989; **4**: 243–252.
- [7] CAZENAIVE C, STEIN CA, LOREAU N, THUONG NT, NECKERS LM, SUBASINGHE C, HELENE C, COHEN JS, TOULMÉ J-J. Comparative inhibition of rabbit globin mRNA translation by modified antisense oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acid Res* 1989; **17**: 4255–4273.
- [8] CHU BCF, ORGELLE. Nonenzymatic sequence-specific cleavage of single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 963–967.
- [9] CHU BCF, ORGELLE. Ligation of oligonucleotides to nucleic acid or proteins via disulfide bonds. *Nucleic Acid Res* 1988; **16**: 3671–3691.
- [10] CHU BCF, ORGELLE. Inhibition of DNA synthesis by cross-linking the template to platinum-thiol derivatives of complementary oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acid Res* 1989; **17**: 4783–4798.
- [11] DOIDA Y, OKADA S. Synchronization of L5178Y cells by successive treatment with excess thymidine and colcemid. *Exp Cell Res* 1967; **48**: 540–548.
- [12] DREYER GB, DERVAN PB. Sequence-specific cleavage of single stranded DNA: Oligodeoxynucleotide-EDTA-Fe (II). *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 968–972.
- [13] FERAMISCO JR, CLARK R, WONG G, ARNHEIM N, MILLEY R, McCORMICK F. Transient reversion of *ras* oncogene-induced cell transformation by antibodies specific for amino acid 12 of *ras* protein. *Nature* 1985; **314**: 639–642.
- [14] FURDON PJ, DOMINSKI Z, KOLE R. RNase H cleavage of RNA hybridized to oligonucleotides containing methylphosphonate, phosphorothioate and phosphodiester bonds. *Nucleic Acid Res* 1989; **17**: 9193–9204.
- [15] GEWIRTZ AM, ANFOSSI G, VENTURELLI D, VALPREDA S, SIMS R, CALABRETTA B. G₁/S transition in normal human T-lymphocytes requires the nuclear protein encoded by *c-myb*. *Science* 1989; **245**: 180–183.
- [16] HOLT JT, GOPAL TV, MOULTON AD, NIENHUIS AW. Inducible production of *c-fos* antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 4794–4798.
- [17] KARPOVA GG, KNORRE DG, RYTE AS, STEPANOVICH LE. Selective alkylation of poly(A) tracts of RNA inside the cell with the derivative of ethyl ester of oligothymidylate bearing 2-chloroethylamino group. *FEBS Lett* 1980; **122**: 21–24.
- [18] KELLIHER MA, McLAUGHLIN J, WITTE ON, ROSENBERG N. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with *v-abl* and *bcr/abl*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 6649–6653.
- [19] KONOPKA JB, WATANABE SM, SINGER JW, COLLINS SJ, WITTE ON. Cell lines and clinical isolates derived from Ph⁺ positive chronic myelogenous leukemia patients express *c-abl* proteins with a common structural alteration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; **82**: 1810–1815.
- [20] KONOPKA JB, WATANABE SM, WITTE O. An alteration of the human *c-abl* protein in K 562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 1984; **37**: 1035–1042.

- [21] KUTYAVIN IV, PODYMINOGEN MA, BAZHINA YN, FEDOROVA OS, KNORRE DG, LEVINA AS, MAMAYEV SV, ZARYTOVA VF. N-/-2-hydroxyethyl/ phenazinium derivatives of oligonucleotides as effectors of the sequence-specific modification of nucleic acids with reactive oligonucleotide derivatives. *FEBS Lett* 1988; **238**: 35–38.
- [22] LEE BL, BLAKE KR, MILLER PS. Interaction of psoralenderivatized oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates with synthetic DNA containing a promoter for T7 RNA polymerase. *Nucleic Acid Res* 1988; **16**: 10681–10697.
- [23] LEE BL, MURAKAMI A, BLAKE KR, LIN S-B, MILLER PS. Interaction of psolaren-derivatized oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates with single-stranded DNA. *Biochem* 1988; **27** 3197–3203.
- [24] MEHER LJ III, DOLNICK BJ. Comparative hybrid arrest by tandem oligodeoxyribonucleotides or oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates in a cell-free system. *Nucleic Acid Res* 1988; **16**: 3341–3358.
- [25] MARCUS-SEKURA CJ, WOERNER AM, SHINOZUKA K, ZON G, QUINNAN GV jr. Comparative inhibition of chloramphenicol acetyltransferase gene expression by antisense oligonucleotide analogues having alkyl phosphotriester, methylphosphonate and phosphorothioate linkages. *Nucleic Acid Res* 1987; **15**: 5749–5763.
- [26] MELTON DA. (red.) Antisense RNA and DNA. Current communications in molecular biology. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1988.
- [27] MILLER PS, AGRIS CH, AURELIAN L, BLAKE KR, MURAKAMI A, REDDY MP, SPITZ SA, TS'O POP. Control of ribonucleic acid function by oligonucleoside methylphosphonates. *Biochimie* 1985; **67**: 769–776.
- [28] MILLER PS, TS'O POP. A new approach to chemotherapy based on molecular biology and nucleic acid chemistry: Matagen (masking tape for gene expression). *Anti-Cancer Drug Design* 1987; **2**: 117–128.
- [29] MOSER HE, DERVAN PB. Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science* 1987; **238**: 645–650.
- [30] MULDER MP, KEIJZER W, VERKERK A, BOOT AJM, PRINS MEF, SPLINTER TAW, BOS JL. Activated *ras* genes in human seminoma: Evidence for tumour heterogeneity. *Oncogene* 1989; **4**: 1345–1351.
- [31] MURAKAMI A, TADA J, YAMAGATA K, TAKANO J. Highly sensitive detection of DNA using enzyme-linked DNA-probe 1. Colorimetric and fluorometric detection. *Nucleic Acid Res* 1989; **17**: 5587–5595.
- [32] NISHIKURA K, MURRAY JM. Antisense RNA of proto-oncogene *c-fos* block renewed growth of quiescent 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 639–649.
- [33] PIELES U, ENGLISCH U. Psolaren covalently linked to oligodeoxyribonucleotides: Synthesis, sequence specific recognition of DNA and photo-cross-linking to pyrimidine residues of DNA. *Nucleic Acid Res* 1989; **17**: 285–299.
- [34] PIELES U, SPROAT BS, NEUNER P, CRAMER F. Preparation of a novel psolaren containing deoxyadenosine building block for the facile solid phase synthesis of psolaren-modified oligonucleotides for a sequence specific cross-link to a given target sequence. *Nucleic Acid Res* 1989; **17**: 8967–8978.
- [35] QUARTIN RS, BRAKEL CL, WETMUR JG. Number and distribution of methylphosphonate linkages in oligodeoxynucleotides affect exo- and endonuclease sensitivity and ability to form RNase H substrates. *Nucleic Acid Res* 1989; **17**: 7253–7262.
- [36] RAYNER B, MALVY C, PAOLETTI J, LEBLEU B, PAOLETTI C, IMBACH J-L. Alpha-oligodeoxynucleotide analogues. [w] Oligodeoxynucleotides. Antisense inhibitors of gene expression. JS Cohen [red] Basingstoke, The Macmillian Press Ltd 1989: 119–136.
- [37] REED JC, STEIN C, SUBASINGHE C, HALDAR S, CROCE CM, YUM S, COHEN J. Antisense-mediated inhibition of *bcl-2* protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: Comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res* 1990; **50**: 6565–6570.
- [38] SARIN PS, AGRAWAL S, CIVEIRA MP, GOODCHILD J, IKEUCHI T, ZAMECNIK PC. Inhibition of acquired immunodeficiency syndrome virus by oligodeoxynucleoside methylphosphonates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 7448–7451.
- [39] SMITH CC, AURELIAN L, REDDY MP, MILLER PS, TS'O POP. Antiviral effect of an oligo (nucleoside methylphosphonate) complementary to the splice junction of herpes simplex virus type 1 immediate early pre-mRNAs 4 and 5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 2787–2791.
- [40] STEIN CA, SUBASINGHE C, SHINOZUKA K, COHEN JS. Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acid Res* 1988; **16**: 3209–3221.
- [42] TIDD DM. A potential role for antisense oligonucleotide analogues in the development of oncogene targeted cancer chemotherapy. *Anticancer Res* 1990; **10**: 1169–1182.

- [43] TIDD DM, WARENIUS HM. Partial protection of oncogene, antisense oligodeoxynucleotides against serum nuclease degradation using terminal methylphosphonate groups. *Br J Cancer* 1989; **60**: 343–350.
- [44] TOKEOZD, FARR CJ, MARSHALL CJ. ras gene activation in a minor proportion of the blast population in acute myeloid leukaemia. *Oncogene* 1987; **1**: 409–413.
- [45] VENTURELLI D, MARIANO MT, SZCZYLIK C, VALTIERI M, LANGE B, CRIST W, LINK M, CALABRETTA B. Down-regulated c-myc expression inhibits DNA synthesis of T-leukemia cells in most patients. *Cancer Res* 1990; **50**: 7371–7375.
- [46] VLASSOV VV, GAIDAMAKOV SA, ZARYTOVA VF, KNORRE DG, LEVINA AS, NIKONOVA AA, PODUST LM, FEDOROVA OS. Sequence-specific chemical modification of double-stranded DNA with alkylating oligodeoxyribonucleotide derivatives. *Gene* 1988; **72**: 313–322.
- [47] VLASSOV VV, GODOVIKOV AA, KOBETZ ND, RYTE AS, YURCHENKO LV, BUKRINSKAYA AG. Nucleotide and oligonucleotide derivatives as enzyme and nucleic acid targeted irreversible inhibitors. Biochemical aspects. *Adv Enz Reg* 1986; **24**: 301–322.
- [48] VLASSOV VV, ZARYTOVA VF, KUTIAVIN IV, MAMAEV SV, PODYMINOGIN MA. Complementary addressed modification and cleavage of a single stranded DNA fragment with alkylating oligonucleotide derivatives. *Nucleic Acid Res* 1986; **14**: 4065–4076.
- [49] WEBB TR, MATTEUCCI MD. Hybridization triggered cross-linking of deoxynucleotides. *Nucleic Acid Res* 1986; **14**: 7661–7674.
- [50] WEINTRAUB H, IZANT JG, HARLAND RM. Anti-sense RNA as a molecular tool for genetic analysis. *Trends Genet* 1985; **1**: 22–25.
- [51] WILLIAMS GT, SMITH CHA, SPOONER E, DEXTER TM, TAYLOR DR. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 1990; **343**: 76–79.
- [52] YU Z, CHEN D, BLACK RJ, BLAKE K, TS'O POP, MILLER P, CHANG EH. Sequence specific inhibition of in vitro translation of mutated or normal ras p21. *J Exp Pathol* 1989; **4**: 97–108.
- [53] ZUCKERMAN RN, SCHULTZ PG. A hybrid sequence-selective ribonuclease S. *J Am Chem Soc* 1988; **110**: 6592–6594.

Otrzymano: 20 czerwca 1991 r.

Przyjęto: 24 czerwca 1991 r.

Adres autora: ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin

WRAŻENIA Z XII MIĘDZYNARODOWEGO KONGRESU MIKROSKOPII ELEKTRONOWEJ W SEATTLE, USA

HIGHLIGHTS OF THE 12TH INTERNATIONAL CONGRESS FOR ELECTRON MICROSCOPY, SEATTLE, USA

Konrad RYDZYŃSKI

Zakład Patomorfologii Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi

Streszczenie. W dniach 11–17 sierpnia 1990 r. odbył się w Seattle, w stanie Washington w USA dwunasty Międzynarodowy Kongres Mikroskopii Elektronowej (XII ICEM). Wzięło w nim udział ponad 4000 uczestników z 44 krajów. Zaprezentowano ok. 1670 doniesień; 560 jako doniesienia ustne, ponad 1100 jako postery. Kongres w Seattle zgromadził ponad 100 wystawców, którzy wystawili sprzęt o wartości ponad 30 000 000 USD. XII ICEM w Seattle był udaną imprezą, zarówno pod względem organizacyjnym jak i naukowym. Nie dało się zauważyć jakiegoś wyraźnego przewrotu w wykorzystaniu mikroskopii elektronowej w naukach biologicznych i medycznych. Dokonał się natomiast znaczący postęp w konstrukcji mikroskopów, a przede wszystkim całkowite skomputeryzowanie przez Philipsa i JEOL'a obsługi mikroskopów transmisyjnych i skanningowych. Dało to w efekcie uproszczenie pracy z jednocześnie zwiększeniem możliwości gromadzenia i dalszego przetwarzania obrazów mikroskopii elektronowej.

Summary. The 12th International Congress for Electron Microscopy (XII ICEM) which took place in Seattle, Wa, USA, between 11th and 17th August, drew more than 4000 participants from 44 countries. Altogether more than 1670 invited and contributed papers were presented; some 560 presented live and more than 1100 as posters. At Seattle there were over 100 trade exhibitors; the total value of equipment in show was estimated to be 30,000,000 USD. XII ICEM was an enormous and complex event, well organized, with huge scientific content. An overall impression is that the most interesting changes were shown at the Exhibition. Computer controls of microscopes appears to be brought to the ultimate in simplicity, giving new facilities in built-in-frame stores and image processing.

Dwunasty Międzynarodowy Kongres Mikroskopii Elektronowej (XII ICEM) odbył się w Seattle, stan Washington w USA w dniach 11–17 sierpnia 1990 roku. Zgromadził on w bardzo nowoczesnym i pięknym The Washington State Convention and Trade Centre ponad 4000 uczestników i był największym z dotychczas zorganizowanych (tab. 1). Około 3000 osób to naukowcy z 44 krajów; ponad 1500 osób to przedstawiciele 115 firm wystawiających swój sprzęt, wyposażenie, odczynniki i wydawnictwa. Organizatorzy Kongresu i Międzynarodowa Federacja Towarzystw Mikroskopii Elektronowej (IFSEM) przyznała

TABELA 1. Kongresy Międzynarodowe i Światowe Mikroskopii Elektronowej (do roku 1955, kiedy formalnie zawiązano *International Federation of Societies for Electron Microscopy* (IFSEM) odbywały się międzynarodowe sympozja mikroskopii elektronowej)

Rok	Miejsce Kongresu	Prezydent IFSEM	Sekretarz Generalny IFSEM
1949	Delft, Holandia		
1950	Paryż, Francja		
1954	Londyn, Anglia		
1955	Powstanie IFSEM		Prof. B. von Borries
1958	Berlin, RFN	Prof. E. Ruska	Prof. V. E. Cosslett
1962	Filadelfia, USA	Prof. T. F. Anderson	Prof. V. E. Cosslett
1966	Kyoto, Japonia	Prof. N. Higashi	Prof. J. B. LePoole
1970	Grenoble, Francja	Prof. G. Dupoy	Prof. J. B. LePoole
1974	Canberra, Australia	Prof. V. E. Cosslett	Prof. W. Barnard
1978	Toronto, Kanada	Prof. D. W. Fawcett	Prof. G. Thomas
1982	Hamburg, RFN	Prof. J. B. LePoole	Prof. G. Thomas
1986	Kyoto, Japonia	Prof. H. Hashimoto	Prof. G. Thomas
1990	Seattle, USA	Prof. G. Thomas	Prof. A. Maunsbach

około 300 stypendiów mających pomóc badaczom z mniej bogatych krajów świata w uczestnictwie w XX ICEM*.

Z Polski przyjechały 4 osoby: dr Jan Hejna z Wrocławia i dr Elżbieta Tracz z Lublina – oboje reprezentujący nauki techniczne oraz prof. Hieronim Bartel z WAM w Łodzi i piszący te słowa. Polaków na Kongresie było znacznie więcej; spotkałem osobiście pięciu, byli to ludzie zatrudnieni w laboratoriach zagranicznych, głównie w USA. Liczba osób pochodzenia polskiego była trudna do ustalenia, ale jak można było się zorientować z listy uczestników i rozmów kularowych dość znacząca.

Naukową stronę Kongresu należy ocenić wysoko zarówno pod względem ilości i przekroju tematyki prezentowanych prac, jak i ich poziomu warsztatowego, chociaż zdarzały się prace o żenująco niskim poziomie pochodzące nie zawsze z krajów "Trzeciego Świata". Do prezentacji zakwalifikowano ponad 1670 doniesień. Ponad 560 z nich zaprezentowano jako doniesienia ustne, reszta, czyli ponad 1100, jako postery. Tak duża liczba zgłoszonych prac zmusiła organizatorów do dużego rozdrobnienia tematów, co w efekcie dało olbrzymi natłok sesji, obrad monotematycznych, paneli dyskusyjnych itp. Obliczono, że łączny czas wszystkich prezentacji przekroczył 200 godzin (w czasie 4 1/2 dnia). Jednocześnie odbywało się zazwyczaj 7 sesji. Nawet wzięwszy pod uwagę, że obrady sekcji nauk technicznych i nauk biologicznych były rozdzielone i tak pozostawały do wyboru co najmniej 3 lub 4 sesje, w których chciałoby się uczestniczyć w tym samym czasie.

Ciekawym pomysłem było zorganizowanie sesji roboczych (*tutorials*) prowadzonych przez wybitnych specjalistów w danej dziedzinie. Zorganizowano ich sześć:

- *Scanning Tunneling Microscopy; Atomic and Molecular Imaging of Surfaces* prowadzona przez Shirley Chiang,
- *Cryo-electron Microscopy of Hydrated Specimens* prowadzona przez Jaquesa Dubochet,
- *Image simulation: Concepts (Software) Hardware* prowadzona przez Roar Kilaas,

* Autor pragnie wyrazić swoją wdzięczność Komitetowi Organizacyjnemu XII ICEM oraz Komisji IFSEM, a także firmie Balzers Union AG i Instytutowi Medycyny Pracy w Łodzi za udzielenie wsparcia finansowego, które umożliwiło udział w XII ICEM.

- *Quantitative Image Analysis* prowadzona przez Johna C. Russa,
- *Convergent Beam Electron Diffraction* prowadzona przez Davida J. Eagleshama,
- *EELS vs EDS – Electron Energy Loss Spectroscopy vs Energy Dispersive Spectroscopy* prowadzona w formie dyskusji między Chuckiem Fiori i Davem Williamsem.

Byłem w stanie uczestniczyć tylko w dwóch takich sesjach; obie cieszyły się wielkim powodzeniem. Szczególnie ciekawa była debata "EELS czy EDS", gdzie co prawda nie powiedziano wiele nowego, ale udział w niej pozwolił na uporządkowanie wiedzy na temat mikroanalizy w biologii. A poza tym zazdrościć można sposobu i perfekcji przedstawienia tematu – emocje sięgały zenitu!

Wydaje się, że ta forma roboczych spotkań i dyskusji ludzi zajmujących się pewną wybraną dziedziną w mikroskopii elektronowej warta jest kontynuacji i zaszczeplenia nie tylko na wielkich międzynarodowych kongresach.

Podsumowując zawartość merytoryczną Kongresu należy powiedzieć, że ilość informacji do przetrwania znacznie przewyższała możliwość percepcji pojedynczego uczestnika. Obrady rozpoczęły się o 8³⁰, a kończyły zazwyczaj o 17⁰⁰ z krótką przerwą na obiad, w czasie której zresztą różne renomowane firmy proponowały udział w wykładach poświęconych prezentacji najnowszego sprzętu (propozycja nie do odrzucenia, jako że wysokiemu poziomowi wygłaszanych w sali recepcyjnej luksusowego hotelu referatów towarzyszyła dyskretna praca kelnerów).

Myszę, że organizatorzy przyszłych kongresów muszą się zastanowić nad nieco zmienioną ich formułą, pozwalającą na większą ilość kontaktów roboczych, kosztem nawet prestiżowych wykładów plenarnych.

Bogactwo zagadnień, jakie rozwiązywane są przy pomocy mikroskopii elektronowej, powoduje wielkie zróżnicowanie tematyki naukowej. Jakiegokolwiek uszeregowanie głównych zagadnień nastęrcza wielkie trudności. Tabela 2 pokazuje główne hasła, pod jakimi doniesienia zarówno ustne, jak i posterowe zostały opublikowane w materiałach kongresowych.

Materiały z Kongresu wydane zostały jako *Electron Microscopy 1990* przez San Francisco Press w czterech tomach*:

- I. *Advances in Imaging Science*
- II. *Advances in Analytical Electron Microscopy*
- III. *Advances in Microscopy in the Biological Sciences*
- IV. *Advances in Microscopy in the Material Sciences*

Każdy z delegatów w ramach opłaty rejestracyjnej otrzymał tylko jeden wybrany wcześniej tom. Dodatkowo, *The Microbeam Analysis Society of America*, które było współorganizatorem Kongresu, wydało wybrane przez Komitet Naukowy Towarzystwa prace w pełnej wersji w czasopiśmie *Microbeam Analysis 1990*.

Kongres w Seattle pokazał, że mikroskopia elektronowa jest w dalszym ciągu szalenie dynamicznie rozwijającą się gałęzią nauki. Skupiona wokół jednego narzędzia badawczego rozbudowuje się w wielu kierunkach; z jednej strony w coraz to nowsze metody i doskonalsze techniki przygotowania materiałów do badań, z drugiej dając nieprawdopodobnie wręcz możliwości aparaturowe przez wprowadzenie technik komputerowych. Może dla-

*Osoby zainteresowane zakupem Materiałów Kongresowych mogą pisać na adres: San Francisco Press, Inc. P. O. Box 6800, San Francisco CA 94101-608, USA. Cena jednego tomu ok. 50 USD.

TABELA 2. Spis głównych tematów naukowych XII ICEM według haseł zaproponowanych w poszczególnych tomach Materiałów Zjazdowych *Electron Microscopy 1990* (San Francisco Press).

I. Advances in Imaging Science

High resolution TEM
 Surface Imaging
 Evolutionary Developments in EM
 Revolutionary Developments in EM
 Advances in EM Instrumentation
 Workshop on HVEM
 High Resolution Cryogenic Imaging
 Macromolecular Imaging
 Novel Methods of Analysis in 2D and 3D Microscopy
 Electron Microscopy Tomography
 Cry-specimen preparatory Technique
 Video & Graphic Analysis in EM
 Protein Electron Crystallography

II. Advances in Analytical Electron Microscopy

Electron Energy Loss Spectrometry
 Surface Analysis
 Advances in Analytical Instrumentation
 X-Ray Microanalysis
 Electron Crystallography
 Photon Beam Microanalysis
 Microprobe Mass Spectrometry
 Quantitative Microanalysis in Biology
 Techniques for Microanalysis in Medicine
 Analysis of Environmental Toxicants
 Radiation-Sensitive materials
 Specimen Preparation Methods

III. Advances in Microscopy In the Biological Sciences

Correlated Microscopy of Motility
 3-D Microscopy in Neurobiology
 Near-Field and Acoustic Microscopy in Biology
 Nucleic Acid – Protein Nanostructure
 Innovative LM: Confocal Microscopy and 3-D Imaging
 EM Molecular Probe Localisation in Biomedical Research
 High-Resolution SEM in Biology
 Electron Microscopy of Reproduction
 LVSEM Immunohistochemistry Workshop

IV. Advances in Microscopy In the Material Sciences

Superconducting Materials
 Structurally disordered solids
 Magnetic Thin Films
 Radiation-sensitive Materials
 Fine Structure of Defects
 Microstructure of Materials
 Catalysts, Small Particles and Surfaces
 Interfaces in Solids
 Electronic Materials
 In Situ EM – "The Microlaboratory"
 Novel Characterization Techniques in Mats Science

tego w mojej opinii przebojem Kongresu były nie jakieś rewelacyjne naukowo referaty, ale wystawa sprzętu wykorzystywanego w laboratoriach mikroskopii elektronowej.

Kongres w Seattle zgromadził ponad 100 wystawców, którzy wystawili sprzęt warty ponad 30 000 000 USD! Obejrzeć można było i zapoznać się z pracą 36 mikroskopów

elektronowych skanningowych (SEM) i 14 mikroskopów elektronowych transmisyjnych (TEM).

Czołowe firmy zaprezentowały po raz pierwszy nowe generacje mikroskopów bądź bardzo unowocześnione modele z aktualnie produkowanych serii.

◆ Philips przedstawił CM20FEG TEM; napięcie przyspieszające (HV) do 200 kV i emisja połowa źródła, CM12 Cryo; HV – 120 kV, umożliwia oglądanie materiału biologicznego w niskich temperaturach, oraz dwa spośród trzech modeli z nowej, całkowicie skomputeryzowanej wersji serii XL SEM.

◆ JEOL zaprezentował dwa TEM pracujące w HV 12 kV i 300 kV modele JEM 1210 i JEM 3010 oraz wykorzystujący emisję połową 6300F SEM.

◆ Zeiss (Opton) pokazał TEM z nowej serii EM910, w którym zastosowano zasadę Kohlera, co dało w efekcie bardzo równomierne oświetlenie próbki i zwiększyło kontrast. Zainteresowaniem cieszyły się także inne TEM z serii 902 z zestawem do mikroanalizy zarówno EDS, jak i EELS oraz nowy skomputeryzowany model DSM962 SEM.

◆ Z innych firm, mniej znanych w Polsce, dominował Hitachi z nowym modelem HF2000; HV – 200 kV, emisja połowa źródła. Swoje mikroskopy elektronowe prezentowały także m.in. ISI/ABT, CamScan, Cameca, Leica (dawniej Cambridge Instruments). TESLA była też.

◆ Mocno reprezentowane były firmy produkujące detektory i układy do mikroanalizy rentgenowskiej; EDAX, Kevex, Link, HNU Systems, Tracor, GW Electronics. Zainteresowanie wykorzystaniem mikroanalizy rentgenowskiej w biologii i medycynie jest stale duże, mimo w dalszym ciągu nie rozwiązanych problemów z odpowiednim przygotowaniem próbek nie powodującym przemieszczania jonów w trakcie preparatyki i oceny.

◆ Z ciekawszych nowinek technicznych należy wymienić mikroskopy do mikroskopii skanningowej tunelowej (STM) prezentowane przez Digital Instruments, Atomis Inc., JEOL, Omicron i VG oraz demonstrowany przez Electroscan mikroskop "analizy otoczenia" (*environmental SEM*). Oba te typy mikroskopów znajdują zastosowanie jak dotąd głównie w naukach technicznych, ale są już pierwsze próby użycia ich do badań w biologii molekularnej.

◆ Kilka firm (Zeiss, Leica, Lasertec, BioRad, Sarastro) demonstrowało mikroskopy laserowe konfokacyjne. W opinii autora najlepszym w chwili obecnej sprzętem (włączając w to oprogramowanie) dysponuje szwedzko-ameykańska firma Sarastro, niedawno kupiona przez amerykańską firmę Molecular Dynamics z Kalifornii.

◆ Nie sposób wymienić wszystkich firm oferujących odczynniki, sprzęt laboratoryjny i wyposażenie pracowni mikroskopii elektronowej; były ich dziesiątki z największymi (Edwards, Balzers, BioRad, SPI, TAAB, AgarPlano, Polysciences, Kodak, Polaroid) na czele.

Ciekawym pomysłem Organizatorów było zorganizowanie prezentacji i giełdy programów komputerowych napisanych przez samych użytkowników w celu rozwiązania przy pomocy komputera osobistego jakiegoś konkretnego zadania badawczego. Przeważały programy do wykorzystania w naukach technicznych; giełda ta cieszyła się dużym zainteresowaniem.



XII ICEM w Seattle był z całą pewnością udaną imprezą, zarówno pod względem organizacyjnym jak i naukowym. Nie dało się zauważyć wyraźnego przewrotu w wykorzystaniu mikroskopii elektronowej w naukach biologicznych i medycznych. Niemniej jednak

dokonał się znaczący postęp w konstrukcji mikroskopów. Niskonapięciowe SEM, w których zastosowano emisję polową, pozwalają na uzyskanie zdolności rozdzielczej na poziomie TEM, zachowując możliwość oglądania próbek w trzech wymiarach. Poprawiono w większości mikroskopów zarówno transmisyjnych, jak i skanningowych możliwości oceny składu pierwiastkowego preparatów biologicznych. Największym jednak postępem jest całkowite skomputeryzowanie przez Philipsa i JEOL-a obsługi mikroskopów (TEM i SEM). Dało to kolosalne uproszczenie pracy z jednoczesnym zwiększeniem możliwości gromadzenia i dalszego przetwarzania obrazów mikroskopii elektronowej. Dla użytkownika jest to rzeczywiście zupełnie nowa jakość pracy, dająca poczucie bardziej zabawy niż pracy. Czasami miałem wrażenie, że preparat w kolumnie jest zupełnie zbędnym dodatkiem!

Pozostaje jeszcze jedna bolesna refleksja, nie tylko obywatela Rzeczypospolitej, przewijająca się w rozmowach kularowych, skąd na to wszystko wziąć pieniądze?

Dla tych, którzy te pieniądze jednak znajdują, informacja: XIII Światowy Kongres Mikroskopii Elektronowej odbędzie się w trzecim tygodniu lipca 1994 roku w Palais de Congres w Paryżu. Przewodniczącym Komitetu Organizacyjnego Kongresu został Profesor Bernard Jouffre.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1. Artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych).

2. Artykuły przeglądowe ze wskazaniem kierunków przyszłych badań o objętości do 15 stron maszynopisu i bibliografii z ostatnich 3 lat (do 35 pozycji). Każda pozycja bibliograficzna powinna zawierać dodatkowo 1 zdanie streszczenia, a szczególnie ważne pozycje powinny być oznaczone gwiazdką.

3. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji).

4. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednonownie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję i wysyłającego nadbityki, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stronę powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, lecz jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na rozdziały tytułowane i numerowane (1, 2 itd.) oraz podrozdziały (1.1, 1.2 itd.). Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E, red. Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie prosimy zastępować raczej rysunkami, ale jeżeli są niezbędne, powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 nadbitek.

TREŚĆ

WÓJCIK C.: Współczesne poglądy na temat regulacji cyklu komórkowego	153
KOCKI J., ROŻYŃKOWA D.: Gen <i>bcl-2</i> , w patofizjologii limfocytów B	169
RUPNIEWSKA Z. M.: Syntetyczne oligonukleotydy w leczeniu nowotworów – Nadzieje i trudności	183
RYDZYŃSKI K.: Wrażenia z XII Międzynarodowego Kongresu Mikroskopii Elektronicznej w Seattle, USA	193

**Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Prenumerata na rok 1991

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1991 r na nowe konto:
FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;
Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 5.01132-40006576-132-1110.
Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty) dla instytucji (bibliotek) wynosi 180 000 zł, a dla odbiorców indywidualnych 80 000 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;
Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 5.01132-40006576-132-1110.
Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705