

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postępy Biologii Komórki

TOM 19-NR 4'92
(277 – 384)

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wincenty 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*

Artykuły nadesłane do Redakcji i zamieszczone w roczniku 1992 Postępów
Biologii Komórki recenzowali:

prof. dr Zofia Bielańska-Osuchowska
prof. dr Szczepan M. Biliński
prof. dr Jerzy Kawiak
dr Maciej Kawalec
prof. dr Wanda M. Krajewska
prof. dr Jan Michejda
prof. dr Urszula Radwańska
dr Tomasz Sakowicz
prof. dr Joanna Strosznajder
prof. dr Stanisław Więckowski
prof. dr Maciej Zabel

Za tę społecznie wykonaną pracę i miłą współpracę serdecznie dziękujemy.

Fundacja •Rozwój SGGW-AR•

Ark. wyd. 9,4 Ark. druk. 7,0. Oddano do składu w październiku 1992 r. Podpisano do druku w grudniu 1992 r. Druk ukończono w grudniu 1992 r.

■ *W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •*

- Komórka roślinna ma trzy przedziały zawierające odrębne genomy. Między genomami istnieją obszary homologii. Dane o tych obszarach ułatwiają w dużym stopniu zrozumienie procesów ewolucyjnych w komórce roślinnej (patrz artykuł na s. 279).
- Odkrycia ostatnich lat doprowadziły do poznania sposobu przekazywania sygnałów i mechanizmów genetycznych zapobiegających samozapyleniu u roślin wyższych. Artykuł na stronie 293 jest pierwszym syntetycznym omówieniem tych zagadnień.
- W artykule na stronie 311 zostało omówione, po raz pierwszy w polskiej literaturze przeglądowej, zagadnienie powstawania uniparentalnej disomii oraz zostały przedstawione następstwa fenotypowe tego zaburzenia chromosomowego u człowieka.
- Techniki hybrydyzacji in situ DNA/DNA, RNA/DNA, antysensowy mRNA/RNA są metodami umożliwiającymi bądź zlokalizowanie określonych sekwencji DNA w obrębie genomu, bądź badanie ekspresji genów. Techniki te znajdują obecnie coraz szersze zastosowanie w cytogenetyce klinicznej. Jest to kolejny artykuł (s. 323) na ten temat zamieszczony w Post Biol Kom (por. M. Zabel, Post Biol Kom 1991; 18: 47–53).
- Oddzielenie jądra i cytoplazmy komórki przez otoczkę jądrową prowadzi do wniosku, że muszą istnieć specyficzne mechanizmy transportowe pozwalające na przenikanie odpowiednich substancji tak z jądra, jak i do jądra komórki. O tych mechanizmach można przeczytać na stronie 335 i dalszych.
- Różne przypadki przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej pochodzą z odmiennych komórek linii B. Doniesienia na ten temat zebrano w pracy Z. M. Rupniewskiej i współautorów (str. 357).
- Sfingomielin jest obok fosfatydylocholiny jednym z głównych lipidów tkanek zwierzęcych tworzących błony komórkowe. O metabolizmie sfingomielinu i jego znaczeniu dla homeostazy organizmu można przeczytać na stronie 369.

Z KRONIKI

W dniach 16–19 września 1991 r. odbyło się w Krakowie 39 Sympozjum Europejskiego Towarzystwa Hodowli Tkanek zorganizowane pod auspicjami Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików oraz Uniwersytetu Jagiellońskiego. W Polsce Sympozjum to zostało zorganizowane poraz pierwszy po wielu latach starań.

Komitet Organizacyjny poza Dr R. Pfragner z Austrii, którą zaproszono do Komitetu grzesznościowo, utworzyli pracownicy Pracowni Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkanek przy Zakładzie Fizjologii Zwierząt UJ. W skład Komitetu weszli:

Przewodnicząca – prof. dr hab. Stanisława Stokłosa

Sekretarz – początkowo dr Maria Słomczyńska, potem do końca dr Maria Szołtys

Skarbnik – dr Barbara Bilińska

Członkowie – dr Ewa Gregoraszczyk, dr Andrzej Pierściński, mgr Jerzy Galas, mgr Dorota Bułik, dr Jolanta Sadowska, mgr Anna Walocha

Przed rozpoczęciem Sympozjum i podczas jego trwania pomagali mgr Agnieszka Czyżewska, panie doktorantki – mgr Małgorzata Kajta i Elżbieta Kusina, studenci Instytutu Biologii Molekularnej UJ – Anna Słota, Mariusz Zaręba, Agnieszka Bańbuła oraz doktorant Akademii Rolniczej – Maciej Murawski.

Powitalne spotkanie towarzyskie przy lampce wina, które odbyło się w Collegium Maius zaszczytliwi swoją obecnością Jego Magnificencja Rektor UJ – prof. dr hab. Andrzej Pelczar, wojewoda krakowski – pan Tadeusz Piekarz z małżonką, dyrektor Collegium Maius – prof. dr hab. Stanisław Waltoś, prodziekan Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ – doc. dr hab. Leszek Przywara, prezydenta Krakowa pana Krzysztofa Bachmińskiego reprezentował dr Andrzej Zduńczyk dyrektor Wydziału Zdrowia Urzędu Miasta Krakowa.

Część naukowa Sympozjum odbywała się w pomieszczeniach Akademii Wychowania Fizycznego udostępnionych Komitetowi Organizacyjnemu dzięki uprzejmości JMRektora AWF – prof. dr hab. Jana Szopy. Otwarcia Sympozjum dokonała przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego prof. Stanisława Stokłosa. Adres powitalny wygłosił prodziekan doc. dr hab. Leszek Przywara. Następnie Prezydent Europejskiego Towarzystwa Hodowli Tkanek – prof. Sandro Eridani (Anglia) nadał honorowe członkostwo towarzystwa prof. Gianni Astaldiemu (Mediolan), który następnie wygłosił wykład na temat *The in vitro culture techniques in the study of the oncogeny and functions of hemic and lymphatic cells*.

Uczestnikami Sympozjum (ok. 280 osób) byli badacze ze wszystkich krajów europejskich łącznie z krajami Europy Wschodniej, Litwą i Republiką Rosyjską, a także uczeni ze Stanów Zjednoczonych i Izraela. Polskę reprezentowało 98 naukowców. Tematyka Sympozjum obejmowała najnowocześniejsze badania prowadzone metodami hodowli tkankowych z zakresu biologii molekularnej, hematologii, onkologii, endokrynologii i transplantologii. Odbyło się 25 wykładów plenarnych wygłoszonych przez zaproszonych wybitnych specjalistów. Program obejmował 4 sympozja, 9 sesji popołudniowych i 12 sesji plakatowych. Wiceprzewodniczącymi sympozjów i większości sesji warsztatowych (workshops) byli polscy uczeni:

prof. W. Jędrzejczak – *Cellular and molecular aspects of hemopoiesis*

prof. A. Łukaszyk – *Endocrine cell function*

prof. W. Korohoda – *Malignant transformation and tumor suppression*

doc. L. Kaczmarek – *Oncogens and growth regulation and cell transformation*

prof. A. Krygier-Stojatowska – *Cell interaction and paracrine control*

prof. J. Koziorowska – *In vitro pharmacotoxicology*

prof. J. Kawiak – *Cell adhesion molecules and extracellular matrix receptors*

Jedna sesja posterowa była poświęcona hodowli komórek roślinnych. Moderatorem był doc. J. Grzybek.

W czasie tego Sympozjum wręczono po raz pierwszy Nagrodę Naukową za Osiągnięcia w Badaniach Biologii Komórki ufundowaną przez firmę Becton Dickinson, Falcon Labware. Konkurs wygrał dr Christos Paraskeva (Anglia) za cykl prac naukowych z zakresu transformacji nowotworowej komórek.

Sympozjum okazało się sukcesem naukowym oraz organizacyjnym, co podkreślali uczestnicy w listach przesyłanych na ręce Przewodniczącej Komitetu Organizacyjnego.

HOMOLOGIE POMIĘDZY GENOMEM JĄDROWYM I GENOMAMI ORGANELLOWYMI ROŚLIN

HOMOLOGIES BETWEEN THE NUCLEAR GENOME AND THE ORGANELLAR GENOMES OF PLANTS

Małgorzata JAKUBOWICZ, Jacek AUGUSTYNIAK

Zakład Biochemii Biopolimerów Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, Poznań

Streszczenie. Artykuł omawia występowanie w genomie jądrowym i genomach organellowych roślin wielu homologicznych fragmentów DNA. Dane te w dużym stopniu mogą ułatwić zrozumienie procesów ewolucyjnych, które zaszły w komórce roślinnej.

Abstract. This article presents data on the homologies between the DNA sequences of the nuclear and the organellar genomes of plants. The data can help in understanding the evolutionary processes in plant cells.

WSTĘP

Komórka roślinna ma trzy przedziały zawierające odrębne genomy. Obecnie wiadomo, że pomiędzy tymi genomami istnieją obszary homologii. Niektóre z nich zostaną dokładniej przedstawione w tej pracy.

Homologie pomiędzy mitochondrialnym genomem roślinnym a genomem chloroplastowym są stosunkowo dobrze zbadane dla kukurydzy [7, 24, 27], wiesiołka [24], ryżu [18], szpinaku [26], ziemniaka [5] oraz dla kilku roślin z rodziny dyniowatych [26]. Homologie między genomem plastydowym i genomem jądrowym stwierdzono dla szpinaku [25], ryżu [22], pomidora [20, 21], ziemniaka [5]. Homologie między genomem mitochondrialnym i jądrowym znane są dla grzybów *Saccharomyces cerevisiae* [6], *Neurospora crassa* [9], *Podospora anserina* [8], natomiast spośród roślin wyższych stwierdzono je dla wiesiołka [23], kukurydzy (plazmidy mitochondrialne) [12], tytoniu [2] oraz dla niektórych roślin z rodziny motylkowatych [19].

HOMOLOGIE POMIĘDZY MITOCHONDRIALNYM GENOMEM ROŚLINNYM A GENOMEM CHLOROPLASTOWYM

Rośliny wyższe mają mitochondrialne genomy bardzo różnej wielkości, chociaż ilość genów mitochondrialnych jest na ogół taka sama jak u innych organizmów. W mtDNA roślin znajdują się fragmenty homologiczne do DNA chloroplastowego. Przykłady rozmiarów homologii podano w tabeli 1.

TABELA 1. Przykłady rozmiarów homologii pomiędzy genomami organellowymi roślin wyższych; podano wielkość genomu mitochondrialnego oraz rozmiar homologii z genomem chloroplastowym

Gatunek	Wielkość genomu [kpz ^a]	Rozmiar homologii [kpz ^a]
Rzepa	218	5
Kalafior	219	13
Łoboda gwiazdkowata	270	13
Szkarłatka	320	14
Szpinak	327	10
Groch	380	13
Pszenica	430	6
Kukurydza	570	13
Cukinia	840	11
Ogórek	1500	11
Melon	2400	11

^akpz – tysiąc par zasad

Jednym z pierwszych i lepiej poznanych przykładów tego zjawiska jest odcinek DNA o długości 12 kpz w mitochondrialnym genomie kukurydzy przejawiający w 90% homologię do fragmentu chloroplastowego DNA z rejonu dwukrotnie powtórnego w odwrotnej orientacji, tzw. IR [27]. W rejonie tym zawarte są: gen chloroplastowego 16S rRNA, gen dla tRNA-ile oraz tRNA-val. Wydaje się, że także w genomie mitochondrialnym pszenicy istnieje podobny fragment DNA [24]. W mitochondrialnym DNA kukurydzy zidentyfikowano również inny fragment, który pochodzi z chloroplastów i obejmuje gen dla dużej podjednostki karboksylazy rybulozo-1,5-dwufosforanowej, gen tRNA-his, część genu 23S rRNA. Następnym przykładem pochodzącym również z badań nad genomami organellowymi kukurydzy jest fragment zawierający 3'-końcówką część genu 23S rRNA, całkowite geny 4,5S i 5S rRNA, odcinek międzygenowy i 6 nukleotydów genu tRNA-arg [7]. Analizowano sekwencję nukleotydową tego fragmentu i okazało się, że fragment plastydowego DNA jest w mitochondriach niezmienny, zachowane są jego odcinki międzygenowe, a punktowych mutacji jest zaledwie kilka. Można z tego wnioskować, że przeniesienie go do mitochondriów nastąpiło niezbyt dawno.

W genomie mitochondrialnym wiesiołka znaleziono fragmenty DNA homologiczne do plastydowego 23S rRNA, lecz stopień homologii jest niższy niż u kukurydzy, co sugeruje, że w tym przypadku przeniesienie nastąpiło dość dawno [24].

Z mtDNA ryżu wyizolowano fragment o długości 6,9 kpz zawierający kopię chloroplastowego zespołu genów [18]. W skład tego zespołu wchodzi geny dla dużej podjednostki karboksylazy rybulozo-1,5-dwufosforanowej (rbcL), podjednostki β i ϵ ATP-azy, tRNA-met, tRNA-val. Oprócz tego okazało się, że 430 pz poniżej obszaru homologicznego do rbcL w genomie mitochondrialnym ryżu występuje fragment homologiczny do chloroplastowego

genu rybosomowego białka L 2 (rpl 2). Gen ten w genomie plastydowym ma dwie kopie zlokalizowane w odległości 20 kpz i 40 kpz od genu rbcL. Genowi rbcL i rpl 2 w genomie plastydowym towarzyszy 151-nukleotydowa sekwencja powtarzająca się i ona to właśnie prawdopodobnie umożliwiła homologiczną rekombinację doprowadzającą do przeniesienia genu rpl 2 w pobliże zespołu genów wspomnianych powyżej. Pojawia się jednak pytanie, kiedy zjawisko to miało miejsce: czy przed przeniesieniem fragmentu chloroplastowego do mitochondriów, czy też do mitochondriów przeniesiony został większy odcinek DNA chloroplastowego i wspomniana wcześniej rekombinacja zaszła już w mitochondriach. Fragmenty DNA plastydowego zawierające gen dla rbcL są powszechne w genomach mitochondrialnych wielu różnych roślin wyższych [24].

Mitochondrialny plazmid S1 z kukurydzy zawiera odcinek DNA o długości 420 pz, homologiczny do fragmentu plastydowego kodującego białko psb A fotosystemu II [24].

Zjawisko przenoszenia fragmentów DNA z chloroplastów do mitochondriów nie jest charakterystyczne dla pewnej grupy roślin i wydaje się być uniwersalne dla całego świata roślinnego. W tabeli 1 przedstawiono przykłady rozmiarów homologii między mtDNA a cpDNA roślin.

Interesująca jest analiza homologii fragmentów mitochondrialnych i chloroplastowych czterech przedstawicieli rodziny dyniowatych: cukinii, ogórka, melona i arbuza. O ile mtDNA ogórka zawiera rejony odpowiadające chloroplastowym 16S rRNA, 23S rRNA, rbcL i podjednostkom β oraz ϵ ATP-azy, o tyle mtDNA pozostałych przedstawicieli tej rodziny zawierają tylko niektóre z tych rejonów (tab. 2).

TABELA 2. Obecność odcinków DNA homologicznych do genów chloroplastowych w mitochondrialnych genomach roślin z rodziny dyniowatych [4]

Geny chloroplastowe	Arbuz	Cukinia	Ogórek	Melon
16S rRNA	?	+	+	+
23S rRNA	-	-	+	+
rbcL	-	+	+	-
ATP-aza podjedn. ϵ	+	+	+	-
ATP-aza podjedn. β	+	+	+	-

Stosowane oznaczenia: "+" występuje w mtDNA; "-" nie występuje w mtDNA; "?" nie wiadomo; rbcL – duża podjednostka karboksylazy rybulozo-1,5 -dwufosforanowej

W czasie dyskusji o przenoszeniu DNA chloroplastowego do mitochondriów roślin pojawia się pytanie: czy przeniesienie nastąpiło w procesie jednorazowego przeniesienia, czy też był to wielokrotny proces. Obecnie przypuszcza się, że możliwe są obydwa sposoby. U kukurydzy występuje bardzo duża homologia (90%) na odcinku wynoszącym 12 kpz. Ze względu na zachowany układ genów odcinek tak duży jak ten musiał zostać przeniesiony jednorazowo z chloroplastów do mitochondriów. Odmiennym przykładem są odcinki chloroplastowego DNA występujące w mitochondriach szpinaku: ich wzajemne ułożenie w mtDNA, odmienne niż w chloroplastach, wyklucza twierdzenie, że przeniesienie mogło zajść jednorazowo [26].

Czy odcinki DNA chloroplastowego wbudowane do mtDNA pełnią jakąś biologiczną rolę? Dane eksperymentalne wskazują, że raczej nie. Istnieją jedynie pewne sugestie [15], że być może te odcinki wpływają dodatnio na replikację mitochondrialnego DNA. Badania nad kukurydzą sugerują, że niektóre zmiany w odcinku mtDNA homologicznym do cpDNA

towarzyszą pojawiającej się męskiej sterylności u kukurydzy. Odcinki chloroplastowe istniejące w mitochondriach generalnie nie ulegają transkrypcji, a jeśli ona zachodzi, to jest dziełem przypadkowej integracji fragmentu chloroplastowego w pobliżu promotora jakiegoś genu mitochondrialnego [13].

HOMOLOGIE POMIĘDZY GENOMEM PLASTYDOWYM I GENOMEM JĄDROWYM U ROŚLIN

Obecnie pojawia się coraz więcej doniesień o odcinkach homologicznych dla genomu jądrowego i chloroplastowego. Roślinami pod tym względem dość dobrze zbadanymi są szpinak i ryż [22, 25, 29]. Całkowita ilość fragmentów rozproszonych w genomie jądrowym, a homologicznych do plastydowego DNA u szpinaku jest szacowana na ok. 5 kopii genomu organellowego na 1 jądrowy genom haploidalny [25]. Homologie takie występują na rozproszonych w DNA jądrowym odcinkach, których długość najczęściej wynosi od 1 kpz do kilku kpz. Wydaje się, że w DNA jądrowym szpinaku znajdują się fragmenty homologiczne do całego genomu plastydowego tej rośliny. W odróżnieniu od DNA chloroplastowego DNA jądrowy jest silnie metylowany. Jądro komórkowe szpinaku wydaje się mieć wszystkie geny wymagane do utworzenia genomu plastydowego, lecz są one porodzielane, silnie zmetylowane i najprawdopodobniej transkrypcyjnie nieaktywne.

Obok szpinaku rośliną, w której została stwierdzona obecność fragmentów DNA homologicznych w jądrze i chloroplastach, jest ryż [22]. Istnienie homologii stwierdzono przy okazji badań nad różnicowaniem się kalusa. Wiadomo, że w czasie powstawania kalusa w jego komórkach może zmieniać się ilość chromosomów. Dla ryżu sklonowano fragmenty jądrowego DNA i DNA zawarty w jednym z klonów okazał się być wysoce homologicznym z chloroplastowym DNA. Jądrowy DNA izolowany z zarodków ryżu zawiera ok. 10000 kopii tego odcinka DNA w przeliczeniu na haploidalny genom ryżu [22]. Analiza hybrydazyjnej jądrowego DNA z kalusa dała jednak zaskakujący wynik: liczba powtórzeń omawianego odcinka DNA uległa redukcji do zaledwie 1–5 kopii na haploidalny genom. Dla roślin zregenerowanych z tegoż kalusa liczba kopii badanego odcinka była taka jak dla DNA z zarodków. Obserwacje te sugerują, że podczas tworzenia się kalusa i regeneracji całych roślin ilość kopii pewnych fragmentów jądrowego DNA ryżu zmienia się i wbudowany do jądra odcinek chloroplastowego DNA zachowuje się w sposób charakterystyczny dla tzw. fragmentów o zmiennej ilości kopii. Nie wiadomo, czy kodowane przez niego geny ulegają ekspresji. Badany odcinek jądrowego DNA ryżu ma długość 1456 pz. Stwierdzono, że ten odcinek DNA wykazuje wysoką homologię do genu chloroplastowego rybosomowego białka S7 i 3'-końcowej części genu białka S 12.

Innego przykładu występowania w jądrze komórkowym fragmentów pochodzących z genomu plastydowego dostarczyło badanie pomidora [21]. Trzeci intron jądrowego genu Cab-7 (gen dla białka związanego z chlorofilem a i b) zawiera dwa krótkie fragmenty pochodzące z genu chloroplastowego psbG (białko fotosystemu II). Insercja odcinka plastydowego DNA do intronu jądrowego genu Cab-7 występuje u wszystkich odmian pomidorów, ale u gatunków spokrewnionych z pomidorem jej nie stwierdzono. Można stąd wnioskować, że przeniesienie odcinka chloroplastowego DNA do jądra komórkowego nastąpiło raczej niedawno. Innym przykładem homologii również występującej u pomidora są fragmenty

plastydowego DNA o długości 202 pz i 144 pz zawierające fragmenty genów rps 18 i pet D (gen rybosomowego białka S18 i gen białka wchodzącego w skład kompleksu cytochromu b/f), zlokalizowane w chromosomie 5 i 9 pomidora [20]. W jądrze komórkowym pomidora fragmenty te z całą pewnością nie ulegają ekspresji. Charakterystycznym dla omawianych fragmentów jest to, że są one oskrzydłone krótkimi odcinkami powtórzonymi w jednakowej orientacji, co może sugerować wbudowanie ich w genom jądrowy w drodze rekombinacji. Problem ten szerzej omówiony zostanie w końcowej części tego przeglądu.

Dobrym przykładem przeniesienia w czasie ewolucji roślin naczyniowych genu z genomu chloroplastowego do jądra komórkowego jest gen tuf A (gen białkowego fatora elongacyjnego EF-Tu plastydowej biosyntezy białka). U *Chlamydomonas* gen ten występuje w genomie chloroplastowym, nie ma go natomiast w genomie plastydowym roślin naczyniowych i genomie plastydowym wątrobowca *Marchantia polymorpha* [1]. W genomie jądrowym *Arabidopsis thaliana* znaleziono aktywny gen tuf A homologiczny do genu tuf A z *Chlamydomonas*. Według Baldauf [1] homologia sekwencji aminokwasowej wynosi 77%, natomiast homologia sekwencji nukleotydowej 67%. Przeniesienie tego genu do jądra komórkowego nastąpiło co najmniej 500 milionów lat temu [19].

Innym przykładem przeniesienia genu jest przypadek *Acetabularii* i *Batophory* należących do glonów z rodziny *Dasycladaceae* [24]. U *Acetabularia* gen kinazy tymidylanowej znajduje się w jądrze, natomiast u *Batophora* ten sam gen znajduje się w genomie chloroplastowym.

HOMOLOGIE MIĘDZY GENOMEM MITOCHONDRIALNYM I GENOMEM JĄDROWYM

Badania ostatnich kilku lat dostarczyły dowodów, że istnieją odcinki DNA homologiczne w jądrze i mitochondrium. Częściej stwierdzanym zjawiskiem są odcinki mtDNA występujące w jądrze niż odcinki jądrowego DNA występujące w mitochondrium. Pierwsza część tego rozdziału zostanie poświęcona opisowi przykładów pochodzących ze świata grzybów i zwierząt, a to z tego względu iż pierwsze doniesienia o tym zjawisku pochodziły właśnie z badań nad tą grupą organizmów.

Jednymi z bardziej znanych są badania Farrely i Butowa [6] dotyczące *Saccharomyces cerevisiae*. Wykazali oni, że w jądrowym DNA drożdży występują fragmenty mitochondrialnego DNA. Genom jądrowy *Saccharomyces cerevisiae* zawiera odcinek DNA homologiczny do części mitochondrialnego genu var1 (białko zasocjowane z mniejszą podjednostką rybosomu mitochondrialnego), graniczący od strony 5' z fragmentem homologicznym do 3'-końcowej części genu cytochromu b (*cob/box*), a od strony 3' z fragmentem homologicznym do 5'-końcowej części sekwencji ori/rep, która u drożdży związana jest z replikacją mtDNA. Nie wydaje się, aby ten fragment był w jądrze funkcjonalny, ponieważ są w nim zawarte tylko części genów mitochondrialnych, ponadto zawierają one sygnały terminujące we wszystkich ramkach odczytu. Nie ma dowodów, że są one transkrybowane.

Następnego przykładu obecności w jądrze komórkowym odcinków DNA homologicznych do mtDNA [9] dostarcza *Neurospora crassa*. Genem, który uległ przeniesieniu do jądra komórkowego, jest tu gen jednej z podjednostek ATP-azy. W czasie badań eksperymentalnych podjednostka ta charakteryzuje się wrażliwością na oligomycynę i dwucykloheksylokarboduimid (DCCD). Określana jest w literaturze jako białko DCCD-wrażliwe. U *Saccharomy-*

ces cerevisiae białko DCCD-wrażliwe kodowane jest w genomie mitochondrialnym i również tam syntetyzowane, natomiast u *Neurospora crassa* gen dla tego białka znajduje się w jądrze i białko to syntetyzowane jest w cytoplazmie. Okazało się, że w genomie mitochondrialnym *Neurospora crassa* można znaleźć odcinki homologiczne do genu białka DCCD-wrażliwego z *Saccharomyces cerevisiae*. Porównanie pierwszorzędowych struktur różnych białek DCCD-wrażliwych sugeruje, że otwarta ramka odczytu znaleziona w mtDNA *Neurospora crassa* to gen kodujący typowe białko DCCD-wrażliwe. U *Neurospora crassa* nie znaleziono jednak polipeptydu pochodzącego z mitochondrialnej syntezy białka, który mógłby odpowiadać białku wrażliwemu na DCCD. Homologia genu jądrowego białka DCCD-wrażliwego z fragmentem DNA mogącym być genem mitochondrialnym jest niższa u *Neurospora crassa* niż homologia wspomnianego wyżej fragmentu mtDNA do genów mitochondrialnych białek DCCD-wrażliwych drożdży i wołu. Można z tego wynioskować, że przeniesienie genu z mitochondriów do jądra nastąpiło bardzo dawno i że gen pozostały w mitochondriach *Neurospora crassa* stał się pseudogenem.

Homologie między genomem mitochondrialnym i jądrowym znaleziono również u zwierząt, obecnie znane przypadki to szarańcza [9], szczur [4], jeżowiec [11]. U jeżowca homologia obejmuje fragment końcowy genu 16S rRNA oskrzydłony z jednej strony genem podjednostki I oksydazy cytochromowej. U szczura występują odcinki homologiczne do genu dla podjednostki I, II, III oksydazy cytochromowej i do genu podjednostki 6 dehydrogenazy NADH. Odcinki homologiczne w jądrowym DNA izolowanym ze szczura chorego na raka wątroby wykazują zwiększoną liczbę kopii i organizację inną niż w genomie jądrowym normalnych komórek [4].

Jednym z bardziej interesujących przykładów przeniesienia DNA między jądrem a mitochondrium jest wiesiołek [23]. W mitochondriach wiesiołka znaleziono rejony DNA homologiczne do DNA jądrowego i plastydowego. W jednym przypadku jest to fragment zawierający odcinki homologiczne do plastydowego 23S rRNA i 4,5S rRNA. W drugim przypadku jest to fragment zawierający odcinki homologiczne do jądrowego DNA występujące bardzo blisko odcinków homologicznych do DNA plastydowego. Poniżej zostanie omówiony ten drugi przypadek. Mitochondrialny DNA wykazujący homologię do DNA chloroplastowego obejmuje 758 nukleotydów i rozpoczyna się w genie kodującym białko rybosomowe S4 i rozciąga się na obszar międzygenowy do genu tRNA-ser(GGA) włącznie i kończy 55 nukleotydów poniżej niego. W genie białka S4 znajdującym się w mitochondriach w porównaniu z jego plastydowym odpowiednikiem nastąpiły jedynie trzy zmiany, jedna insercja 4 nukleotydów i dwie delecje 5 i 10 nukleotydów, które przerywają ramkę odczytu i prawdopodobnie zaszły już po przeniesieniu plastydowego DNA do mitochondriów wskutek replikacyjnych pomyłek. Plastydowy gen tRNA-ser(GGA) jest tak ułożony w genomie mtDNA wiesiołka, że teoretycznie może być transkrybowany. Fragment homologiczny do części jądrowego genu 18S rRNA występuje w genomie mitochondrialnym wiesiołka w odległości 762 nukleotydów od fragmentu homologicznego do DNA plastydowego. Odcinek DNA homologiczny do części jądrowego 18S rRNA, o długości 528 nukleotydów wykazuje w 91% homologię z jądrowym genem 18S rRNA kukurydzy, w jego obrębie występuje segment 160-nukleotydowy, charakterystyczny wyłącznie dla jądrowych genów 18S rRNA, nigdy nie stwierdzony w rRNA organellowych. Nie jest znana sekwencja nukleotydowa jądrowego genu 18S rRNA dla wiesiołka, ale przypuszczalnie w wiesiołku homologia tych rejonów jest wyższa niż 91%. W mtDNA pomiędzy fragmentami pochodzącymi z plastydów i z jądrowego DNA wiesiołka rozpościera się obszar, który ma otwartą ramkę odczytu i mógłby

kodować polipeptyd o długości 142 aminokwasów. Jeśli polipeptyd ten rzeczywiście by powstawał, to wykazywałby on duże podobieństwo do odwrotnej transkryptazy retrovirusów lub odwrotnej transkryptazy kodowanej przez niektóre elementy mobilne (*transposable elements*) [23].

Analiza genomów mitochondrialnych roślin z rodziny motylkowatych wykazała istnienie wyjątkowo ciekawego przypadku lokalizacji genu podjednostki II oksydazy cytochromowej (coxII). U niektórych przedstawicieli tej rodziny funkcjonalny gen znajduje się w genomie mitochondrialnym, a u innych w genomie jądrowym. Część przedstawicieli tej rodziny ma dwie kopie genu: jedną w mitochondriach, drugą w jądrze komórkowym, lecz tylko jedna z nich jest funkcjonalnym genem [19]. Sytuację tę przedstawiono w tabeli 3.

TABELA 3. Lokalizacja i ekspresja genu podjednostki II oksydazy cytochromowej u różnych przedstawicieli rodziny motylkowatych [wg 19]

Gatunek	Miejsce występowania		Miejsce ekspresji	
	mitochondrium	jądro	mitochondrium	jądro
Fasolnik chiński	–	+	–	+
Fasola złota	–	+	–	+
Fasola zwykła	+	+	–	+
Soja	+	+	–	+
Groch zwyczajny	+	+	+	–

Stosowane oznaczenia: "+" – występuje lub ulega ekspresji; "–" – nie występuje lub nie ulega ekspresji.

Przypuszcza się, że w rodzinie motylkowatych u części jej przedstawicieli doszło do przeniesienia genu podjednostki II oksydazy cytochromowej z mitochondrium do jądra komórkowego i prawdopodobnie funkcjonalny gen jądrowy współistniał przez jakiś czas z funkcjonalnym genem mitochondrialnym, który stopniowo był eliminowany przez mechanizmy ewolucyjne. W przypadku grochu zwyczajnego gen ten został przeniesiony do jądra komórkowego, lecz nie zdołał uzyskać ekspresji i genem funkcjonalnym u tej rośliny jest nadal gen mitochondrialny [19]. Szacuje się, że u tej części przedstawicieli rodziny motylkowatych, które obecnie mają funkcjonalny gen coxII w jądrze komórkowym, przeniesienie genu do jądra komórkowego miało miejsce między 60 a 200 milionów lat temu, podczas gdy utrata tego genu z genomu mitochondrialnego zaszła później [19]. W przypadku tym wydaje się wysoce prawdopodobnym, że w mechanizm przeniesienia zaangażowany był RNA i enzym o aktywności odwrotnej transkryptazy.

W tytoniu (*Nicotiana glauca*) znaleziono odcinki DNA homologiczne w genomie mitochondrialnym i jądrowym. Trudno rozstrzygnąć, jaki był kierunek przeniesienia DNA [2]. Fragment DNA o długości 1 kbp zlokalizowany po stronie 5' genu związanego z samosterylnością (ang. *self incompatibility*) w genomie jądrowym tytoniu wykazuje homologię do mtDNA i to nie tylko mtDNA swojego gatunku, ale również do mtDNA pomidora (*Lycopersicon esculentum* i *Lycopersicon pennellii*). Nie wykazuje on natomiast homologii do mtDNA kukurydzy. Omawiany odcinek w mtDNA tytoniu rozpoczyna się w odległości 397 bp od miejsca początku transkrypcji genu związanego z samosterylnością. Nie wiadomo, czy ten obszar DNA jest związany z funkcją wspomnianego genu. W genomie jądrowym tytoniu homologiczny region obejmuje odcinki powtórzone w tej samej orientacji. Brak homologii z mtDNA kukurydzy sugeruje, że omawiany fragment nie należy do odcinków konserwatywnych w mitochondrialnym DNA roślin.

HOMOLOGIE MIĘDZY ROŚLINNYMI GENAMI tRNA

Roślinne, mitochondrialne tRNA są bardziej podobne do tRNA chloroplastowych niż do tRNA mitochondrialnych innych organizmów [3]. Geny chloroplastowe przeniesione do mitochondrium to np. geny tRNA-val, tRNA-leu, tRNA-ile obecne w mitochondriach kukurydzy we fragmencie pochodzącym z chloroplastów [3]. Geny te w mitochondriach nie ulegają transkrypcji. Przykładem genów tRNA przeniesionych z chloroplastów do mitochondriów i transkrybowanych są tRNA-trp w mitochondriach pszenicy, kukurydzy i fasoli, których podobieństwo do odpowiedników chloroplastowych waha się w granicach od 96% do 97%. Gen tRNA-cys z mitochondriów kukurydzy wykazuje 99% homologię do odpowiedniego genu z chloroplastów pszenicy (sekwencja chloroplastowego genu tRNA-cys kukurydzy nie jest znana). Podobieństwa te sugerują, że funkcjonalny mitochondrialny tRNA-trp i tRNA-cys pochodzi z segmentu chloroplastowego DNA przeniesionego do mitochondriów. Ostatnio wykazano, że w mitochondriach pszenicy prawidłowo transkrybowane są geny homologiczne do chloroplastowych genów tRNA-ser, tRNA-phe, tRNA-met i tRNA-asp [3]. Panuje przekonanie, że te geny przeniesione do mitochondrium z fragmentem chloroplastowego DNA stały się funkcjonalne przez przypadkowo właściwą insercję w pobliżu mitochondrialnego promotora. Mitochondrialny genom *Brassica oleracea* zawiera fragment plastydowy z genem dla tRNA-leu2, prawdopodobnie nieaktywnym, ponieważ występuje w nim 5-nukleotydomowa insercja [24].

UWAGI KOŃCOWE

Nie znany jest sposób, w jaki dochodzi do przeniesienia materiału genetycznego między organellami. Wiadomo z obserwacji nad zachowaniem się żywych komórek roślinnych, że dochodzi do różnych fizycznych interakcji pomiędzy błonami mitochondrium i chloroplastu [28]. Inny mechanizm zakłada istnienie wektora cytoplazmatycznego zdolnego do przeniesienia materiału genetycznego między organellami. Być może, że w procesie tym mogłyby odgrywać jakąś rolę plazmidy mitochondrialne lub wirusy roślinne. Wiadomo bowiem, że wirus mozaiki tytoniu po infekcji tworzy pewną małą ilość pseudowirionów, które zawierają RNA homologiczny zarówno do cpDNA, jak i do jądrowego DNA [28]. Przekazywanie odcinków DNA u bakterii zachodzi między innymi poprzez plazmidy. Gdyby podobny mechanizm mógł działać u eukariontów, to w międzyorganellowy przekaz DNA mogłyby być zaangażowane struktury określane jako mitochondrialne plazmidy typu DNA i typu RNA [24]. Są one czasami obserwowane w mitochondriach roślin wyższych.

Możliwe, że same cząsteczki RNA lub DNA mogą przedostawać się do wnętrza organelli. Wiadomo, że w żywych komórkach zachodzi transport RNA z cytoplazmy do mitochondriów. Zjawisko takie znane jest dla tRNA u *Chlamydomonas* i *Tetrahymena* [24], a wśród roślin wyższych dla fasoli i ziemniaka [16, 17]. Prymaza mitochondrialna u ssaków dla swojej aktywności wymaga 5,8S rRNA [24] kodowanego przez genom jądrowy. Ze względu na rolę tego enzymu w replikacji mitochondrialnej musi zachodzić import 5,8S rRNA z przedziału cytoplazmatycznego. Z pewnością mechanizm takiego transportu funkcjonuje, brak jednak

danych dotyczących jego specyficzności. Wyjaśnić to mogłoby sposób, w jaki inne rodzaje RNA mogłyby wnikać do mitochondriów.

Gdyby cząsteczką pośredniczącą był RNA, to w komórce niezbędna byłaby aktywność enzymatyczna typu odwrotnej transkryptazy. Obecność tego typu aktywności enzymatycznej została wykazana w jądrach komórkowych różnych organizmów [24]. Dla pszenicy aktywność odwrotnej transkryptazy wykazano we frakcji mikroosomalnej [13], dla wiesiołka wskazano w mtDNA loci, które mogłyby kodować ten enzym [23].

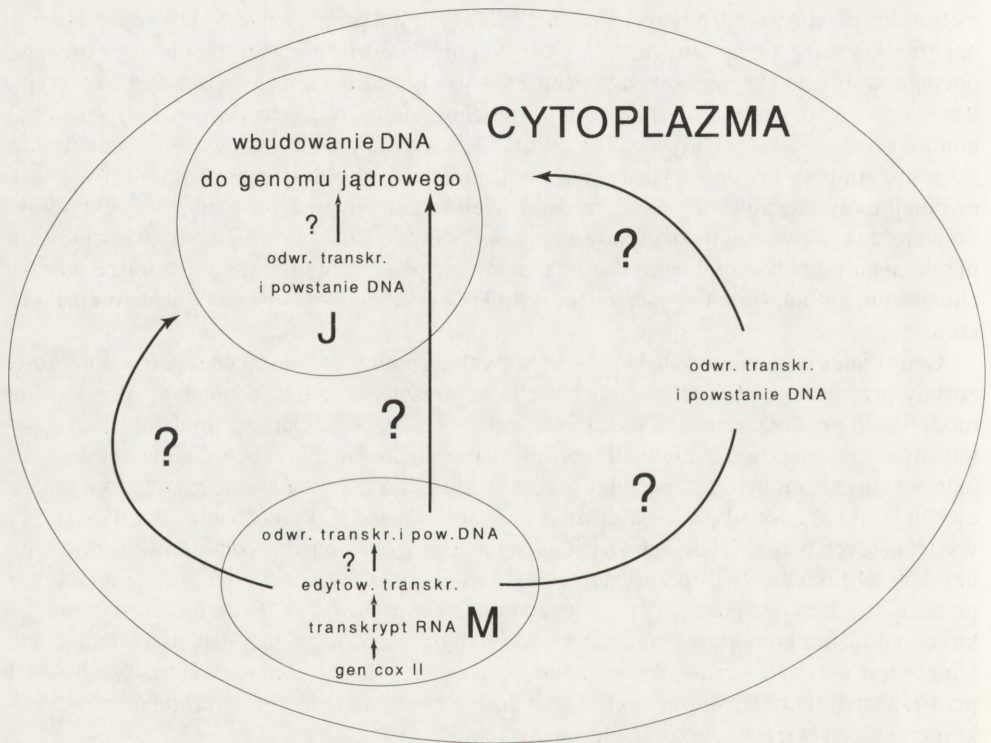
Ciekawy model bazujący na uznaniu RNA jako intermediatu w przenoszeniu materiału genetycznego do jądra komórkowego przedstawiają Nugent i Palmer [19]. Przeniesienie genu podjednostki II oksydazy cytochromowej z genomu mitochondrialnego do jądrowego u dużej części roślin z rodziny motylkowatych (patrz str. 285) tłumaczy zakładając, że mitochondrialny transkrypt, który uległ edytowaniu (ang. *editing*) został przez enzym o aktywności odwrotnej transkryptazy przepisany na cDNA. W mitochondriach roślin zjawisko edytowania pociąga za sobą selektywne przekształcenie C w U i tylko czasami U w C wzdłuż transkryptu RNA i w wyniku tego powstają białka mitochondrialne o często dość różnej sekwencji aminokwasowej od przewidywanej na podstawie sekwencji nukleotydowej mitochondrialnego genu. Autorzy ci zauważyli, że gen podjednostki II oksydazy cytochromowej w czasie ewolucji motylkowatych u części przedstawicieli tej rodziny, przeniesiony z mitochondriów do jądra, ma sekwencję nukleotydową bardziej podobną do edytowanego transkryptu RNA niż do genu mitochondrialnego. Nie wiadomo, czy przepisanie to miałoby miejsce w mitochondrium, cytoplazmie czy jądrze. Na rysunku 1 przedstawiono proponowany model zdarzeń.

Geny białek organellowych, które w toku ewolucji poprzez różne mechanizmy komórkowe zostały przeniesione do jądra komórkowego najczęściej w jądrze wymagają dodatkowych modyfikacji np. dołączenia odcinka DNA kodującego peptyd liderowy umożliwiający zsintetyzowanemu w cytoplazmie białku przedostanie się do wnętrza organelli. Funkcjonalnymi jądrowymi genami białek organellowych stały się tylko te przeniesione geny, które w toku ewolucji zyskały dodatkowe właściwości przystosowujące je do mechanizmów transkrypcji występujących w przedziale jądrowym. Geny przeniesione do jądra komórkowego, które nie uzyskały w toku ewolucji przystosowania do mechanizmów transkrypcji występujących w przedziale jądrowym, pozostały pseudogenami. Dobrym przykładem jest groch zwyczajny, u którego do jądra komórkowego z mitochondrium przeniesiony został gen *coxII*. Jednak gen ten nie jest aktywny i prawidłowe białko tworzone jest nadal w mitochondriach. U innych przedstawicieli tej rodziny gen *coxII* został dostosowany do jądrowych mechanizmów transkrypcji i ulega ekspresji jako gen jądrowy.

Czasami odcinki DNA pochodzące z jednego przedziału komórkowego, wbudowane do DNA innego przedziału są flankowane przez krótkie odcinki DNA powtórzone w tej samej orientacji np. u pomidora (patrz str. 282). W tych znanych nielicznych przypadkach za wbudowanie DNA do innego przedziału mógłby być odpowiedzialny proces przedstawiony na rysunku 2.

Proponowany model zakłada pęknięcie jądrowego DNA w taki sposób, że tworzą się dwa kilku lub kilkunastonukleotydowe, wzajemnie komplementarne końce jednoniciowe ("lepkie końce"). Fragment DNA z "obcego" przedziału przypadkowo ma również z jednej strony komplementarny, jednoniciowy "lepkie końce" (mało prawdopodobne wydaje się założenie posiadania przez "obcy" fragment z obydwu stron takich samych "lepkich końców"). Dochodzi do sparowania się fragmentów "obcego" DNA z DNA jądrowym z jednej strony i do ich

ligacji w tym miejscu. Prawdopodobnym jest, że z drugiej strony dochodzi do ligacji po dobudowaniu przez polimerazę DNA w drodze syntezy naprawczej kilku lub kilkunastu nukleotydów komplementarnych do pozostałego "lepkiego końca" jądrowego DNA i ligacji obydwu fragmentów. Sytuację taką pokazano na rysunku 2a. W miejscu pierwotnego występowania "lepkich końców" tworzą się odcinki powtórzone. Po sparowaniu się jednoniciowego końca fragmentu pochodzącego z innego przedziału komórkowego z jednym z "lepkich końców" jądrowego DNA i ligacji, z drugiej strony może nastąpić degradacja pozostałego "lepkiego końca" jądrowego DNA i fragment "obcego" DNA może zostać zligowany z jądrowym DNA drogą ligacji tzw. "końców tępych" [20]. Możliwość taką przedstawia rysunek 2b. W tej sytuacji nie tworzą się odcinki powtórzone.

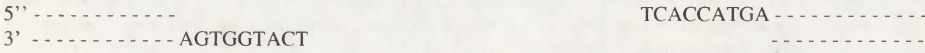


Rys.1. Model przeniesienia genu podjednostki II oksydazy cytochromowej (coxII) z mitochondrium do jądra komórkowego [wg 19]; stosowane oznaczenia: J – jądro komórkowe, M – mitochondrium, ? – nie wiadomo, w którym przedziale komórkowym nastąpiła odwrotna transkrypcja i powstanie DNA na matrycy edytowanego transkryptu mitochondrialnego

Charakterystyczną cechą komórki roślinnej jest to, że rozmiary genomów jądrowych i mitochondrialnych ulegają bardzo znacznym wahaniom, natomiast genom plastydowy jest w porównaniu z nimi najmniejszy i bardzo konserwatywny. Istnieje doniesienie [10] o wirusie roślinnym typu geminiwirusa (ang. *Abutilon mosaic virus*) zawierającym jednoniciowy DNA, który dostaje się do chloroplastów i tam replikuje. Wydaje się więc, że przedostanie się obcego DNA do plastydów jest możliwe, nie znaleziono jednak do tej pory przykładów wbudowania

obcego DNA do genomu plastydowego. Powody, dla których genomy chloroplastowe w odróżnieniu od pozostałych nie wykazują zdolności wbudowywania DNA z innego przedziału komórkowego, nie są znane.

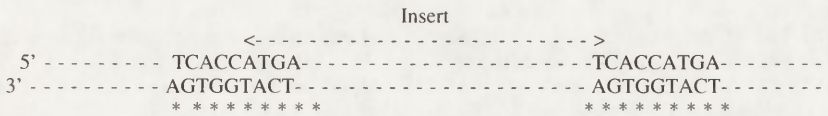
Zerwany DNA w jądrze komórkowym, mający z obydwu stron pęknięcia dwa wystające, końcowe odcinki jednoniciowego DNA wzajemnie komplementarne, tzw. "lepkie końce"



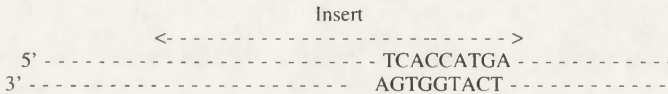
Insert mający z jednej strony jednoniciowy, końcowy odcinek DNA komplementarny do jednego z jednoniciowych odcinków pękniętego jądrowego DNA



a



b



Rys. 2. Model integracji odcinka plastydowego DNA z jądrowym DNA wyjaśniający możliwy sposób powstawania odcinków powtórzonych oskrzydlających *insert*; model opracowano na podstawie analizy krótkich odcinków plastydowych wbudowanych do DNA jądrowego u pomidora [20]: a – plastydowy DNA tworzy po jednej stronie odcinek sparowany z jednoniciowym końcem powstałym po zerwaniu jądrowego DNA; po wypełnieniu ewentualnej luki (w trybie naprawczej syntezy DNA) dochodzi do ligacji jądrowego DNA z plastydowym DNA; po drugiej stronie miejsca zerwania jądrowego DNA jednoniciowy odcinek służy jako matryca do naprawczej syntezy, a następnie utworzony w ten sposób "tępy koniec" jądrowego DNA ulega ligacji z "tętym końcem" plastydowego DNA; po wbudowaniu insertu tworzą się dwa odcinki powtórzone; b – całkowita degradacja z jednej strony niesparowanego, jednoniciowego końca jądrowego DNA, po wbudowaniu insertu nie tworzą się odcinki powtórzone. * * * * * odcinek powtórzony

LITERATURA

- [1] BALDAUF SL, PALMER JD. Evolutionary transfer of the chloroplast *tufA* gene to the nucleus. *Nature* 1990; **344**: 262–265.
- [2] BERNATZKY R, MAU SL, CLERKE AE. A nuclear sequence associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca* has homology with mitochondrial DNA. *Theor Appl Genet* 1989; **77**: 320–324.
- [3] BREIMAN A, GALUN E. Nuclear-mitochondrial interrelation in angiosperms. *Plant Science* 1990; **1**: 3–19.
- [4] CORRAL M, BATFET G, KITZIS A, PARIS B, TICHONICKY L, KRUIH J, GUGUEN-GUINONZO C, DEFER N. DNA sequence homologous to mitochondrial genes in nuclei from normal rat tissue and from rat hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Comm* **162**: 258–264.
- [5] du JARDIN P. Homologies to plastid DNA in the nuclear and mitochondrial genomes of potato. *Theor Appl Genet* 1990; **79**: 807–812.
- [6] FARELLY F, BUTOW RA. Rearranged mitochondrial genes in the yeast nuclear genome. *Nature* 1983; **301**: 296–301.
- [7] FEJES E, MASTERS BS, McCARTHY DM, HAUSWIRTH WW. Sequence and transcriptional analysis of chloroplast insert in the mitochondrial genome of *Zea mays*. *Curr Genetics* 1988; **13**: 509–515.
- [8] FOX TD. Mitochondrial genes in the nucleus. *Nature* 1983; **301**: 371.
- [9] GELLISSEN G, BRADFIELD JY, WHITE BN, WYATT GR. Mitochondrial DNA sequences in the nuclear genome of locust. *Nature* 1983; **301**: 631–634.
- [10] GRONIG BR, FRISCHMUTH T, JESKE H. Replicative form DNA of *Abutilon* mosaic virus is present in plastids. *Mol Gen Genet* 1990; **220**: 485–488.
- [11] JACOBS HT, POSAKONY JW, GRULA JW, ROBERTS JW, JI-HOU XIN, BRITTEN RJ, DAVIDSON EH. Mitochondrial DNA sequences in the nuclear genome of *Strongylocentrotus purpuratus*. *J Mol Biol* 1983; **165**: 609–632.
- [12] KEMBLE RJ, MANS RJ, GABAY-LAUGHNAN S, LAUGHNAN JR. Sequences homologous to epistomal mitochondrial DNAs in the maize nuclear genome. *Nature* 1983; **304**: 744–747.
- [13] KRASZEWSKA E, MARCINIAK B, KONOPINSKA A. The reverse transcriptase-like activity of wheat embryos is tightly bound to its template. *FEBS Budapest* 1990; Abstracts 327.
- [14] LEWIN. Genes. 4 wyd. 1989: 518–529.
- [15] LONSDALE DM, HODGE TP, HOWE CJ, STERN DB. Maize mitochondrial DNA contains a sequence homologous to the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit gene of chloroplast DNA. *Cell* 1983; **34**: 1007–1014.
- [16] MARECHAL-DROUARD L, GILLEMAUT P, COSSET A, ARBOGAST M, WEBER F, WEIL JH, DIETRICH A. Transfer RNAs of potato (*Solanum tuberosum*) mitochondria have different genetic origins. *NAR* 1990; **18**: 3689–3696.
- [17] MARECHAL-DROUARD L, NEUBURGER M, GILLEMAUT P, DOUCE R, WEIL JH, DIETRICH A. A nuclear-encoded potato (*Solanum tuberosum*) mitochondrial transfer RNA-leu and its cytosolic counterpart have identical nucleotide sequences. *FEBS Letters* 1990; **262**: 170–172.
- [18] MOON E, KAO TH, WU R. Rice mitochondrial genome contains a rearranged chloroplast gene cluster. *Mol Gen Genet* 1988; **213**: 247–253.
- [19] NUGENT J, PALMER JD. RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* 1991; **66**: 473–481.
- [20] PICHERSKY E, LOGSDON JM, McGRATH JM, STASYS RA. Fragments of plastid DNA in the nuclear genome of tomato: prevalence, chromosomal location, and possible mechanism of integration. *Mol Gen Genet* 1991; **225**: 453–458.
- [21] PICHERSKY E, TANKSLEY SD. Chloroplast DNA sequences integrated into an intron of a tomato nuclear gene. *Mol Gen Genet* 1988; **215**: 65–68.
- [22] SCHOSHI KIKUCHI, FUMIO TAKAIWA, KIYOHARU OONO. Variable copy number DNA sequences in rice. *Mol Gen Genet* 1987; **210**: 373–380.
- [23] SCHUSTER W, BRENNICKE A. Plastid, nuclear and reverse transcriptase sequences in the mitochondrial genome of *Oenothera*: is genetic information transferred between organelles via RNA? *Embo J* 1987; **6**: 2857–2863.
- [24] SCHUSTER W, BRENNICKE A. Interorganellar sequence transfer: plant mitochondrial DNA is nuclear, is plastid, is mitochondrial. *Plant Sci* 1988; **54**: 1–10.
- [25] SCOTT NS, TIMMIS JN. Homologies between nuclear and plastid DNA in spinach. *Theor Appl Genet* 1984; **67**: 279–288.

- [26] STERN DB. DNA transposition between plant organellar genomes. *J Cell Sci* 1987; Suppl 145–154.
- [27] STERN DB, LONSDALE DM. Mitochondrial and chloroplast genomes of maize have a 12kbp DNA sequence in common. *Nature* 1982; **299**: 698–702.
- [28] STERN DB, PALMER JD. Extensive and widespread homologies between mitochondrial DNA and chloroplast DNA in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 1946–1950.
- [29] TIMMIS JN, SCOTT NS. Sequence homology between spinach nuclear and chloroplast genomes. *Nature* 1983; **305**: 65–67.

Otrzymano: 13.02.1992 r.

Przyjęto: 16.04.1992 r.

Adres autorów: 61-701 Poznań ul. Fredry 10.

INTERAKCJE MIĘDZYKOMÓRKOWE PODCZAS PŁCIOWEGO ROZMNAŻANIA ROŚLIN KWIATOWYCH

CELL-CELL INTERACTIONS IN SEXUAL REPRODUCTION OF *ANGIOSPERMAE*

Elżbieta BEDNARSKA

Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet M. Kopernika, Toruń

Streszczenie. Omówiono stan wiedzy na temat interakcji międzykomórkowych podczas płciowego rozmnażania roślin kwiatowych. Podstawowe procesy wymagające rozpoznania i przekazywania sygnałów pomiędzy komórkami to: (a) pozapyleniowa selekcja pyłku, czyli tzw. samoniezgodność – genetycznie kontrolowany mechanizm zapobiegający rozmnażaniu wsobnemu, (b) wejście łagiewki pyłkowej do aparatu jajowego i uwolnienie komórek plemnikowych, proces włączający transdukcję sygnału pomiędzy łagiewką pyłkową i synergidami, (c) ukierunkowane zapłodnienie związane z genetycznie zdeterminowanym wzorcem fuzji gamet.

Słowa kluczowe: reakcje sygnałowe, pyłek-słupek, samoniezgodność, zapłodnienie

Summary. The current state of knowledge on cell-cell interaction in sexual reproduction of *Angiospermae* is presented. The fundamental process which require cell-cell recognition and signal transduction are: (a) postpollination selection of the pollen grains, so called self-incompatibility, a genetically controlled mechanism to prevent inbreeding, (b) entrance of the pollen tube into the egg apparatus and release of the sperm cells, process including signal transduction between pollen tube and synergids, (c) preferential fertilization, genetically determined gametic fusion patterns.

Key words: signal reactions, pollen-pistil, self-incompatibility, fertilization

Rozmnażanie płciowe roślin okrytonasiennych realizowane jest w drodze wzajemnych interakcji pomiędzy komórkami męskiego gametofitu a komórkami słupka i woreczka zalążkowego. Stanowi zatem dogodny model do badania szeroko pojętych interakcji międzykomórkowych u roślin. Kluczowe zjawiska wymagające wymiany informacji to:

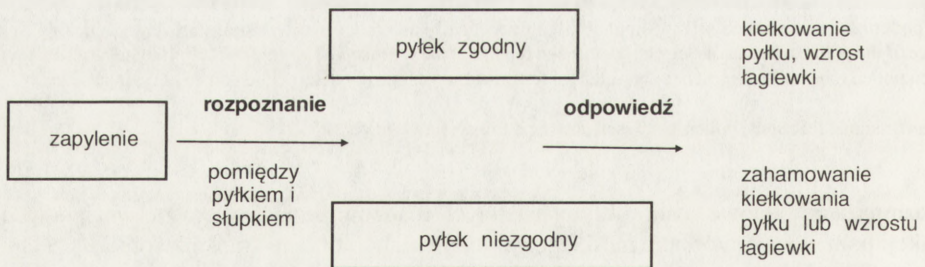
- pozapyleniowa selekcja pyłku realizowana w drodze interakcji pyłek-słupek,
- wejście łagiewki pyłkowej do aparatu jajowego i uwolnienie gamet męskich wymagające oddziaływania pomiędzy komórkami żeńskiego i męskiego gametofitu,
- podwójne zapłodnienie związane z wcześniej zdeterminowanym kierunkiem fuzji pomiędzy żeńskimi i męskimi gametami.

INTERAKCJA PYŁEK-SŁUPEK – POZAPYLENIOWA SELEKCJA PYŁKU

W toku ewolucji u roślin okrytonasiennych wykształcił się mechanizm tzw. **niezgodności**. **Niezgodność międzygatunkowa** zapobiega rozwojowi pyłku obcego gatunku, natomiast **niezgodność wewnątrzgatunkowa (samoniezigodność)** nie dopuszcza do samozapłodnienia, hamując rozwój pyłku z własnego kwiatu. Dzięki niezgodności międzygatunkowej utrzymywana jest stała pula genowa wewnątrz gatunku, zaś mechanizmy samoniezigodności zabezpieczają ciągłą wymianę alleli pomiędzy osobnikami tego samego gatunku. Powstanie mechanizmów zabezpieczających krzyżowe zapylenie uważane jest za jeden z najważniejszych czynników ewolucyjnego sukcesu roślin kwiatowych [24].

Rozpoznanie pyłku jako **zgodnego** lub **niezgodnego** (obcego gatunkowo lub z tego samego kwiatu) wymaga wymiany informacji pomiędzy męskim i żeńskim partnerem rozrodczym podczas zapylenia (rys. 1). Brak rozwoju pyłku pochodzącego od gatunku odległego ewolucyjnie jest procesem pasywnym, wynikającym z niedopasowania genetycznego partnerów rozmnażania i nosi nazwę **niedostosowania**. Hamowanie rozwoju pyłku z własnego kwiatu i pochodzącego prawdopodobnie od gatunków bardzo blisko spokrewnionych jest procesem aktywnym, warunkowanym obecnością genetycznie zaprogramowanych mechanizmów rozpoznania i odrzucenia pyłku [29].

U roślin kwiatowych występują dwa typy niezgodności wewnątrzgatunkowej (rys. 2): **heteromorficzny** i **homomorficzny** [17, 19, 29]. W samoniezigodności **heteromorficznej** [31] osobniki tego samego gatunku wytwarzają dwa lub trzy typy kwiatów. Kwiaty różnią się długością słupków i pręcików, wielkością ziaren pyłkowych i skulpturą egzyny oraz budową i właściwościami cytochemicznymi receptywnej powierzchni znamienia [66, 67]. Do efektywnego zapylenia może dojść tylko pomiędzy osobnikami o różnym typie kwiatów. Zahamowanie rozwoju niezgodnych ziaren pyłkowych odbywa się w znamieniu lub szyjce słupka.

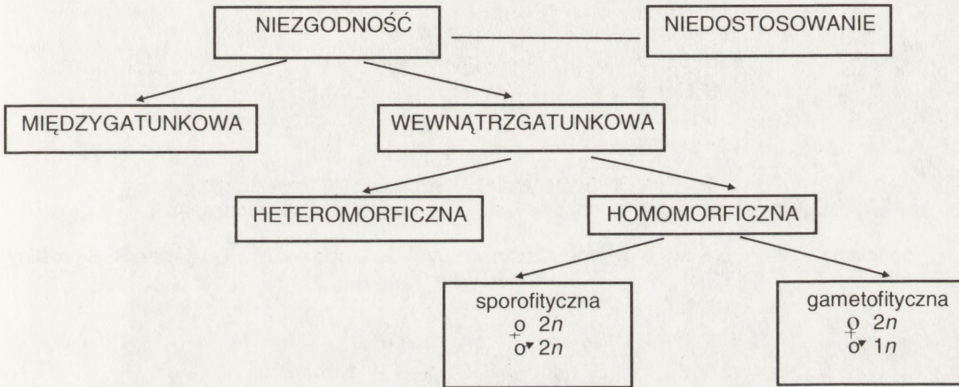


Rys. 1. Kolejność zdarzeń w interakcji pyłek-słupek

Niezgodność homomorficzna występuje u gatunków roślin produkujących identyczne, obupłciowe kwiaty. W systemie tym wyróżniamy **samoniezgodność sporofityczną i gametofityczną**. Różne systemy niezgodności występujące u roślin kwiatowych przedstawiono na rysunku 2.

Genetycznie samoniezigodność najczęściej jest kontrolowana pojedynczym wieloallelicznym **genem S** [19, 24, 29, 41]. Fenotypowe ujawnienie się ekspresji tych samych alleli S w

gametoficie męskim i w słupku powoduje rozpoznanie pyłku jako niezgodnego i zatrzymanie jego rozwoju. W **samoniezgodności gametofitycznej** fenotyp pyłku jest wyrazem ekspresji allelu, który w wyniku mejozy przekazywany jest do mikrospory. Interakcja pomiędzy partnerami rozmnażania jest zatem warunkowana działaniem diploidalnego genomu słupka i haploidalnego genomu pyłku (rys. 3). Inaczej jest w **samoniezgodności sporofitycznej**. W tym przypadku o fenotypie pyłku decyduje diploidalny genom rośliny macierzystej. Bez



Rys. 2. Systemy niezgodności występujące u roślin kwiatowych

względem na własny haploidalny allel, pyłek ujawnia ekspresję obydwu alleli S (lub allelu dominującego) rośliny macierzystej (rys. 3).

CYTOLOGICZNY PRZEBIEG ZJAWISK ROZPOZNANIA I ODRZUCENIA NIEZGODNYCH ZIAREN PYŁKOWYCH

Do wymiany informacji między żeńskim i męskim partnerem może dojść tylko w miejscu ich bezpośredniego, fizycznego kontaktu. Miejscami tymi są:

- powierzchnia pyłku,
- powierzchnia znamienia (zewnątrzkomórkowa, błonopodobna [28] pellikula lub wydzielina),
- ściana kielkującej łagiewki,
- ściany komórek znamienia,
- ściana rosnącej łagiewki pyłkowej,
- wydzielina szlaku transmisyjnego słupka.

W gametoficie męskim lokalizacja czynników rozpoznania związana jest prawdopodobnie ze sporodermą pyłku i ścianą łagiewki pyłkowej [29]. Słowo "prawdopodobnie" wynika z faktu, że wciąż nie udało się wyizolować z pyłku białek, które z całą pewnością byłyby produktami genu S. Białka występujące w sporodermie pyłku mają dwojakie pochodzenie. Podczas jego dojrzewania do egzyny wbudowywane są białka produkowane w diploidalnych komórkach sporofitu. Intyna i ściana łagiewki pyłkowej są natomiast miejscami występowania białek syntetyzowanych w gametoficie. Przypuszcza się, że białka egzyny biorą udział w procesie rozpoznania typu sporofitycznego, zaś obecne w intynie i ścianie łagiewki pyłkowej

P: ♀ S_1S_2 x ♂ S_2S_3 słupek S_1S_2 ziarna pyłkowe S_2 i S_3

Efektom fenotypowego ujawniania się tych samych alleli u obydwu partnerów rozrodczych jest zahamowanie rozwoju pyłku w słupku

A. SAMONIEZGODNOŚĆ GAMETOFITYCZNA
(fenotyp pyłku jest wyrazem ekspresji jego własnego allelu S)

słupek	pyłek	
a) S_1S_2	x S_2	→ hamowanie pyłku
b) S_1S_2	x S_3	→ rozwój pyłku

B. SAMONIEZGODNOŚĆ SPOROFITYCZNA
(fenotyp pyłku determinowany jest genotypem rośliny macierzystej)

1) współdominacja alleli – obydwa typy produkowanego pyłku fenotypowo ujawniają allele S_2S_3 rośliny macierzystej

słupek	pyłek	
a) S_1S_2	x S_2 (fenotyp S_2S_3)	→ hamowanie
b) S_1S_2	x S_3 (fenotyp S_2S_3)	→ hamowanie

2) dominacja S_3 – w obydwu typach produkowanego pyłku fenotypowo ujawnia się allel S_3 rośliny macierzystej

słupek	pyłek	
a) S_1S_2	x S_2 (fenotyp S_3)	→ rozwój
b) S_1S_2	x S_3 (fenotyp S_3)	→ rozwój

Rys. 3. Genetyczna kontrola samoniezgodności: A – w samoniezgodności gametofitycznej fenotyp słupka jest determinowany diploidalnym genotypem rośliny macierzystej, natomiast pyłku – haploidalnym genotypem mikrospory i jej komórek potomnych; a – efektem obecności allelu S_2 w słupku i pyłku jest rozpoznanie pyłku jako niezgodnego i zahamowanie jego rozwoju, b – kielkuje i wyrasta w łagiewkę pyłkową ziarno pyłkowe mające allel S_3 , który nie występuje w komórkach słupka; B – w samoniezgodności sporofitycznej zarówno fenotyp słupka, jak i ziarna pyłkowego jest determinowany genotypem rośliny macierzystej; 1 – w przypadku współdominacji alleli S fenotyp ziarna pyłkowego, bez względu na jego własny allel, ujawnia cechy rośliny macierzystej, a więc w tym przypadku S_2S_3 ; a – fenotypowe ujawnienie się allelu S_2 u obydwu partnerów rozmnażania prowadzi do rozpoznania męskiego gametofitu jako niezgodnego i zahamowania jego rozwoju, b – zahamowaniu ulegnie również rozwój ziarna pyłku o genotypie S_3 , które fenotypowo ujawnia macierzysty allel S_2 ; 2 – w przypadku dominacji jednego z alleli obydwa typy pyłku będą miały cechę allelu dominującego rośliny macierzystej; a – ziarno pyłkowe o genotypie S_2 , lecz będące fenotypowo S_3 , może rozwijać się, gdyż allel S_3 nie występuje w słupku, b – ziarno pyłkowe o genotypie i fenotypie S_3 bez przeszkód rozwija się na znamieniu S_1S_2

– w procesie rozpoznania typu gametofitycznego. W słupku białka, będące wyrazem ekspresji allelu S, występują prawdopodobnie w pelliculi pokrywającej powierzchnię suchych znamion, w ścianie komórek znamienia oraz w wydzielinie szlaku transmisyjnego szyjki słupka [13, 21, 29, 36, 38, 52, 55]. Uważa się, że białka obecne w pelliculi są odpowiedzialne za wymianę informacji pomiędzy pyłkiem i słupkiem głównie w sporofitycznej samoniezgodności. W

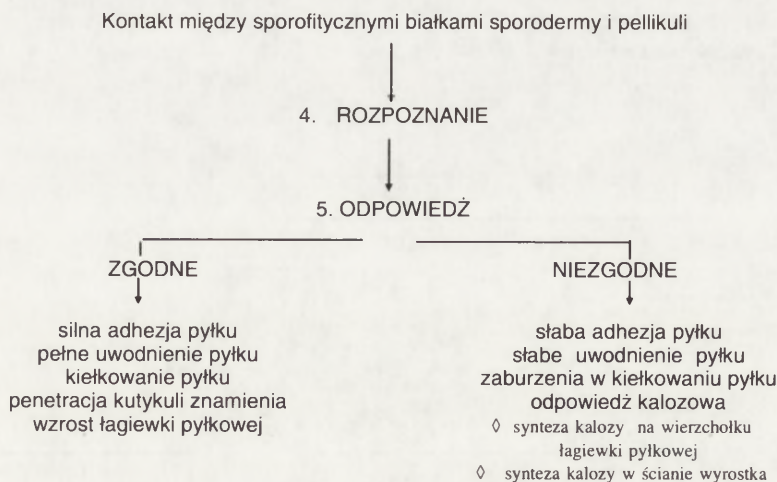
samonieżgodność gametofityczną zaangażowane są przede wszystkim białka zlokalizowane na szlaku transmisyjnym znamienia i szyjki słupka.

SEKWENCJA ZDARZEŃ W SAMONIEZGODNOŚCI SPOROFITYCZNEJ (rys. 4)

Sporofityczna samonieżgodność występuje u 6 rodzin roślin kwiatowych [14]. Opisano ją głównie u gatunków należących do *Cruciferae*. Większość z tych roślin ma trójkomórkowe ziarna pyłkowe i suchą powierzchnię znamienia. Zjawiska związane ze sporofityczną samonieżgodnością najlepiej poznane są u *Brassica oleracea* i *B. campestris*.

Dwa kluczowe procesy interakcji pomiędzy partnerami rozmnażania, tj. **rozpoznanie i odpowiedź** odbywają się **na powierzchni znamienia** [21, 29]. Po zapyleniu następuje recepcja pyłku oraz uwolnienie białek egzyny. W okresie tym dochodzi do rozpoznania pyłku w drodze wymiany informacji pomiędzy znamieniem i ziarnem pyłku. **Odpowiedzią** na rozpoznanie pyłku jako **zgodnego** jest uruchomienie procesów związanych z jego kiełkowaniem i niezakłócony wzrost łagiewki pyłkowej. Natomiast jeżeli ziarno pyłkowe zostało rozpoznane jako **niezgodne**, to odpowiedzią jest blokowanie procesów koniecznych do prawidłowego kiełkowania. Ostatecznym wyrazem procesu **odrzućcia** niezgodnych ziaren

1. ZAPYLENIE
2. RECEPCJA PYŁKU NA POZIOME POWIERZCHNIA PYŁKU – PELLIKULA
3. UWOLNIENIE BIAŁEK EGZYNY



Rys. 4. Sekwencja zdarzeń w sporofitycznym systemie samonieżgodności (na podstawie badań u *Brassica oleracea* [29])

pyłkowych jest tzw. **odpowiedź kalozowa**. Ujawnia się ona syntezą kalozy **na wierzchołku kiełkującej łagiewki pyłkowej** oraz **w ścianie wyrostka znamienia**, z którym niezgodny pyłek był w bezpośrednim kontakcie [61]. Synteza kalozy w wyrostkach znamienia jest

odpowiedzią specyficzną, *in vitro* jest indukowana działaniem na wyrostki ekstraktami ze ściany niezgodnych ziaren pyłkowych [40].

SEKWENCJA ZDARZEŃ W SAMONIEZGODNOŚCI GAMETOFITYCZNEJ (rys. 5)

Samoniezgodność gametofityczna występuje u większości roślin kwiatowych i uważana jest za progresywną w stosunku do sporofitycznej. Ten typ samoniezgodności mają głównie rośliny o dwukomórkowych ziarnach pyłkowych i znamieniu mokrego typu [19, 21, 29]. Wyjątkiem są trawy, których znamiona pokrywa pellikula, a ziarna pyłku są trójkomórkowe, oraz mający znamiona suchego typu *Papaver rhoeas* [27].

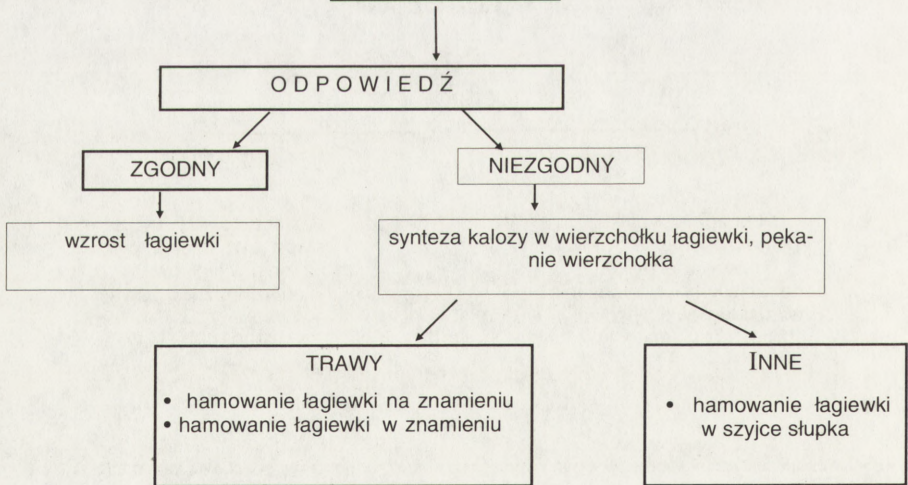
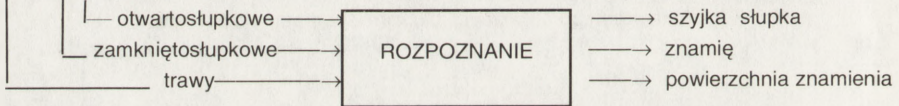
Cytologicznie proces ten ujawnia się bardziej różnorodnie aniżeli w samoniezgodności sporofitycznej [21, 29, 41]. Miejscem **rozpoznania** pomiędzy partnerami rozmnażania jest znamię (trawy, rośliny zamkniętosłupkowe) lub **szyjka słupka** (rośliny otwartosłupkowe). W wymianie informacji biorą zatem udział białka znamienia lub szlaku transmisyjnego słupka oraz gametofityczne białka intyny lub ściany łagiewki pyłkowej. Odrzucenie niezgodnych ziaren pyłkowych odbywa się **na znamieniu** (trawy), **wewnątrz znamienia** (trawy, *Papaver rhoeas*) lub **w szyjce słupka** (rośliny produkujące dwukomórkowe ziarna pyłkowe i mające

3. UWOLNIENIE BIAŁEK SPORODERMY – kontakt białek intyny i powierzchni znamienia

4. UWODNIENIE I KIELKOWANIE PYŁKU

5. PENETRACJA ZNAMIENTA – kontakt białek znamienia i ściany łagiewki pyłkowej

6. WZROST ŁAGIEWKI W SZYJCE SŁUPKA – kontakt białek szyjki i ściany łagiewki



Rys. 5. Sekwencja zdarzeń w gametofitycznym systemie samoniezgodności (opracowano na podstawie [19, 21, 29])

znamiona mokrego typu). U wielu roślin miejsce rozpoznania jest inne aniżeli miejsce odrzucenia. U gatunków mających słupki zamkniętego typu rozpoznanie ziarna pyłku odbywa się w znamieniu, lecz odrzucenie niezgodnych łagiewek pyłkowych – dopiero w szyjce słupka [41]. **Odpowiedzią** na rozpoznanie niezgodnego pyłku jest **synteza kalozy**, ale tylko na wierzchołku łagiewki pyłkowej [17, 29]. Komórki słupka nie odpowiadają na kontakt z niezgodnymi ziarnami pyłku, przynajmniej w tak uchwytny cytologicznie sposób.

MOLEKULARNE PODŁOŻE INTERAKCJI PYŁEK-SŁUPEK

Białko, które może być uznane za produkt genu S musi spełniać następujące kryteria:

- odpowiadać poszczególnym genotypom roślin – rodzaj syntetyzowanego białka musi być zgodny z segregacją alleli S w krzyżówkach genetycznych;
- występować w miejscu swego działania – w gametoficie męskim białka te powinny być obecne w sporodermie i ścianie łagiewki pyłkowej, w słupku – w znamieniu i szlaku transmisyjnym szyjki;
- występować w tym stadium rozwojowym słupka i pyłku, w którym ujawnia się cecha samoniezgodności – produkty genu S nie powinny występować w niedojrzałym pyłku i słupku, kiedy cecha samoniezgodności nie jest jeszcze wykształcona;
- być aktywne w warunkach in vitro – produkty genu S wyizolowane z pyłku powinny indukować odpowiedź kalozową w samoniezgodnym znamieniu u gatunków ze sporofityczną samoniezgodnością, zaś produkty genu S wyizolowane ze słupka – hamować kiełkowanie i/lub wzrost niezgodnych łagiewek pyłkowych.

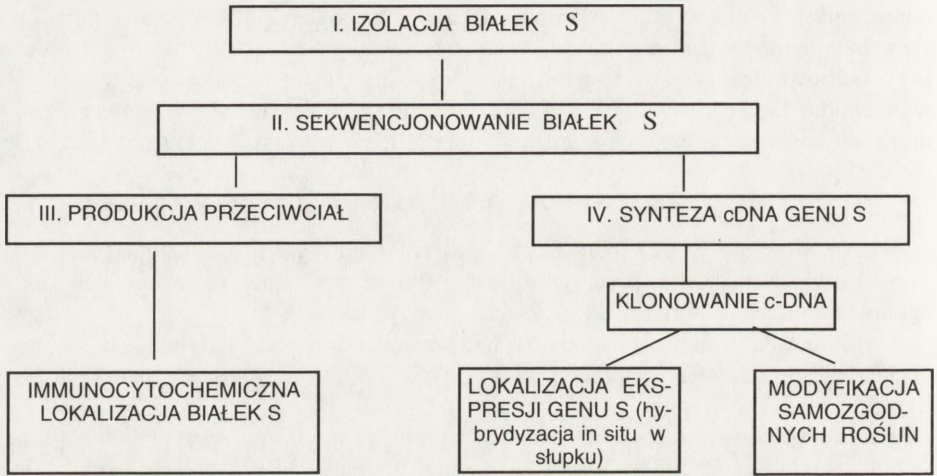
Dzięki kilkudziesięcioletniej pracy hodowców znanych jest kilkanaście linii roślin, które są homozygotami dla alleli S. Systemami modelowymi są głównie *Nicotiana glauca* i *Papaver rhoeas* mające gametofityczny typ samoniezgodności oraz *Brassica oleracea*, u której występuje samoniezgodność sporofityczna. Rozwój technik biologii molekularnej pozwolił na wyodrębnienie i scharakteryzowanie genu S oraz przypuszczalnych produktów jego ekspresji w sporofitycznej i gametofitycznej samoniezgodności. Konieczne było zastosowanie omawianych dalej metod badawczych (rys. 6).

(a) Izolacja białek S

Pierwszym krokiem prowadzącym do izolacji białek S jest wyodrębnienie z ekstraktów słupka (znamienia i/lub szyjki) białek, które są immanentnie związane z tym organem i nie występują w innych tkankach rośliny. Białka specyficzne dla słupka stają się potencjalnymi kandydatami produktów ekspresji genu S. Następnie ustala się, które z tych białek są syntetyzowane zgodnie z segregacją alleli S w krzyżówkach genetycznych. Należy jednakże podkreślić, że nie daje to 100% pewności, iż są to faktycznie białka S. Wyizolowane tą metodą białka mogą pochodzić z ekspresji genów leżących w bliskim sąsiedztwie allelu S.

(b) Sekwencjonowanie białek S

Wyizolowane białka S poddaje się badaniom biochemicznym (masa cząsteczkowa, pI) i sekwencjonowaniu. Rezultatem tych badań jest poznanie ich budowy i przypuszczalnej funkcji. Białka S wyizolowane ze słupków samoniezgodnych roślin to glikoproteiny o masie cząsteczkowej od 28 do 65 kDa, mające około 8 potencjalnych miejsc glikozylacji [13, 18, 28, 32]. Zbudowane są z fragmentów konserwatywnych, występujących we wszystkich białkach S oraz z fragmentów zmiennych odzwierciedlających prawdopodobnie zróżnicowanie alleliczne genu S.



Rys. 6. Metody biologii molekularnej stosowane w badaniach samoniezgodności u roślin kwiatowych

(c) Produkcja przeciwciał i *in situ* lokalizacja białek S

Wyizolowane glikoproteiny S służą do produkcji przeciwciał, które w przypadku posłużenia się krótkimi fragmentami zmiennymi mogą być przeciwciałami monoklonalnymi. Dzięki zastosowaniu metod immunocytochemicznych, przeciwciała służą do precyzyjnej lokalizacji miejsc występowania produktów genu S w tkankach słupka.

(d) Synteza i klonowanie cDNA genu S

Poznanie struktury glikoprotein S umożliwia syntezę cDNA genu S. Gen ten następnie klonuje się w dużej liczbie kopii, które służą do lokalizacji jego ekspresji w słupku oraz do modyfikacji samoniezgodnych roślin.

SAMONIEZGODNOŚĆ SPOROFITYCZNA

W sporofitycznym typie samoniezgodności dowody obecności czynników związanych z mechanizmem rozpoznania pomiędzy męskim gametofitem i słupkiem uzyskano u *Brassica oleracea* [51, 52, 53, 54, 55] i *B. campestris* [36, 70]. Po raz pierwszy wyizolowano i scharakteryzowano glikoproteinę znamienia z roślin o genotypie s_2s_2 [25]. Białko to reguluje kiełkowanie pyłku *in vitro* i modyfikuje zachowanie zgodnego pyłku na powierzchni znamienia. Immunocytochemiczna lokalizacja glikoprotein S wykazała, że są one wydzielane do ściany komórkowej wyrostków znamienia [52]. Stężenie glikoprotein S w znamieniu wzrasta podczas dojrzewania słupka. W znamionach izolowanych z pąków kwiatowych, które nie ujawniają cechy niezgodności, poziom glikoprotein S jest niski. Najwyższe stężenie tych białek występuje na krótko przed i tuż po otwarciu kwiatu, kiedy hamowanie niezgodnych ziaren pyłkowych jest najwyższe.

Obecnie znanych jest dziewięć specyficznych glikoprotein S [19, 29]. Ich masa cząsteczkowa, odpowiadająca poszczególnym genotypom, waha się od 54 do 65 kDa [19, 28, 51]. Każda glikoproteina S ma inny punkt izoelektryczny, co umożliwia odróżnienie ich po elektroforezie w żelu poliakrylamidowym. Zsekwencjonowanie białek S [54, 70] oraz synteza odpowiadającego im cDNA [53] przyczyniły się do poznania struktury genu S oraz produktów

jego ekspresji. Pierwotnym produktem ekspresji genu S, ujawnionym na podstawie analizy nukleotydowej cDNA, jest białko złożone z sekwencji sygnałowej na końcu NH₂ oraz dwu regionów konserwatywnych, które są przedzielone regionem zmiennym [36, 51]. Z porównania sekwencji nukleotydowej w cDNA odcodowanym z poszczególnych glikoprotein S wynika, że aż 90% z nich to sekwencje homologiczne, obecne we wszystkich allelach S [51, 55]. Zatem zróżnicowanie na poszczególne allele dokonało się poprzez zmianę tylko ok. 10% sekwencji nukleotydowych. Porównanie kolejności aminokwasów w różnych glikoproteinach S wykazało, że ok. 80% poszczególnych łańcuchów białkowych składa się z tych samych sekwencji, co świadczy o stosunkowo niewielkim zróżnicowaniu tych białek.

Istnieją dowody, że wyizolowane glikoproteiny S i odpowiadający im cDNA są rzeczywiście odpowiedzialne za reakcję samoniezgodności u roślin. Do samozgodnego gatunku *Nicotiana tabacum* transformowano cDNA kodujący glikoproteiny S₃ i S₂₂ *Brassica oleracea* [49]. Jako wektora użyto *Agrobacterium tumefaciens*. Rezultatem eksperymentu było otrzymanie transgenicznej rośliny, u której pojawiła się cecha samoniezgodności. Ekspresja nabytego przez *N. tabacum* genu ujawniła się w komórkach szlaku transmisyjnego szyjki słupka. U *Brassica oleracea*, mającej sporofityczny typ samoniezgodności, ekspresja genu S występuje w komórkach znamienia. Jego ekspresja w komórkach szlaku transmisyjnego szyjki słupka jest charakterystyczna dla roślin o gametofitycznym typie samoniezgodności. Uaktywnienie się transformowanego genu w szyjce słupka *N. tabacum*, tj. w tym samym miejscu co u pokrewnej samoniezgodnej *N. alata* sugeruje, że geny S odpowiedzialne za obydwa typy samoniezgodności mają podobne regiony promotorowe [21].

Charakterystyka czynników samoniezgodności w ziarnie pyłkowym jest zdecydowanie uboższa aniżeli w znamieniu [29]. Elektroforetyczny rozdział białek z ekstraktów pyłkowych homozygotycznych, samoniezgodnych roślin *Brassica oleracea* ujawnił, że i w tym przypadku pojawiają się specyficzne dla pyłku i danego genotypu prążki. Są to glikoproteiny, których aktywność ujawnia się na kilka godzin przed wpyleniem. Wynika to prawdopodobnie z przeprowadzanej w tym czasie glikozylacji białek, a nie z ich nowej syntezy. Brak jednakże dowodów, że te glikoproteiny są specyficzne dla genu S.

SAMONIEZGODNOŚĆ GAMETOFITYCZNA

Informacje dotyczące genu S i produktów jego ekspresji pochodzą z badań ekstraktów szyjkowych słupka *Nicotiana alata* [2, 3, 11, 18, 38, 39], *Petunia inflata* [1], *P. hybrida* [13, 42], *Lycopersicon peruvianum* [45] i *Papaver rhoeas* [27]. Pozwala to na szersze, bo międzyrodzajowe porównanie różnych białek S i odpowiadających im alleli. Białka S wyizolowane z szyjki słupka gatunków o gametofitycznej samoniezgodności nie są homologiczne do białek S *Brassica* [21]. Wskazuje to, że rozwój obydwu systemów samoniezgodności był monofiletyczny i przebiegał niezależnie od siebie. Białka S związane z gametofitycznym systemem samoniezgodności są to glikoproteiny o masie cząsteczkowej od 28 do 38 kDa [19], są więc lżejsze aniżeli glikoproteiny S *Brassica*. Ich ogólna struktura jest jednakże podobna – na końcu NH₂ znajduje się sekwencja sygnałowa (nieobecna w dojrzałym białku), a dwa regiony konserwatywne oddzielone są regionem zmiennym. Wspólny plan budowy glikoprotein w sporofitycznej i gametofitycznej samoniezgodności, przy braku homologii aminokwasowej pomiędzy nimi, wynika zapewne z podobnego charakteru tych białek. W obydwu przypadkach są to białka ulegające sekrecji, stąd obecność sekwencji sygnałowej. ponadto są wyrazem ekspresji różnych alleli tego samego genu, co wyraża się obecnością części konserwatywnej i zmiennej.

Allele genu S w systemie gametofitycznym są dużo bardziej zróżnicowane aniżeli w systemie sporofitycznym [32]. Pomiedzy siedmioma znanymi allelami S *Nicotiana alata* istnieje tylko 33% homologii w sekwencjach nukleotydowych. Jeszcze mniejsza homologia występuje pomiedzy allelami obecnymi u różnych gatunków. Porównanie sekwencji cDNA otrzymanego z 10 glikoprotein S *Nicotiana alata*, *Petunia inflata* i *Solanum tuberosum* ujawniło, że tylko ok. 23% sekwencji nukleotydowych to sekwencje homologiczne. Ta wysoce konserwatywna część glikoprotein S odgrywa zapewne ważną rolę w ich funkcji podczas reakcji samoniezgodności. Pozostałe części, mniej lub bardziej zmienne, są wyrazem filogenetycznego oddalenia pomiedzy badanymi gatunkami. Sekwencje aminokwasowe na konserwatywnym końcu NH₂ glikoprotein S, pochodzących ze słupka *Petunia hybrida*, *Nicotiana alata* i *Lycopersicon peruvianum*, wykazują obecność 4 całkowicie homologicznych fragmentów zachowywanych we wszystkich badanych białkach [13]. Stanowi to ważki dowód, że są one wyrazem ekspresji różnych alleli tego samego genu.

Jedną z wysoce zmiennych części glikoproteiny S₂ *Nicotiana alata* użyto do produkcji przeciwciał, które następnie posłużyły do immunocytochemicznej lokalizacji endogennych glikoprotein S w słupku [3]. Glikoproteiny S obecne są w wydzielinie szlaku transmisyjnego szyjki słupka oraz w ścianie komórek epidermalnych placenty. Ta sama odkodowana glikoproteina była matrycą do syntezy cDNA. Hybrydyzacja cDNA specyficznego do allelu s₂ z tkankami słupka rośliny o tym samym genotypie wykazała, że ekspresja genu S ujawnia się w komórkach całego szlaku transmisyjnego słupka, tj. w znamieniu i szyjce słupka oraz w komórkach epidermalnych placenty [20]. Produkty jego ekspresji w postaci dojrzałych glikoprotein S są następnie wydzielane do przestrzeni pozakomórkowych, gdzie mogą wejść w kontakt z rosnącymi łagiewkami pyłkowymi.

Szczegółowa analiza sekwencji aminokwasowej glikoprotein S u *Nicotiana alata* ujawniła, że białko to może mieć aktywność enzymu RNA-azy [46]. Wykazano to porównując konserwatywne sekwencje glikoprotein S z sekwencjami RNA-azy wydzielanej przez *Aspergillus oryzae* i *Rhizopus niveus*. Homologia sekwencji wynosi niecałe 50%, jednakże sekwencje regionów konserwatywnych glikoprotein S wskazują na obecność miejsc aktywnych, specyficznych dla RNA-azy. Aktywność RNA-azy związanej z glikoproteinami S wynosi 40–80% ogólnej aktywności tego enzymu w ekstraktach szyjki słupka. Ekstrakty z szyjek samozgodnego gatunku *N. tabacum* mają tylko 1% aktywności ekstraktów *N. alata* [32]. Uważa się, że słupkowe S-specyficzne RNA-azy mogą uczestniczyć w degradacji pyłkowego rRNA i w ten sposób hamować wzrost pyłku [47]. RNA-azowa funkcja glikoprotein S nie jest powszechna. U *Papaver rhoeas* brak jest dowodów, że wyizolowane ze znamienia glikoproteiny S pełnią rolę RNA-azy [26].

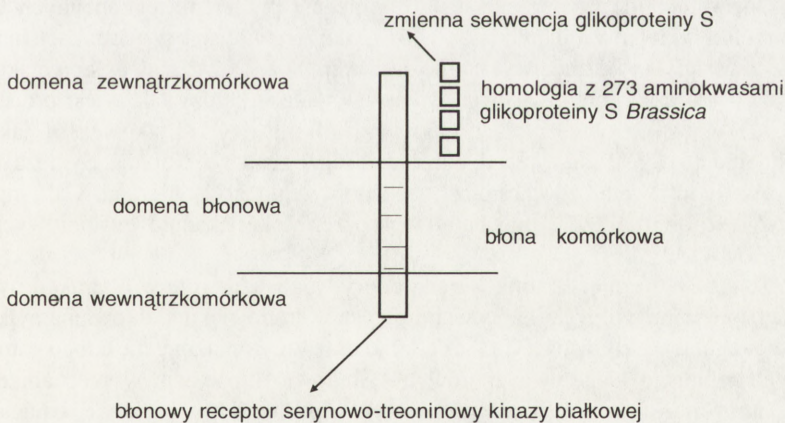
MECHANIZM PRZEPLYWU INFORMACJI

Pomimo zaawansowanych badań nad molekularnym podłożem samoniezgodności, mechanizm przepływu informacji pomiedzy partnerami rozmnażania nie został ostatecznie wyjaśniony. Obecnie uważa się, że transdukcja sygnału jest reakcją typu sygnał-receptor z włączaniem białek S jako receptorów błonowych [17, 27, 29]. Model opracowany na podstawie badań u *Brassica* zakłada, że miejscem występowania receptorów jest pellicula znamienia, natomiast cząsteczki sygnałowe wysyłane są z powierzchni ziarna pyłkowego [29]. Komplex sygnał-receptor odpowiedzialny jest za rozpoznanie pyłku i dalsze zachowanie się partnerów rozmnażania. Rozpoznanie pyłku jako zgodnego uruchamia przepływ wody ze znamienia do

pyłku i następuje kiełkowanie łagiewki pyłkowej. W przypadku rozpoznania pyłku jako niezgodnego procesy te są zaburzone i ostatecznie dochodzi do zatrzymania jego rozwoju. Widocznej odpowiedzi udzielają obydwaj partnerzy – kaloza jest syntetyzowana na wierzchołku łagiewki pyłkowej i w ścianie wyrostka znamienia. Pozostaje zatem pytanie, czy obydwaj partnerzy reagują na ten sam kompleks S + R, jak sądzi Singh i wsp. [69], czy też odpowiednie receptory obecne są również w ziarnie pyłkowym.

Model ten jest wielce prawdopodobny w świetle doniesień o przypuszczalnej receptorowej roli białek S u *Brassica*. Przeprowadzone w 1990 roku badania ujawniły, że glikoproteiny S mogą pełnić funkcję receptorów błonowych [71]. Z komórek *Zea mays* uzyskano cDNA kodujący przypuszczalny błonowy receptor serynowo-treoninowy kinazy białkowej. Receptor ten zbudowany jest z trzech domen: zewnątrzkomórkowej, błonowej i wewnątrzkomórkowej. Porównanie sekwencji aminokwasowej kodowanej przez cDNA *Z. mays* z genowo-specyficzną, zmienną sekwencją glikoproteiny S *Brassica* ujawniło, że aż 273 aminokwasy tego białka są homologiczne z zewnątrzkomórkową domeną badanego receptora kukurydzy (rys. 7).

Nieco inny model, aczkolwiek również oparty na reakcji typu S + R, zaproponowano dla *Papaver rhoeas*, rośliny posiadającej gametofityczny typ samoniezgodności. Rozpoznanie i hamowanie pyłku u tego gatunku odbywa się w znamieniu [27]. W modelu założono, że receptory zlokalizowane są w błonie komórkowej kiełkującego pyłku, zaś źródłem sygnałów są komórki znamienia. Powstanie kompleksu S + R powoduje transdukcję sygnału do łagiewki pyłkowej, gdzie dochodzi do aktywacji Ca^{2+} -zależnych kinaz białkowych. Odpowiedź komórkowa wiąże się ze zmianą wzorca transkrypcji i uruchomieniem syntezy nowego RNA. Syntetyzowane są nowe białka odpowiedzialne za hamowanie wzrostu łagiewek pyłkowych.



Rys. 7. Homologia sekwencji aminokwasowej glikoproteiny S *Brassica* i błonowego receptora serynowo-treoninowego *Zea*

Model ten znajduje potwierdzenie w badaniach biochemicznych. Stwierdzono, że w łagiewce pyłkowej obecna jest Ca^{2+} -zależna kinaza białkowa, która może brać udział w regulacji wzrostu łagiewki pyłkowej [58]. Badanie wzorca transkrypcji i translacji w kiełkujących ziarnach pyłkowych ujawniło ponadto, że po zapyleniu niezgodnym dochodzi do syntezy nowego RNA i nowych białek, które nie występują w zgodnych łagiewkach pyłkowych [27].

UDZIAŁ WAPNIA W INTERAKCJI PYŁEK-SŁUPEK

Badania z ostatnich kilku lat wskazują, że u roślin – podobnie jak u zwierząt – reakcje sygnałowe włączające przepływ informacji i odpowiedź komórkową oparte są na podwyższeniu wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} jako drugiego informatora [12, 44, 59]. Dlatego ważne jest poznanie udziału tych jonów w regulacji kiełkowania pyłku oraz w syntezie kalozy, a więc w procesach, które in vivo związane są z rozpoznaniem i odpowiedzią komórkową w interakcji pyłek-słupek. Udział wapnia w kiełkowaniu pyłku w warunkach in vitro znany jest od dawna. Optymalny poziom tych jonów w pożywce jest niezbędny do normalnego kiełkowania pyłku i wzrostu łagiewki pyłkowej [56]. W prawidłowo kiełkującym ziarnie pyłku tworzy się gradient wapnia, ujawniający się wyższym stężeniem tych jonów w aperturze ziarna pyłkowego [60], a następnie w wierzchołku łagiewki pyłkowej [9]. Efektem zaburzenia gradientu Ca^{2+} jest zatrzymanie wzrostu łagiewek pyłkowych [57].

Recepcja i kiełkowanie pyłku in vivo, tj. na znamieniu, odbywa się w środowisku zawierającym wapń. Przy zastosowaniu metod chlorotetracyklinowej, precypitacyjnej w mikroskopie elektronowym oraz mikroanalizy rtg w mikroskopie skaningowym stwierdzono, że komórki powierzchniowe znamienia oraz pellicula znamion suchych [8, 10] i wydzielina znamion mokrych [5] są miejscem gromadzenia wapnia. Poziom jonów Ca^{2+} w strukturach powierzchniowych znamienia regulowany jest prawdopodobnie przy udziale Ca^{2+} -ATPazy, która obecna jest w plazmolemie komórek epidermalnych znamienia oraz w pelliculi [8, 10]. Podczas kiełkowania pyłku jony Ca^{2+} są pobierane ze środowiska. Proces ten ma miejsce zarówno w warunkach in vitro [4], jak i in vivo [7]. Pobieranie Ca^{2+} odbywa się za pomocą kanałów wapniowych [4]. Zatem egzogeny wapń, którego źródłem jest znamie słupka, współuczestniczy w regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} w kiełkujących ziarnach pyłkowych. Eksperymentalne podwyższenie lub obniżenie pobierania egzogennych Ca^{2+} powoduje zaburzenia w kiełkowaniu pyłku [4]. U *Brassica* zahamowane w warunkach in vivo samoniezgodne ziarna pyłkowe mają wyższy poziom wapnia aniżeli ziarna pyłkowe zgodne [68]. Drugi ważny proces w interakcji pyłek-słupek – synteza kalozy także jest procesem zależnym od Ca^{2+} . Zarówno synteza kalozy na wierzchołku łagiewki pyłkowej [6], jak i w wyrostku znamienia [69] jest zależna od pobierania egzogennej wapnia. Synteza tego polisacharydu jest indukowana w warunkach ponadoptymalnego pobierania Ca^{2+} np. w wyniku działania jonoforem A 23187 oraz hamowana przez blokery kanałów wapniowych [6, 69].

Wyniki tych badań wskazują, że jony wapnia odgrywają ważną rolę w interakcji pyłek-słupek. Regulacja poziomu wolnych jonów wapniowych w środowisku kiełkowania pyłku in vivo (m.in. przez regulację aktywności Ca^{2+} -ATPazy) oraz w cytoplazmie męskiego gametofitu (m.in. przez regulację kanałów wapniowych) stanowić może ważny mechanizm w promocji lub hamowaniu rozwoju ziaren pyłkowych. Zgodne ziarna pyłkowe, osiągające optymalny wewnątrzkomórkowy poziom wapnia mogą kiełkować i wyrastać w łagiewkę pyłkową. Natomiast wzrost niezgodnych ulega zahamowaniu poprzez podwyższenie pobierania Ca^{2+} ze słupka. Konsekwencją ponadoptymalnego poziomu Ca^{2+} w cytoplazmie jest indukcja syntezy kalozy na wierzchołku łagiewki pyłkowej, czyli odpowiedź kalozowa.

INTERAKCJA ŁĄGIEWKA PYŁKOWA I WORECZEK ZAŁĄŻKOWY

Komórką docelową dla zgodnej łągiewki pyłkowej jest najczęściej jedna z synergid aparatu jajowego [37]. Rosnące w słupku łągiewki pyłkowe wybierają tę jedną komórkę z wielu innych komórek załączka. Od dawna wiadomo, że synergidy wydzielają bliżej niezidentyfikowane substancje chemotropowe, które kontrolują kierunek wzrostu łągiewki pyłkowej w ostatniej fazie jej wzrostu [41]. Z drugiej strony obecność łągiewek pyłkowych w szlaku transmisyjnym słupka indukuje szereg zmian ultrastrukturalnych w komórkach aparatu jajowego, szczególnie w synergidach [23, 43]. Wskazuje to, że gametofit męski jest źródłem sygnałów odbieranych przez te komórki. U większości badanych gatunków [33, 35, 65, 72] sygnał generowany przez łągiewkę pyłkową dociera do synergidy, zanim komórki te wejdą w bezpośredni kontakt fizyczny. Odpowiedzią na sygnał jest reorganizacja cytoplazmy jednej z synergid, ujawniająca się postępującym procesem jej degeneracji. Która z pary synergid odpowie na sygnał wysyłany przez łągiewkę pyłkową wydaje się być przypadkowe. U *Nicotiana tabacum* degenerowało tyle samo "prawych" co i "lewych" synergid [35]. Komórką docelową dla łągiewki pyłkowej jest degenerująca synergida. Zatem zmiany w tej komórce należy traktować jako jej przygotowanie do przyjęcia łągiewki pyłkowej. Transformacje te wydają się być efektem przepływu informacji pomiędzy łągiewką pyłkową a jej komórką docelową, tj. synergidą.

Udział jonów wapnia. W niezapylnych, dojrzałych załączkach najwyższy poziom wapnia, mierzony metodą mikroanalizy rtg, występuje w części mikropylarnej woreczka załączkowego [15]. Badania w mikroskopie elektronowym przy użyciu metod precypitacyjnych ujawniły, że nagromadzenie jonów Ca^{2+} występuje na mikropylarnym wierzchołku synergid [16]. Po zapyleniu poziom wapnia, badany metodą chlorotetracyklinową, wzrasta w synergidzie, która rozpoczyna proces degeneracji, a więc w komórce, która odpowiada na sygnał łągiewki pyłkowej [35]. Wyniki tych badań dyskutowane są w odniesieniu do udziału Ca^{2+} w ukierunkowaniu wzrostu łągiewki pyłkowej do mikropyle załączka, a następnie do docelowej synergidy. Podwyższony poziom wapnia w docelowej synergidzie może stanowić mechanizm powodujący pęknięcie wierzchołka łągiewki pyłkowej i uwolnienie komórek plemnikowych [35].

INTERAKCJA GAMETY MĘSKIE – KOMÓRKA JAJOWA I KOMÓRKA CENTRALNA

Komórki plemnikowe roślin kwiatowych mają genetycznie zaprogramowaną predeterminację w kierunku fuzji z komórką jajową lub komórką centralną [62, 63]. U szeregu roślin są one heteromorficzne. Ujawnia się to w przypadku **heterospermii cytoplazmatycznej** – różną wielkością i odmiennym wyposażeniem w organelle cytoplazmatyczne siostrzanych komórek plemnikowych, zaś w przypadku **heterospermii jądrowej** – zmianami w chromatinie [22, 63, 64]. Nawet w przypadku gdy powstałe po podziale komórki generatywnej siostrzane komórki plemnikowe są identyczne, często dochodzi do ich zróżnicowania przed zapłodnieniem np. poprzez rozpad jednej z komórek plemnikowych na część jądrową i cytoplazmatyczną [65]. Prześledzenie losu komórek plemnikowych podczas zapłodnienia

wykazało, że zawsze ta sama morfologicznie komórka plemnikowa ulega fuzji ze swą komórką docelową [63, 65].

Określona wcześniej predeterminacja komórek plemnikowych w kierunku zapłodnienia wymaga obecności mechanizmów rozpoznania pomiędzy nimi i ich komórkami docelowymi. Tuż przed plazmogamią obydwie komórki plemnikowe znajdują się w przestrzeni pomiędzy komórką jajową i centralną [62]. Zatem obydwie mają taką samą możliwość fuzji z komórkami żeńskiego gametofitu. Jednakże każda z gamet męskich odnajduje swoją komórkę docelową i zapłodnienie jest ukierunkowane. Uważa się, że rozpoznanie na poziomie gamet jest reakcją typu sygnał-receptor [30]. Komplementarne składniki konieczne do tej reakcji obecne są w komórkach plemnikowych oraz w komórce jajowej i centralnej. Fizyczny kontakt pomiędzy gametami męskimi a obydwoma komórkami docelowymi przed zapłodnieniem wskazuje, że do rozpoznania dochodzi na poziomie powierzchni komórkowych. Czynniki rozpoznania nie są do tej pory zidentyfikowane. Teoretycznie przyjmuje się [30], że są one:

- specyficzne dla gamet,
- integralnie związane z powierzchnią gamet,
- wystarczające do rozpoznania każdej innej komórki aniżeli własna komórka docelowa.

Wprowadzone w ostatnich latach metody izolacji żywych komórek plemnikowych [48] oraz komórek aparatu jajowego i ich protoplastów [34, 50] pozwolą zapewne poznać budowę i funkcję błon komórkowych gamet roślin kwiatowych. Będzie to klucz do poznania czynników rozpoznania i mechanizmu przepływu informacji na poziomie gamet.

LITERATURA

- [1] AI Y, SINGH A, COLEMAN CE, IOERGER TR, KHEYER-POUR A, KAO T-H. Self-incompatibility in *Petunia inflata*: Isolation and characterisation of cDNAs encoding three S-allele-associated proteins. *Sex Plant Repr* 1990; **3**: 130–138.
- [2] ANDERSON MA, CORNISH EC, MAU S-L, WILLIAMS EG. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 1986; **321**: 38–44.
- [3] ANDERSON MA, McFADDEN GI, BERNATZKY R, ATKINSON A, ORPIN T, DEDMAN H, TREGEAR G, FERNLEY R, CLARKE AE. Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* 1989; **1**: 483–491.
- [4] BEDNARSKA E. The effect of exogenous Ca^{2+} ions on pollen grain germination and pollen tube growth - investigations with the use of $^{45}Ca^{2+}$ and Verapamil, La^{3+} and ruthenium red. *Sex Plant Repr* 1989a; **2**: 53–58.
- [5] BEDNARSKA E. Localization of calcium on the surface of stigma in *Ruscus aculeatus* L. - studies by the chlorotetracycline and X-ray microanalysis. *Planta* 1989b; **179**: 11–16.
- [6] BEDNARSKA E. The effect of intracellular calcium level regulators on the synthesis of pollen tube callose in *Oenothera biennis* L. *Acta Soc Bot Pol* 1989c; **58**: 199–210.
- [7] BEDNARSKA E. Calcium uptake from the stigma by germinating pollen in *Primula officinalis* L. and *Ruscus aculeatus* L. *Sex Plant Repr* 1991; **4**: 36–38.
- [8] BEDNARSKA E. Localization of Ca^{2+} and Ca^{2+} -ATPase on wet (*Ruscus aculeatus*) and dry (*Primula officinalis*) stigma surface. *Acta Soc Bot Pol* 1992; **60**: w druku.
- [9] BEDNARSKA E, TRETYN A, GÓRSKA-BRYLASS A. Localization of Ca^{2+} and peroxidase activity in zone of callose synthesis in *Haemanthus albiflos* L. pollen tube. *Acta Physiol Plant* 1988; **10**: 237–241.
- [10] BEDNARSKA E, KARBOWSKA A. Localization of Ca^{2+} and Ca -ATPase in papillae of maturing stigma in *Pharbitis nil* L. *Phytomorphology* 1990; **40**: w druku.
- [11] BERNATZKY R, MAU S-L, CLARKE AE. A nuclear sequence associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca* has homology with mitochondrial DNA. *Theor Appl Genet* 1989; **77**: 320–324.
- [12] BOSS WF. Phosphoinositide metabolism: Its relation to signal transduction in plants. [In:] *Second Messenger in Plant Growth and Development*, Liss AR ed. Inc. 1989: 29–56.

- [13] BROOthaerts WJ, van LAERE A, WITTERS R, PREAUX G, DECOCK B, van DAMME J, VENDING JC. Purification and N-terminal sequencing of style glycoproteins associated with self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *Plant Mol Biol* 1990; **14**: 93–102.
- [14] CHARLESWORTH D. Evolution of homomorphic sporophytic self-incompatibility. *Heredity* 1988; **60**: 445–453.
- [15] CHAUBAL R, REGER BJ. Relatively high calcium is localized in synergid cells of wheat ovaries. *Sex Plant Repr* 1990; **3**: 98–102.
- [16] CHAUBAL R, REGER BJ. Calcium in the synergid cells and other regions of pearl millet ovaries. *Sex Plant Repr* 1992; **5**: 34–46.
- [17] CLARKE AE, ANDERSON MA, BACIC A, HARRIS PJ, MAU SL. Molecular basis of cell recognition during fertilization in higher plants. *J Cell Sci Suppl* 1986; **2**: 261–285.
- [18] CLARKE AE, ANDERSON MA, ATKINSON A, BACIC A, EBERT PR, JAHNEN W, LUSH WM, MAU S-L, WOODWARD JR. Recent developments in the molecular genetics and biology of self-incompatibility. *Plant Mol Biol* 1989; **13**: 267–271.
- [19] CLARKE AE, McCLURE BA, HARING V. Self-incompatibility: An example of cellular interaction in flowering plants. In *Cell to Cell Interaction*, Burger MM, Sordat B, Zinkernagel RM [eds], Basel, Karger 1990: 188–200.
- [20] CORNISH EC, PETTITT JM, BONING I, CLARKE AE. Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 1987; **326**: 99–102.
- [21] CORNISH EC, ANDERSON MA, CLARKE AE. Molecular aspects of fertilization in flowering plants. *Ann Rev Cell Biol* 1988; **4**: 209–228.
- [22] DUMAS C, KNOX RB, GAUDE T. The spatial association of the sperm cells and vegetative nucleus in the pollen grain *Brassica*. *Protoplasma* 1985; **124**: 168–174.
- [23] DUTE RR, PETERSON CM, RUSHING AE. Ultrastructural changes of the egg apparatus associated with fertilization and proembryo development of soybean, *Glycine max*. *Ann Bot* 1989; **64**: 123–135.
- [24] EBERT PR, ANDERSON MA, BERNATZKY R, ALTSCHULER M, CLARKE AE. Genetic polymorphism of self-incompatibility in flowering plants. *Cell* 1989; **56**: 255–262.
- [25] FERRARI TE, BRUNS D, WALLACE DH. Isolation of plant glycoprotein involved with control of intercellular recognition. *Plant Physiol* 1981; **67**: 275–296.
- [26] FRANKLIN-TONG VE, ATWALL KK, HOWEL EC, LAWRENCE MJ, FRANKLIN FCH. Self-incompatibility in *Papaver rhoeas* L.: There is no evidence for the involvement of stigmatic ribonuclease activity. *Plant Cell Environ* 1991; **14**: 423–429.
- [27] FRANKLIN-TONG VE, FRANKLIN FCH. Gametophytic self-incompatibility in *Papaver rhoeas*. *Sex Plant Repr* 1992; **5**: 1–7.
- [28] GAUDE T, DUMAS C. Organization of stigma surface components in *Brassica oleracea*: a cytochemical study. *J Cell Sci* 1986; **82**: 203–216.
- [29] GAUDE T, DUMAS C. Molecular and cellular events of self-incompatibility. *Int Rev Cytol* 1987; **107**: 333–366.
- [30] GELTZ NR, RUSSELL SD. Two-dimensional electrophoretic studies of the proteins and polypeptides in mature pollen grain and the male germ unit of *Plumbago zeylanica*. *Plant Physiol* 1988; **88**: 764–769.
- [31] GIBBS P. Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibility system have the same sporophytic mechanism? *Plant Syst Evol* 1986; **154**: 285–323.
- [32] HARING V, GRAY JE, McCLURE NA, ANDERSON MA, CLARKE AE. Self-incompatibility: A self-recognition system in plants. *Science* 1990; **250**: 937–941.
- [33] HAUSE G, SCHROEDER MB. Reproduction in *Triticale*. I. The structure of the mature embryo sac. *Biol Zentralbl* 1986; **105**: 511–517.
- [34] HUANG BQ, RUSSELL SD. Isolation of fixed and viable eggs, central cells, and embryo sacs from ovules of *Plumbago zeylanica*. *Plant Physiol* 1989; **90**: 9–12.
- [35] HUANG BQ, RUSSELL SD. Synergid degeneration in *Nicotiana*: A quantitative, fluorochromatic and chlorotetracycline study. *Sex Plant Repr* 1992; w druku.
- [36] ISOGAI A, TAKAYAMA S, TSUKAMOTO C, UEDA Y, SHIOZAWA H, HINATA K, OKAZAKI K, SUZUKI A. S-locus-specific glycoproteins associated with self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Plant Cell Physiol* 1987; **28**: 1279–1291.
- [37] JENSEN WA, ASHTON ME, BEASLEY CA. Pollen tube-embryo sac interaction in cotton. [In:] *Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding*. Mulcahy DL, Ottaviano E [eds] Elsevier Biomedical, New York 1983: 67–72.
- [38] JAHNEN W, BATTERHAM MP, CLARKE AE, MORITZ RL, SIMPSON RJ. Identification, isolation and N-terminal sequencing of style glycoproteins associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* 1989; **1**: 493–499.

- [39] JAHNEN W, LUSH WM, CLARKE AE. Inhibition of in vitro pollen tube growth by isolated S-glycoproteins of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* 1989; **1**: 501–510.
- [40] KERHOAS C, KNOX RB, DUMAS C. Specificity of the callose response in stigmas of *Brassica*. *Ann Bot* 1983; **52**: 597–602.
- [41] KNOX RB. Pollen-pistil interaction. In Cellular Interactions. Linskens HF, Heslop-Harrison J [eds], Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1984: 508–608.
- [42] KAMBOJ RK, JACKSON JF. Self-incompatibility alleles control a low molecular weight, basic protein in pistils of *Petunia hybrida*. *Theor Appl Genet* 1986; **71**: 815–819.
- [43] KUROIWA H. Ultrastructural examination of embryogenesis in *Crepis capillaris* (L.) Wallr. 1. The synergid before and after pollination. *Bot Mag Tokyo* 1989; **102**: 9–24.
- [44] MARMÉ D. The role of calcium and calmodulin in signal transduction. In Second Messengers in Plant Growth and Development. Liss AR [ed.] Inc. 1989: 57–80.
- [45] MAU S-L, WILLIAMS EG, ATKINSON A, ANDERSON MA, CORNISH EC, GREGO B, SIMPSON RJ, KHEYER-POUR A, CLARKE AE. Style proteins of a wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*) associated with expression of self-incompatibility. *Planta* 1986; **169**: 184–191.
- [46] McCLURE BA, HARING V, EBERT PR, ANDERSON MA, SIMPSON RJ, SAKIYAMA F, CLARKE AE. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 1989; **342**: 955–957.
- [47] McCLURE BA, GRAY JE, ANDERSON MA, CLARKE AE. Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degeneration of pollen rRNA. *Nature* 1990; **347**: 757–776.
- [48] MOGENSTEIN HL, WAGNER VT, DUMAS C. Quantitative, three-dimensional ultrastructure of isolated corn (*Zea mays*) sperm cells. *Protoplasma* 1990; **153**: 136–140.
- [49] MOORE HM, NASRALLAH JB. A *Brassica* self-incompatibility gene is expressed in the stylar transmitting tissue of transgenic tobacco. *Plant Cell* 1990; **2**: 29–38.
- [50] MÓL R. Isolation of protoplasts from female gametophytes of *Torenia fournieri*. *Plant Cell Reports* 1986; **3**: 202–206.
- [51] NASRALLAH JB, NASRALLAH ME. The molecular genetics of self-incompatibility in *Brassica*. *Annu Rev Genet* 1989; **23**: 121–139.
- [52] NASRALLAH JB, DONEY RC, NASRALLAH ME. Biosynthesis of glycoproteins involved in the pollen-stigma interaction of incompatibility in developing flowers of *Brassica oleracea* L. *Planta* 1985a; **165**: 100–107.
- [53] NASRALLAH JB, KAO TH, GOLDBERG ML, NASRALLAH ME. cDNA clone encoding an S-locus – specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. *Nature* 1985b; **318**: 263–267.
- [54] NASRALLAH JB, KAO TH, CHEN CH, GOLDBERG ML, NASRALLAH ME. Amino-acid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of the S locus of *Brassica oleracea*. *Nature* 1987; **326**: 617–619.
- [55] NASRALLAH JB, YU S-M, NASRALLAH ME. Self-incompatibility genes of *Brassica oleracea*: Expression, isolation, and structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5551–5555.
- [56] PICTON JM, STEER MW. Evidence for the role of Ca^{2+} ions in tip extension in pollen tubes. *Protoplasma* 1983; **115**: 11–17.
- [57] PICTON J, STEER MW. The effects of ruthenium red, lanthanum, fluorescein isothiocyanate and trifluoroperazine on vesicle fusion and tip extension in pollen tubes. *Planta* 1985; **164**: 20–26.
- [58] POLYA GM, MICCUCI V, RAE AL, HARRIS PJ, CLARKE AE. Ca^{2+} -dependent protein phosphorylation in germinated pollen of *Nicotiana glauca*, an ornamental tobacco. *Physiol Plant* 1986; **67**: 151–157.
- [59] POOVAIAH BW, REDDY ASN. Calcium messenger system in plants. *CRC Critical Reviews in Plant Science* 1987; **6**: 47–103.
- [60] REISS HD, HERTH W. Development of membrane and calcium gradients during pollen germination of *Lilium longiflorum*. *Planta* 1985; **162**: 33–39.
- [61] ROBERTS IN, HARROD G, DICKINSON H. Pollen-stigma interaction in *Brassica oleracea* I. Ultrastructure and physiology of the stigmatic papilla cells. *J Cell Sci* 1984; **66**: 241–253.
- [62] RUSSELL SD. Fertilization in *Plumbago zeylanica*: gametic fusion and fate of the male cytoplasm. *Amer J Bot* 1983; **70**: 416–434.
- [63] RUSSELL SD. Preferential fertilization in *Plumbago*: Ultrastructural evidence for gamete-level recognition in an angiosperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 6129–6132.
- [64] RUSSELL SD, CASS DD. Ultrastructure of the sperms of *Plumbago zeylanica*. 1. Cytology and association with the vegetative nucleus. *Protoplasma* 1981; **104**: 85–107.
- [65] RUSSELL SD, ROUGIER M, DUMAS C. Organization of the early post-fertilization megagametophyte of *Populus deltoides*: Ultrastructure and implications for male cytoplasmic transmission. *Protoplasma* 1990; **155**: 153–165.

- [66] SCHOU O. The dry and wet stigmas of *Primula obconica*. Ultrastructural and cytochemical dimorphism. *Protoplasma* 1984; **121**: 99–113.
- [67] SCHOU O, MATTSSON . Differential localization of enzymes in the stigmatic exudates of *Primula obconica*. *Protoplasma* 1985; **125**: 65–74.
- [68] SINGH A, PERDUE T, PAOLILLO DJ Jr. Pollen-pistil interactions in *Brassica oleracea*. Cell calcium in self and cross grain. *Protoplasma* 1989; **151**: 57–61.
- [69] SINGH A, PAOLILLO DJ Jr. Role of calcium in the callose response of self-pollinated *Brassica* stigmas. *Amer J Bot* 1990; **77**: 28–133.
- [70] TAKAYAMA S, ISOGAI A, TSUKAMOTO C, VEDA Y, HINATA K, OKAZKI K, SUZUKI A. Sequences of S-glikoproteins, products of the *Brassica campestris* self-incompatibility locus. *Nature* 1987; **326**: 102–105.
- [71] WALKER JC, ZHANG R. Relationship of putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature* 1990; **345**: 743–746.
- [72] YAN H, YANG HY, JENSEN WA. Ultrastructure of the developing embryo sac of sunflower (*Helianthus annuus*) before and after fertilization. *Can J Bot* 1991; **69**: 191–202.

Otrzymano: 21.04.1992 r.

Przyjęto: 26.05.1992 r.

Adres autora: 87-100 Toruń, ul. Gagarina 9

POWSTAWANIE I ZNACZENIE UNIPARENTALNEJ DISOMII

FORMATION AND SIGNIFICANCE OF UNIPARENTAL DISOMY

Oliver BARTSCH^{*}, Henryk HÜBNER^{**} i Anna MORDALSKA^{**}

^{*} Instytut Genetyki Człowieka Uniwersytetu Medycznego w Lubecie,

^{**} Zakład Biologii i Genetyki Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi

Streszczenie. W pracy przedstawiono problem uniparentalnej disomii u człowieka, występującej w dwóch formach: uniparentalnej heterodisomii i uniparentalnej izodisomii. Uniparentalna disomia – obecność u diploidalnego potomstwa pary chromosomów pochodzącej tylko od jednego rodzica jest najprawdopodobniej konsekwencją wysokiego współczynnika gametalnej aneuploidii. Omówiono fenotypowe następstwa uniparentalnej disomii, także w aspekcie genomowego *imprintingu*.

Słowa kluczowe: uniparentalna disomia, genomowy *imprinting*

Summary. Problem of human uniparental disomy which occurs in two forms: uniparental heterodisomy and uniparental isodisomy is presented. Uniparental disomy – the presence of chromosome pair from the one parent only in diploid offspring – is probably consequence of the high ratio of gamete aneuploidy. Phenotype consequences of uniparental disomy are showed, also in the aspect of genome imprinting.

Key words: uniparental disomy, genome imprinting

Wykaz stosowanych skrótów: UPD – uniparentalna disomia (*uniparental disomy*), UPHD – uniparentalna heterodisomia (*uniparental heterodisomy*), UPID – uniparentalna izodisomia (*uniparental isodisomy*), PWS – zespół Pradera-Williego (*Prader-Willi syndrome*), AS – zespół Angelmana (*Angelman syndrome*).

WPROWADZENIE

Problem uniparentalnej disomii (UPD) somatycznych chromosomów człowieka, czyli pochodzenie obu autosomów danej pary od jednego z rodziców, po raz pierwszy teoretycznie przedstawiony został przez Engla [11]. Wyjściowym punktem dla tej nowej genetycznej koncepcji były wyniki przeprowadzonych w latach siedemdziesiątych cytogenetycznych badań płodów poronionych [2, 8, 16, 23]. U człowieka co najmniej każda piąta ciąża kończy

się spontanicznym poronieniem, a u co drugiego płodu spontanicznie poronionego można stwierdzić anomalię chromosomową [11]. Z tego wynika, że ok. 10% wszystkich zapłodnionych komórek jajowych ma nieprawidłowy kariotyp. Wśród tych anomalii dość często występują triploidie i tetraploidie, ale najczęściej występują aneuploidie [2, 8, 13, 16, 23]. Nawet przy najostrożniejszym oszacowaniu należy przyjąć, że u co najmniej 5% wszystkich zygot występuje jedna z pięciu najczęstszych aneuploidii, którymi są monosomia X i trisomie chromosomów nr 15, 16, 21 i 22. Możliwe, że ginie jeszcze więcej zygot, lecz jest to trudne do udowodnienia, bowiem bardzo wczesne poronienia nie są przeważnie zauważane. Prawdopodobnie aneuploidia wśród zygot człowieka występuje jeszcze częściej, niż to powyżej przedstawiono.

Powstawanie aneuploidalnych zygot jest oczywiste: w przypadku monosomii jedna z gamet nie miała danego chromosomu, natomiast w przypadku trisomii jedna z gamet miała dwa chromosomy. Engel [11] przeprowadził obliczenia, z których wynika, że wprawdzie rzadko, ale jednak z częstością statystycznie istotną zdarza się, że nullisomiczna gameta łączy się z gametą disomiczną. Dwa błędy, powstałe po jednym w czasie oogenezy i spermatogenezy, znoszą się wzajemnie. Zygota ma 46 chromosomów, po 2 chromosomy w każdej parze, jednakże jedna z par chromosomów pochodzi tylko od jednego z rodziców, czyli powstała UPD.

Występują dwie różne formy UPD:

(1) Jeżeli dwa różne homologi pochodzą od jednego rodzica, to powstaje uniparentalna heterodisomia (UPHD).

(2) Jeżeli ten sam homolog występuje dwukrotnie, to powstaje uniparentalna izodisomia (UPID).

Powyższe formy są konsekwencją zaburzeń mejozy, a mianowicie: jeżeli nondysjunkcja miała miejsce w I podziale mejotycznym, to występuje UPHD, jeżeli w drugim – to UPID.

POWSTAWANIE UNIPARENTALNEJ DISOMII

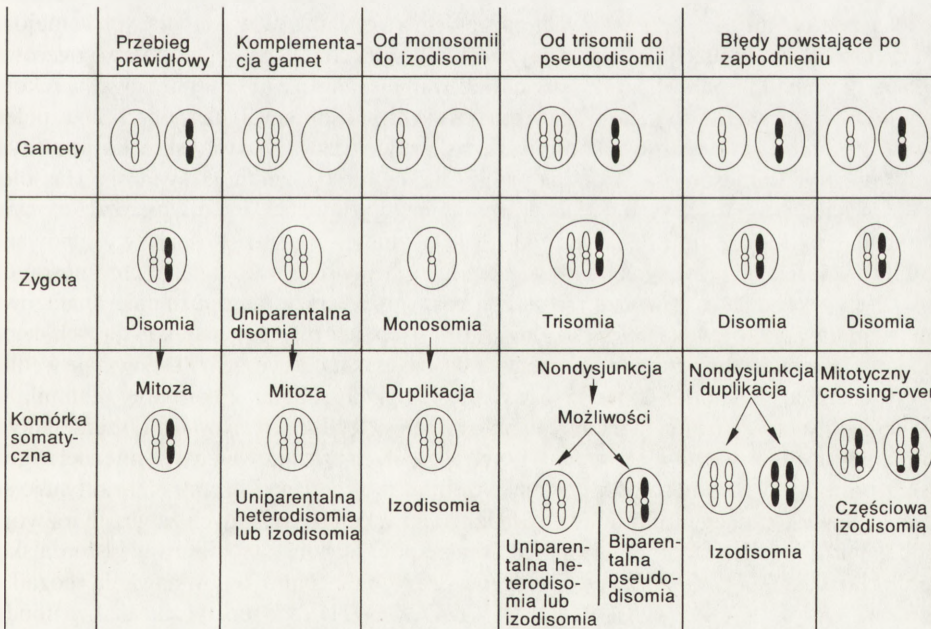
Częstość występowania zygot z UPD obliczono na 3 : 10 000 [11], jednakże obliczenia te mogą być nieprawdziwe, bowiem nie uwzględniają fizjologicznych różnic pomiędzy komórką jajową a plemnikiem. W przypadku aneuploidalnych plemników dochodzi z reguły do tzw. zahamowania plemników (*spermatogenic arrest*), bowiem nieprawidłowe plemniki podlegają szczególnej selekcji i nie są zdolne do zapłodnienia [19]. U wielu mężczyzn ze zrównoważoną translokacją chromosomową i u większości mężczyzn z aneuploidią można stwierdzić występowanie reguły, według której zahamowanie plemników występuje wtedy, kiedy w stadium pachytenu tworzy się zamiast figury pierścieniowej łańcuch zbudowany z chromosomów, a wolne końce tego łańcucha łączą się z bivalentem X–Y [20, 21]. Z powyższych powodów Warburton [65] oblicza, że UPD występuje z częstością 1 : 30 000.

Przedstawiony przez Engla [11] mechanizm powstawania UPD jest następujący: nullisomiczna gameta z brakiem określonego chromosomu łączy się z gametą disomiczną tego samego chromosomu i w konsekwencji w zygocie wszystkie chromosomy występują w parach.

Rozwój techniki badania chromosomów komórek rozrodczych umożliwił przeprowadzenie analizy kariotypów ludzkich plemników i komórek jajowych. Pellestor [42] przedstawił

wyniki badania 13 000 kariotypów plemnikowych i 1 800 kariotypów oocytarnych. Te obszerne dane pozwalają na ustalenie ogólnych cech i rozkładu aneuploidii w ludzkich gametach. Cechą zaburzeń mejozy w procesie spermatogenezy jest częste występowanie hipoploidii, a występowanie aneuploidii jest równomiernie rozłożone pomiędzy chromosomy wszystkich grup. Zaburzenia mejozy w oogenezie powodują jednakowo częste występowanie hipoploidii i hiperploidii. Nondysjunkcja występuje jednak przede wszystkim w grupach D i G, co dowodzi, że nondysjunkcja akrocentryków nie jest przypadkowym wydarzeniem.

Częstość powstawania disomicznych gamet męskich i żeńskich jest jednakowa, jednak aneuploidalne plemniki z powodu zahamowania ruchu plemników rzadko zapładniają komórki jajowe. Za powyższą tezę przemawiają ostatnie wyniki badań nad pochodzeniem dodatkowego chromosomu w trisomii 21. Obecnie przyjmuje się, że 95% wszystkich przypadków trisomii 21 jest następstwem disomii komórki jajowej, czyli nondysjunkcji w podziale mejozycznym u matki, a jedynie 5% jest następstwem disomicznego plemnika, czyli nondysjunkcji u ojca [46]. Zjawisko nondysjunkcji chromosomu 21 częściej występuje w pierwszym podziale mejozycznym (77% u kobiet i 78% u mężczyzn) niż w drugim (23% u kobiet i 22% u mężczyzn) [14, 32, 46]. Wyniki te odzwierciedlają jednak stan występujący u dzieci z trisomią 21, a nie stan występujący w gametach będących bezpośrednim produktem mejozy. Rysunek 1 przedstawia dotychczas poznane możliwości powstawania UPD.



Rys. 1. Różne możliwe sposoby powstawania uniparentalnej disomii

Jest oczywiste, że jeżeli nierozdzielone chromosomy przechodziły proces crossing-over, to wówczas izodisomia jest częściową heterodisomią lub heterodisomia jest częściową izodisomią. Spence i wsp. [56] uważają, że w wyniku mitotycznej nondysjunkcji trisomicznych

gamet może dojść do biparentalnej pseudodisomii. Pseudodisomia nie jest stanem prawidłowym, jakby się mogło wydawać, bowiem dla prawidłowego rozwoju zygoty ważne jest, aby jeden z chromosomów homologicznej pary pochodził z plemnika, a drugi z komórki jajowej, bowiem różnie wydają się przebiegać procesy metylacji DNA w mikro- i w makrogametach ssaków i powiązane z tym następstwa [49, 58, 60].

Zjawisko UPD wyjaśnia również niektóre obserwacje cytogenetyczne. Już w 1980 r. [25, 41] można było doświadczalnie potwierdzić występowanie UPD. Obserwowano przekazanie robertsonowskiej zrównoważonej translokacji 22/22 od matki do córki, u której była ona również zrównoważona. Należy przyjąć, że komórka jajowa zawierała tę translokację, natomiast plemnik nie miał chromosomu 22 lub jeżeli go miał, to został on utracony w czasie pierwszych podziałów brudzkowania. W 1982 r. [6] opisano pericentryczną inwersję chromosomu nr 4, która w stanie homozygotycznym występowała u umyślowo niedorozwiniętego dziecka. Ten sam chromosom w stanie heterozygotycznym występował tylko u matki.

Trzeba jednak stwierdzić, że mechanizmy prowadzące do aneuploidalnych gamet nie są dobrze poznane. Ze względu na najczęstsze występowanie nondysjunkcji w mejozie I bierze się pod uwagę poniższe zjawiska mogące prowadzić do aneuploidii:

(a) niepowodzenie koniugacji chromosomów homologicznych i/lub brak chiazm,

(b) desynapsis powodujący przedwczesne rozdzielenie się skoniugowanych chromosomów,

(c) nerozejście się skoniugowanych chromosomów na skutek opóźnionego desynapsis.

Do tej pory udało się przeanalizować znaczenie paru czynników występujących w mejozie I. Ograniczona rekombinacja jako przyczyna mejotycznej nondysjunkcji została zasugerowana przez Warrena i wsp. [66], którzy stwierdzili zmniejszoną częstość występowania rekombinantów w odniesieniu do genów sprzężonych z chromosomem 21 u chorych z zespołem Downa. Zmniejszona częstość rekombinacji wskazuje raczej na asynapsis jako przyczynę nondysjunkcji chromosomów 21 niż na przedwczesne lub opóźnione desynapsis. Hassold i wsp. [15] badali częstość występowania rekombinacji pomiędzy dwoma nierozdzielonymi chromosomami 13 w zespole Patau i na podstawie niezmniejszonej częstości jej występowania wysunęli wniosek, że przyczyną nondysjunkcji nie są trudności w koniugacji chromosomów nr 13. Niektóre badania dowodzą, że ważną rolę może odgrywać opóźnienie anafazowe. Prabhakara i wsp. [46] wykazali, że to zjawisko występuje częściej u matek mających dzieci z trisomią 21 niż u matek zdrowego potomstwa. Jest jednak możliwe, że UPD powstaje według innego schematu. Komórka jajowa z disomią jest zapładniana przez normalny plemnik, co powoduje powstanie trisomii. Trisomie bardzo często są letalne, co prowadzi do samoistnych poronień. Jest jednak możliwe, że w pierwszych podziałach brudzkowania trisomicznej zygoty jeden z potrójnych chromosomów zostaje wyeliminowany, dzięki czemu embrión staje się witalny, ale występująca w nim UPD prowadzi do powstania określonych zaburzeń rozwojowych. Na taką możliwość powstawania UPD w zespole Downa zwrócili uwagę Mordalska i wsp. [37] badając na podstawie cech cytogenetycznych mechanizm powstawania mozaikowych kariotypów 46,XX/47,XX,+ 21 lub 46,XY/47,XY+ 21. Cytogenetyczna analiza nondysjunkcji jest obciążona błędem, który wg Petersena i wsp. [44] wynosi ok. 12%. Postulowaną przez Mordalską i wsp. [37] możliwość powstawania UPD w zespole Downa potwierdzili Petersen i wsp. [44] przy użyciu technik molekularnych. Pojawia się nowy cytogenetyczny aspekt zespołu Downa, bowiem trisomia 21 może być diizotrisomią lub heterotrisomią. W zespole Downa z kariotypem mozaikowym, w którym obserwuje się stopniową eliminację komórek trisomicznych, prawdopodobne jest występowanie diizotrisomii [37].

FENOTYPOWE NASTĘPSTWA IZODISOMII

Występowanie UPHD i UPID pociąga za sobą określone konsekwencje genetyczne. Już w 1980 r. Engel [11] wskazywał, że UPD wyjaśnia przypadki dziedziczenia, które nie są zgodne z prawami Mendla. Zdarza się czasami, że przy całkowicie prawidłowym kariotypie, X-recesywna choroba (cecha sprzężona z płcią) jest przenoszona z ojca na syna, a nie na córkę – nosicielkę. Zjawisko to można wytłumaczyć tym, że chromosomy X i Y zygoty pochodziły od ojca, a komórka jajowa nie miała chromosomu płci. Wszystkie możliwe zygoty powstające w wyniku nierozdzielenia się chromosomów X i Y przedstawia rysunek 2.

Jest oczywiste, że UPID może prowadzić do ujawnienia się cech (chorób) autosomalnie recesywnych, u potomstwa rodziców, z których tylko jeden jest heterozygotą. Spence i wsp. [56] opisali dziewczynkę ze zwłóknieniem torbielowatym oraz niskim wzrostem spowodowanym niedoborem hormonu wzrostu. Wykazano, że oba chromosomy 7 (w tym chromosomie znajduje się locus genu zwłóknienia torbielowatego) tej pacjentki pochodziły od matki. Znane są nieliczne przypadki ujawnienia się homozygot recesywnych w wyniku uniparentalnej izodisomii. Warburton [65] obliczyła, że UPID jest jednak rzadkim powodem ujawniania się homozygot recesywnych, zdarza się to nie częściej niż 1 : 10 000 przypadków danej genopatii.

PLEMNIKI

	O	X	Y	\widehat{XY}	\underline{XX}	\underline{YY}
KOMÓRKI JAJOWE	O	OX	OY	O\widehat{XY}	O\underline{XX}	O \underline{YY}
X	XO	XX	XY	X \widehat{XY}	X \underline{XX}	X \underline{YY}
X	XO	XX	XY	X \widehat{XY}	X \underline{XX}	X \underline{YY}
\widehat{XX}	$\widehat{XX}O$	$\widehat{XX}X$	$\widehat{XX}Y$	$\widehat{XX}\widehat{XY}$	$\widehat{XX}\underline{XX}$	$\widehat{XX}\underline{YY}$
\underline{XX}	$\underline{XX}O$	$\underline{XX}X$	$\underline{XX}Y$	$\underline{XX}\widehat{XY}$	$\underline{XX}\underline{XX}$	$\underline{XX}\underline{YY}$
\underline{XX}	$\underline{XX}O$	$\underline{XX}X$	$\underline{XX}Y$	$\underline{XX}\widehat{XY}$	$\underline{XX}\underline{XX}$	$\underline{XX}\underline{YY}$

\widehat{XX} - nondysjunkcja w I podziale mejozy
 \underline{XX} - nondysjunkcja w II podziale mejozy

Rys. 2. Możliwe zygoty prawidłowe (pola zakresowane) oraz liczbowe anomalie chromosomów X i Y; pola pokropkowane przedstawiają zygoty letalne, a zygoty z uniparentalną disomią zaznaczono grubymi obwódkami

Pasjonująca jest historia odkrycia znaczenia izodisomii w patogenezie zespołu PWS [7, 47]. U noworodków z tym zespołem występuje wybitna hipotonia mięśniowa, która stopniowo ustępuje. Początkowe duże trudności w odżywianiu zamieniają się stopniowo w żarłoczność powodującą otyłość z jednoczesnym niedoborem wzrostu. Charakterystyczna jest twarz pacjentów oraz małe ręce i stopy. Niedorozwój psychiczny i fizyczny połączony jest z cechami infantylizmu, hipogonadyzmem i hipogenitalizmem. Występują napady drgawek i hipoglikemiczne stany przedśpiączkowe, później pojawia się cukrzyca insulino-oporna. Przeżycie jest skrócone.

Od roku 1981 wiadomo, że u około połowy pacjentów z PWS występuje częściowa delecja ramienia długiego chromosomu 15, tuż poniżej centromeru, w obszarze prążka 15q11–q13 [7]. W 1986 r. można było wykazać, że ta delecja w każdym przypadku dotyczy chromosomu 15 pochodzącego od ojca [4], a w 1989 r. ukazały się doniesienia [38, 40, 50], oparte na analizie DNA, że u tej części pacjentów, u których nie stwierdzono częściowej delecji ramienia długiego chromosomu 15, nie występuje chromosom 15 pochodzący od ojca. Oba chromosomy 15 tych pacjentów pochodzą od matki [3, 7]. Przyczyną PWS jest u części pacjentów UPD. W 1991 r. Rogan i wsp. [50] przedstawili doniesienie, z którego wynika, że metodą analizy DNA udało się stwierdzić, iż u 80% pacjentów bez częściowej delecji chromosomu 15 występuje UPD.

Krytyczny obszar chromosomu 15 odpowiedzialny za PWS obejmuje prążek 15q11–q13, jednakże granice disomicznego regionu nie zostały do tej pory określone metodami molekularnymi, bowiem znane sondy nie obejmują regionów sąsiadujących. Bez molekularnych badań całego chromosomu 15 nie można jednoznacznie określić, czy w przypadkach uniparentalnej disomii tego chromosomu występuje izodisomia lub heterodisomia z częściową izodisomią regionu q11–q13 powstałą w wyniku crossing-over. Rogan i wsp. [50] badali metodami molekularnymi pochodzenie disomicznego chromosomu 15 w PWS i stwierdzili, że proksymalne segmenty tego chromosomu mogą mieć zwiększoną częstość występowania crossing-over. Zatem część przypadków PWS może stanowić UPHD z uniparentalną izodisomią w odniesieniu do prążka 15q11–q13. Nicholls i wsp. [38] sugerują, że przyczyną PWS może być również utrata ojcowskiego chromosomu trisomicznej gamety. W PWS opisano również inne aberracje chromosomowe [48].

Znaczenie uniparentalnej disomii w genetycznym uwarunkowaniu powstawania wad rozwojowych znajduje dalsze potwierdzenie w innych zespołach. Zaespół Angelmana opisano w 1965 r. [1]. Anomalia chromosomowa polega również na częściowej delecji regionu 15q11–q13, ale w tym przypadku brakuje części matczynego chromosomu 15. Powstaje zupełnie inny fenotyp: wzrost jest normalny, a nie niski jak w PWS, masa ciała jest również normalna i nie występuje hipotonia mięśniowa. Dla AS bardzo charakterystyczne są symetryczne ataktyczne ruchy i zaburzenia poruszania się. Dzieci mają duże usta, zaczerwienione policzki, stale się śmieją i z tego powodu AS jest nazywany "syndromem szczęśliwej kukielki" (*happy puppet syndrom*) [1, 26, 34, 43].

Jak już wspomniano, u części pacjentów z AS stwierdza się delecję fragmentu matczynego chromosomu nr 15. U tych pacjentów, u których delecja nie występuje, UPD ojcowskiego chromosomu spotyka się rzadko, bowiem tylko u 6% badanych. Ustalenie pochodzenia UPD chromosomu 15 było możliwe dzięki zastosowaniu sond molekularnych [5, 9, 27, 33, 34].

Z powyższego wynika, że disomia 15 w plemniku, powodująca AS jest zjawiskiem rzadkim. Liczne przypadki tego zespołu, w których nie stwierdzono ani częściowej delecji, ani UPD dowodzą, że musi występować jeszcze inny mechanizm leżący poniżej rozdzielczo-

ści metod cytogenetycznych, który powoduje wyłączenie genów matczynego chromosomu 15 w diploidalnej zygocie.

Techniką amplifikacji DNA Horsthemke [17] wyodrębnił markerowy DNA regionu 8q24.1, który jest odpowiedzialny za zespół Langer-Giediona i marker regionu 15q11-13, odpowiedzialny za PWS i AS. Jeden z tych mikroklonów, a mianowicie MN7 wykrywa zmienną liczbę kopii genu w prążku 15q11-13 w rodzinach, w których występuje dziecko z jednym z tych zespołów. Ta zmienność liczby kopii genu może być zdaniem autora odpowiedzialna za niestałość proksymalnego prążka 15q i fenotypowe przejawianie się cech powyższych zespołów. Lalande i wsp. [27] rozważają mechanizm powstawania PWS i AS w przypadkach, w których nie występuje UPD i nie występuje delecja. Uważają oni, że ze zmienną liczbą kopii genu w obrębie krytycznego prążka 15q może być również związana zróżnicowana ekspresja genów tego prążka w chromosomie ojcowskim (PWS) lub w chromosomie matczynym (AS).

Podczas badania genu osteoporosis (COL 1A2) Spotila i wsp. [57] stwierdzili, że oba chromosomy 7 badanego pacjenta cechującego się niskim wzrostem oraz niedorozwojem umysłowym są pochodzenia matczynego. Dwa inne przypadki UPID chromosomu nr 7 zostały wcześniej opisane [56, 57].

Do tej pory przyjmowało się, że zrównoważone translokacje robertsonowskie nie powodują u człowieka powstawania zaburzeń rozwojowych. Ostatnio ukazały się doniesienia, które dowodzą, że w przypadku połączenia translokacji robertsonowskiej z UPD chromosomu biorącego udział w translokacji występują wady rozwojowe [44, 61, 64].

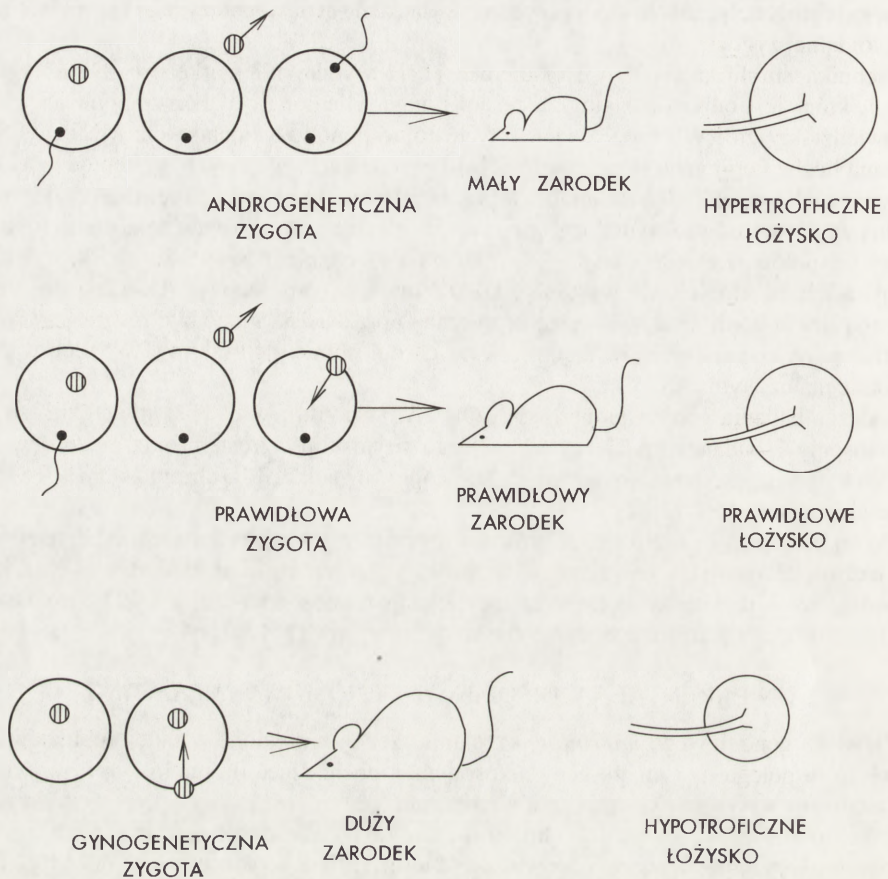
UNIPARENTALNA DISOMIA A GENOMOWY *IMPRINTING*

Zjawisko genomowego *imprintingu* zostanie szerzej omówione w innej publikacji [18]. Zjawisko to polega na tym, że geny autosomalne, pochodzące od matki i ojca, wywierają zróżnicowany wpływ na ekspresję genów embrionu. Ten zróżnicowany wpływ może dotyczyć całych chromosomów, segmentów chromosomów lub pojedynczych genów. Innymi słowami genomowy *imprinting* oznacza, że pewna część informacji genetycznej w komórkach embrionalnych ssaków pozostaje niewykorzystana [12, 49, 54, 55]. Jednym z mechanizmów *imprintingu*, prawdopodobnie o zasadniczym znaczeniu, jest metylacja DNA [36,39,49].

Lawler i wsp. [28] badali komórki zaśniadu groniastego i ustalili, że mają one 46 zupełnie prawidłowych chromosomów, które jednak wszystkie były pochodzenia ojcowskiego. A więc przypadek partenogenezy, która mogła polegać na podwojeniu chromosomów plemnika (całkowite nierozdzielenie się chromosomów) albo na dispermii, przy czym cały matczyzny materiał genetyczny został utracony. W przeciwnym przypadku, kiedy wszystkie chromosomy są pochodzenia matczynego, powstaje potwornik jajnika [29]. W celu potwierdzenia tych obserwacji przeprowadzono [49, 58, 59] doświadczenia na komórkach jajowych myszy. Przebieg i wyniki eksperymentów przedstawiono na rysunku 3. Z komórek jajowych każdorazowo usuwano przedjądrza i wprowadzano nowe. Tworzono zatem poniższe kombinacje:

- dwa ojcowskie przedjądrza – androgenetyczne zygoty,
- jedno przedjądrze matczyne, a drugie ojcowskie – prawidłowe zygoty,
- dwa matczyne przedjądrza – zygoty gynogenetyczne.

Rozwój androgenetycznych zygot nie jest prawidłowy, bowiem dochodzi do nadmiernego rozwoju błon płodowych oraz łożyska, natomiast rozwój embrionu jest niewielki i dochodzi do poronienia. Gynogenetyczne zygoty także nie rozwijają się prawidłowo. W przeciwień-



Rys. 3. Schematyczne przedstawienie wyników doświadczeń z androgenetycznymi i gynogenetycznymi zygotami

stwie do poprzednich, obserwuje się intensywny rozwój embrionu, ale zahamowany jest rozwój tkanek pozazarodkowych i również dochodzi do poronienia.

Wyniki tych doświadczeń są podobne do tego, co w osłabionej formie zaobserwowano u człowieka w przypadku triploidii, w losie zygot z 69 chromosomami Kajii i Niikawa [22] wykazali, że w przypadku triploidii u człowieka większość zygot miała 2 zestawy chromosomów od ojca, anomalia ta jest zatem wynikiem podwójnego zapłodnienia. U człowieka, jeżeli 2 komplety chromosomów pochodzą od ojca a 1 od matki, tworzy się hipertroficzne łożysko z cystami, często również zaśniad groniasty. Jeżeli 2 komplety pochodzą od matki a 1 od ojca, embrion rozwija się początkowo dobrze, ale nie rozwija się łożysko i dochodzi do wczesnego poronienia. Dzieci urodzone z $3n$ chromosomami mają przeważnie kariotyp mozaikowy, z linią komórek o prawidłowym kariotypie [14, 24], a fenotypowo stwierdza się duże łożysko z cystami, dziecko ma bardzo mały tułów z dużą głową i często spotyka się syndaktylię [22].

W tym momencie dotykamy podstawowego dogmatu genetyki, a mianowicie praw Mendla. Dla grochu badanego przez Mendla nie ma prawdopodobnie większego znaczenia czy gen

na czerwoną, czy na białą barwę kwiatów pochodzi od grochu matczynego lub ojcowskiego. U ssaków nie jest jednak obojętne, od którego z rodziców pochodzi chromosom. Komórki embrionu wiedzą prawdopodobnie doskonale, kiedy mają skorzystać z informacji pochodzącej od matczynego lub ojcowskiego homologa. Przeprowadzone doświadczenia dowodzą, że u ssaków geny matki odpowiadają za wzrost embrionu, natomiast geny ojcowskie są odpowiedzialne za struktury zewnątrzembrionalne, a więc za łożysko i błony płodowe. Te spostrzeżenia są cenne dla wyjaśnienia innych zjawisk embriologicznych, a mianowicie implantacji i porodu.

Szereg badaczy [31, 53, 54, 55, 59] systematycznie krzyżowało myszy laboratoryjne mające translokacje robertsonowskie i otrzymali w rezultacie UPD dla ich poszczególnych chromosomów. Co najmniej w odniesieniu do siedmiu autosomów myszy, jeżeli występują one pod postacią matczynej lub ojcowskiej UPD, powstają różne fenotypy. W przypadku UPD chromosomów 2 i 11 dochodzi nawet do przeciwstawnych odchyceń od normy: ojcowska UPD prowadzi do powstania dużego hiperaktywnego potomstwa, a matczyzna UPD do małego i hipoaktywnego. Chromosomowy *imprinting* dobrze obrazuje tzw. mysz Cattanacha [53]. W chromosomie nr 7 myszy znajduje się locus dla genu barwy sierści. Inny allel w tym szczepie myszy powoduje powstanie brązowej sierści. Mysz Cattanacha ma w obu chromosomach 7 genów albinotycznych, warunkujących białą sierść. Segment o długości 1/3 chromosomu 7 z genem brązowego zabarwienia sierści znajduje się w wyniku translokacji pośrodku jednego chromosomu X. Drugi chromosom X jest normalny. Zgodnie z hipotezą Lyon [30] chromosomy X ulegają losowej inaktywacji. Wszędzie tam, gdzie aktywny jest chromosom X mający segment chromosomu 7, myszy mają brunatną sierść. Tam, gdzie aktywny jest normalny chromosom X, myszy mają białą sierść.

UWAGI KOŃCOWE

Znaczenie uniparentalnej disomii w genetyce klinicznej człowieka wydaje się być większe, niż to powyżej przedstawiono. Zespół Millera-Dieckera (17p-) jest prawdopodobnie powodowany delecją ojcowskiego chromosomu 17 [52, 62], zespół DiGeorge (kariotyp 22q-) może być matczyną delecją chromosomową [12], zespół cri du chat (5p-) wydaje się być pochodzenia ojcowskiego [40]. Znane są jeszcze inne zespoły również potwierdzające znaczenie uniparentalnej disomii [63].

Warto też podkreślić, że inną klasą obecnie badanych i poznawanych delecji chromosomowych są chromosomy tracone podczas onkogenezy [35, 45]. W rzadkim guzie Wilmsa stwierdzono utratę chromosomu 11 lub jego części, co prawie zawsze dotyczy chromosomu matczynego [67]. Problem znaczenia utraty chromosomu w procesie onkogenezy jest jednak złożony, czego dowodzą badania nad powstawaniem retinoblastoma [10, 51, 68]. Zjawisko uniparentalnej disomii jest zatem wraz z genomowym *imprintingiem* nową i niezwykle interesującą kartą cytogenetyki ssaków.

LITERATURA

- [1] ANGELMAN H. "Puppet" children: a report on three cases. *Dev Med Child Neurol* 1965; 7: 681–683.
- [2] BOUÉ J, BOUÉ A, LAZAR P. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1,500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* 1975; 12: 11–26.
- [3] BUTLER MG. Prader-Willi Syndrome: Current Understanding of Cause and Diagnosis. *Amer J Med Genet* 1990; 35: 319–332.
- [4] BUTLER MG, MEANEY FJ, PALMER CG. Clinical and Cytogenetic Survey of 39 Individuals With Prader-Labhart-Willi Syndrome. *Amer J Med Genet* 1986; 23: 793–809.
- [5] CANTU ES, NICHOLS RD, PAI GS, CHAN TA, GOTTLIEB W. Paternal uniparental disomy in Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 281 suppl.
- [6] CARPENTER NJ, SAY B, BARBER ND. A homozygote for pericentric inversion of chromosome 4. *J Med Genet* 1982; 19: 469–471.
- [7] CASSIDY SB. Conference Report: First International Scientific Workshop on Prader-Willi Syndrome and Other Chromosome 15q Deletion Disorders. *Amer J Med Genet* 1992; 42: 220–269.
- [8] CREASY MR, CROLLA JA, ALBERMAN ED. A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques. *Hum Genet* 1976; 31: 177–196.
- [9] DONLON TA. Similar molecular deletions on chromosome 15q11.2 are encountered in both the Prader-Willi and Angelman syndromes. *Hum Genet* 1988; 80: 322–328.
- [10] DRYJA TP, MUKAI S, PETERSEN R, RAPAPORT JM, WALTON D, YANDELL DW. Parental origin of mutations of the retinoblastoma gene. *Nature* 1989; 339: 556–558.
- [11] ENGEL E. A New Genetic Concept: Uniparental Disomy and Its Potential Effect, Isodisomy. *Am J Med Genet* 1980; 6: 137–143.
- [12] GREENBERG F, ELDER FFB, HAFNER P, NORTHTRUP H, LEDBETTER DH. Cytogenetic findings in a prospective series of patients with DiGeorge anomaly. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 605–611.
- [13] HASSOLD TJ. Mosaic trisomies in human spontaneous abortions. *Hum Genet* 1982; 61: 31–35.
- [14] HASSOLD TJ, JACOBS PA. Trisomy in man. *Ann Rev Genet* 1984; 18: 69–97.
- [15] HASSOLD T, JACOBS PA, LEPPERT M, SHELDON M. Cytogenetic and molecular study of trisomy 13. *J Med Genet* 1987; 24: 725–732.
- [16] HASSOLD TJ, MATSUYAMA A, NEWLANDS IM, MATSUURA JS, JACOBS PA, MANUEL B, TSUEI J. A cytogenetic study of abortions in Hawaii. *Ann Hum Genet (London)* 1978; 41: 443–454.
- [17] HORSTHEMKE B. Microdissection and molecular analysis of chromosome regions involved in segmental aneusomy. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 11 suppl.
- [18] HÜBNER H, MORDALSKA A, DZWONKOWSKA A. Genomowy imprinting (w przygotowaniu do druku).
- [19] JOHANNISSON R. Gesichtspunkte der gonadalen Infertilität. *Focus MHL* 1990; 7: 5–14.
- [20] JOHANNISSON R, LÖHRS U, PASSERGE E. Pachytene analysis in males heterozygous for a familial translocation (19:12:13) (q22;q22;q32) ascertained through a child with partial trisomy 9. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 47: 160–166.
- [21] JOHANNISSON R, LÖHRS U, WOLFF HH, SHWINGER E. Two different XY-quadrivalent associations and impairment of fertility in men. *Cytogenet Cell Genet* 1987; 45: 222–230.
- [22] KAJII T, NIKAWA N. Origin of triploidy and tetraploidy in man: 11 cases with chromosome markers. *Cytogenet Cell Genet* 1977; 18: 109–125.
- [23] KAJII T, OHAMA K, NIKAWA N, FERRIER A, AVIRACHAN S. Banding analysis of abnormal karyotypes in spontaneous abortion. *Am J Hum Genet* 1973; 25: 539–547.
- [24] KALOUSEK DK. The role of confined chromosomal mosaicism in placental function and human development. *Growth Genet Hormones* 1988; 4: 1–3.
- [25] KIRKELS VGHJ, HUSTINX THWJ, SCHERES JMJC. Habitual abortion and translocation (22q;22q): unexpected transmission from a mother to her phenotypically normal daughter. *Clin Genet* 1980; 18: 456–461.
- [26] KNOLL JHM, NICHOLLS RD, MAGENIS RE, GRAHAM JM jr, LALANDE M, LATT SA. Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* 1989; 32: 285–290.
- [27] LALANDE M, KNOLL JHM, GLATT K, WOOLF B, FLINT A, WAGSTAFF J. Segmental Aneusomy of 15q11-13 in the Prader-Willi and Angelman syndromes. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 11 suppl.
- [28] LAWLER SD. Genetic studies on hydatidiform moles. *Adv Exp Med Biol* 1984; 176: 147–161.
- [29] LINDER D, McCAW BK, HECHT F. Parthenogenic origin of benign ovarian teratomas. *N Engl J Med* 1975; 292: 63–66.

- [30] LYON MF. Sex chromatin and gene action in the mammalian X chromosome. *Am J Hum Genet* 1962; **14**: 135–148.
- [31] LYON MF, GLENISTER PH. Factors affecting the observed number of young resulting from adjacent-2 disjunction in mice carrying a translocation. *Genet Res* 1977; **29**: 83–92.
- [32] MAGENIS RE. Invited Editorial: On the Origin of Chromosome Anomaly. *Am J Hum Genet* 1988; **42**: 529–533.
- [33] MAGENIS ER, BROWN MG, LACY DA, BUDDEN S, LAFRANCHI S. Is Angelman syndrome an alternate result of del (15)(q11q13)? *Am J Med Genet* 1987; **28**: 829–838.
- [34] MAGENIS RE, TOTH-FEJEL S, ALLEN LJ, BLACK M, BROWN MG, BUDDEN S, COHEN R, FRIEDMAN JM, KALOUSEK D, ZONANA J, LACY D, LAFRANCHI S, LAHR M, MAFARLANE J, WILLIAMS CPS. Comparison of the 15q Deletion in Prader-Willi and Angelman Syndromes: Specific Regions, Extent of Deletions, Parental Origin, and Clinical Consequences. *Amer J Med Genet* 1990; **35**: 333–349.
- [35] MILLER M, HALL JG. Possible maternal effect on severity of neurofibromatosis. *Lancet* 1978; **2**: 1071–1073.
- [36] MONK M, BOUBELIK M, LEHNERT S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse development. *Development* 1979; **99**: 371–382.
- [37] MORDALSKA A, DZWONKOWSKA A, CZYŻEWSKA J, HÜBNER H, KOWALCZYK J. An analysis of nondisjunction in man of the example of mosaic karyotype formation in Down's syndrome. *Gen Pol* 1991; **32**: 177–183.
- [38] NICHOLLS RD, KNOLL JHM, BUTLER MG, KARAM S, LALANDE M. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 1989; **342**: 281–285.
- [39] OLSZEWSKA MJ, SAKOWICZ T. Metylacja DNA u roślin. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 253–262.
- [40] OVERHAUSER J, LEE-CHEN G-J, MCMAHAN J, WASMUTH J, OBERLENDER S, CARLIN ME, NIEBUHR E. Paternal inheritance of the deleted chromosome 5 in most cri du chat syndrome patients. *Am J Hum Genet* 1989; **45**: A330.
- [41] PALMER CG, SCHWARTZ S, HODES ME. Transmission of a balanced homologous t(22q;22q) translocation from mother to normal daughter. *Clin Genet* 1980; **17**: 418–422.
- [42] PELLESTOR F. Differential distribution of aneuploidy in human gametes. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 286 suppl.
- [43] PEMBREY M, FENNEL SJ, van den BERGHE J, FITCHETT M, SUMMERS D, BUTLER L, CLARKE C. The association of Angelman's syndrome with deletion within 15q1-3. *J Med Genet* 1989; **26**: 73–77.
- [44] PETERSEN MB, BARTSCH O, MIKKELSEN M, SCHWINGER E, ANTONARAKIS SE. Uniparental isodisomy resulting from somatic mechanisms in human structural chromosome abnormalities. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 286 suppl.
- [45] PONDER B. Gene losses in human tumours. *Nature* 1988; **335**: 400–402.
- [46] PRABHAKARA K, KAR B, MURTHY SK. Anaphase lagging in mother of trisomy 21: a predisposing factor for nondisjunction. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 287 suppl.
- [47] PRADER A, LABHART A, WILLI H. Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myotonieartigem Zustand in Neugeborenenalter. *Schweiz Med Wochenschr* 1956; **86**: 1260–1261.
- [48] QUMSIYEH MB, DALTON JD, GORDON PL, WILROY RS, THARAPEL AT. Deletion of chromosome 15pter→q11.2 due to t(Y;15) in a boy With Prader-Willi Syndrome. *Am J Med Genet* 1992; **42**: 109–111.
- [49] REIK W, COLLICK A, NORRIS ML, BARTON SC, SURANI MA. Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. *Nature* 1987; **328**: 248–251.
- [50] ROGAN PK, MASCARI MJ, LADDA RL, GOTTLIEB W, NICHOLS RD. The origin of maternal disomy in Prader-Willi Syndrome. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 287 suppl.
- [51] SCHEFFER H, te MEERMAN GL, KRUIZE YCM, van den BERG AHM, PENNINGA DP, TAN KEWP, der KINDEREN DJ, BUYS CHCM. Linkage analysis of families with hereditary retinoblastoma: nonpenetrance of mutation revealed by combined use of markers within and flanking the RB1-gene. *Am J Hum Genet* 1989; **45**: 252–260.
- [52] SCHWART CE, JOHNSON JP, HOLYCROSS B, MANDEVILLE TM, SEARS TS, GRAUL EA, CAREY JC. Detection of submicroscopic deletions in band 17p13 in patients with the Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet* 1988; **43**: 597–604.
- [53] SEARLE AG, BEECHEY CV. Complementation studies with mouse translocations. *Cytogenet Cell Genet* 1978; **20**: 282–303.
- [54] SOLTER D. Inertia of the embryonic genome in mammals. *Trends Genet* 1987; **3**: 23–27.
- [55] SOLTER D. Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes. *Ann Rev Genet* 1988; **22**: 127–146.

- [56] SPENCE JE, PERCIACCANTE RG, CREIG GM, WILLARD HF, LEDBETTER DH, HEJTMANCIK JF, POLLACK MS, O'BRIEN WE, BEAUDET AL. Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. *Am J Hum Genet* 1988; **42**: 217–226.
- [57] SPOTILA LD, SEREDA L, PROCKOP DJ. Short stature associated with maternal disomy for chromosome 7. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 30 suppl.
- [58] SURANI MAH, BARTON SC, NORRIS ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984; **308**: 548–550.
- [59] SURANI MAH, BARTON SC, NORRIS ML. Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell* 1986; **45**: 127–136.
- [60] SWAIN JL, STEWART TA, LEDER P. Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: a molecular mechanism for parental imprinting. *Cell* 1987; **50**: 719–727.
- [61] TEMPLE IK, COCKWELL A, HASSOLD T, PETTAY D, JACOBS P. Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet* 1991; **28**: 511–514.
- [62] van TUINEN P, DOBYNS WB, RICH DG, SUMMERS KM, ROBINSON TJ, NAKAMURA Y, LEDBETTER DH. Molecular detection of microscopic and submicroscopic deletions associated with Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet* 1988; **43**: 587–596.
- [63] TUPLER R, BORTOTTO L, BÜHLER EM, ALKAN M, MALIK NJ, BÖSCH-AL JADOOA N, MEMO L, MARASCHIO P. Paternal origin of the de novo deleted chromosome 4 in Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Med Genet* 1992; **29**: 53–55.
- [64] WANG JCC, PASSAGE MB, YEN PH, SHAPIRO LJ, MOHANDAS TK. Uniparental heterodisomy for chromosome 14 in a phenotypically abnormal familial balanced 13/14 robertsonian translocation carrier. *Am J Hum Genet* 1991; **48**: 1069–1074.
- [65] WARBURTON D. Editorial: Uniparental Disomy: A rare consequence of the high rate of aneuploidy in human gametes. *Am J Hum Genet* 1988; **42**: 215–216.
- [66] WARREN AC, CHAKRAVARTI A, WONG C, SLAUGENHAUPT SA, HALLORAN SL, WATKINS PC, METAXOTOU C, ANTONARAKIS SE. Evidence for reduced recombination on the nondisjoined chromosomes 21 in Down syndrome. *Science* 1987; **237**: 652–654.
- [67] WILKINS RJ. Genomic imprinting and carcinogenesis. *Lancet* 1988; **1**: 329–331.
- [68] ZHU X, DUNN JM, PHILLIPS RA, GOODARD AD, PATON KE, BECKER A, GALLIE BL. Preferential germline mutation of the paternal allele in retinoblastoma. *Nature* 1989; **340**: 312–313.

Otrzymano: 28.07.1992 r.

Przyjęto: 21.08.1992 r.

Adres autorów: Plac Hallera 1, 90-647 Łódź

HYBRYDYZACJA IN SITU – ROZWÓJ NOWEJ TECHNIKI BADAWCZEJ DLA PRZESTRZENNEGO UWIDOCZNIENIA GENÓW I TRANSKRYPTÓW GENOWYCH

IN SITU HYBRIDIZATION – A NEW METHOD DEVELOPMENT
FOR SPATIAL VISUALISATION OF GENES AND GENE TRANSCRIPTS

Agata FILIP i Danuta ROŻYŃKOWA

Zakład Genetyki Medycznej AM w Lublinie

Streszczenie. Hybrydyzacja in situ jest przeniesieniem na teren wewnątrzkomórkowy możliwości uwidocznienia określonych sekwencji DNA lub RNA na podstawie komplementarności zasad między sekwencjami nukleotydów w materiale badawczym a sondą. Wynikająca w tej reakcji cząsteczka hybrydowa jest wykrywana dzięki sygnałowi, uwidocznionemu w reakcji cytochemicznej. Pozwala to na przestrzenną i ilościową analizę sygnału w określonej tkance, komórce, chromosomach i organellach. Artykuł zawiera przegląd metod i zastosowań. Zwraca szczególną uwagę na badania regulacji i ekspresji genów w komórkach somatycznych człowieka.

Summary. In situ hybridisation makes possible to localize definite DNA or RNA sequences within the cells. It utilises the fact of complementarity between the probe and the inquired sequence. Hybrids are detected after the cytochemical reaction. This method gives a chance for spatial and quantitative analysis of the signal in definite tissue, cell, chromosomes and cell structures. This article includes a review of various methods and applications for ISH. Special attention was paid to regulation and expression of genes in human somatic cells.

HISTORIA I TERAŻNIEJSZOŚĆ

Metoda hybrydyzacji in situ (ISH) wniosła prawie nieograniczone możliwości rozwiązań przestrzennych, dotyczących umiejscowienia genów w chromosomach i terenu komórkowego ekspresji genu, co ma szczególną korzyść w obserwacji tkanek heterologicznych lub mozaikowej mieszaniny komórek. Ocenia się, że czułość metody ISH jest wyższa niż innych metod, stosowanych do wykrycia określonych sekwencji kwasów nukleinowych, to znaczy wyższa niż metody Southerna, Northerna czy hybrydyzacji na bibule (*dot-blot*). Wynika to chociażby z tego względu, że metodą ISH można wykryć pojedynczą komórkę zakażoną wirusem na tle 100 komórek niezakażonych, postępując się sondą wirusowego DNA lub RNA [19].

Metoda ISH zastosowana była po raz pierwszy przez Mary Lue Pardue i wsp. w 1971 r. do badań organizacji całego genomu *Drosophila* i *Xenopus* [37]. Rok później podjęli ją Henderon i wsp. lokalizując DNA rybosomalny człowieka [20]. Próby te przeprowadzono stosując sondy znakowane radioaktywnym trytem. Pionierami nieizotopowego znakowania sond byli: Ward, Singer, Mannelidis i Langer w latach 1980–1981 [23, 28, 33, 38], którzy używali sond biotynylowanych; detekcja odbywała się na poziomie mikroskopu elektronowego, co znacznie zwiększyło rozdzielczość. Późniejszy okres przyniósł wiele modyfikacji samych sond, jak i sposobu wykrywania miejsca hybrydyzacji i wzmacniania sygnału (wykorzystanie metod immunocytochemicznych, barwników fluorescencyjnych etc.) [38], dzięki czemu mogło nastąpić rozszerzenie możliwości wykorzystania tej metody do diagnostyki.

Wielu cytogenetyków-klinicystów zwróciło uwagę i wykorzystało w swoich pracach metodę hybrydyzacji *in situ*. Podajemy kilka przykładów: Latos-Bieleńska i wsp. [30] uściślili mapę chromosomu 17q korzystając z przypadku dysmorfii z translokacją t(2;17). Kuwano i wsp. [27] wykryli tą metodą ukrytą translokację w krytycznym regionie 17p13.3 w rzadkiej dysmorfii (*lissencephaly*) w zespole Millera-Dickera. Lux i wsp. [31] wskazali na lokalizację genu kodującego ankyrinę erytrocytów w chromosomie 8, korzystając z jego delecji w rodzinnej sferocytocie. Ried i wsp. [40] udokumentowali delecję locus dystrofiny w dystrofii mięśniowej Duchenne'a bezpośrednio u heterozygot - nosicieli. Kuo i wsp. [26] zaproponowali wykrywanie aneuploidii chromosomów 13, 18 i 21 w jądrach amniocytów na podstawie swoistych, złożonych sond - markerów tych chromosomów, a Cheung i wsp. [7] wprowadzili sondy dla różnych DNA w regionach p i prox q chromosomów akrocentrycznych (DNA alfoidalne, DNA rybosomalne) dla scharakteryzowania punktu złamania w translokacjach. O ile badania Kuo i wsp. mają znaczenie diagnostyczne w najczęstszych trisomiach człowieka, to badania Cheunga wnikają w samo sedno tych nieznanych kulis najczęstszych translokacji molekularnych, których mechanizm (mejotyczny brak rozdziału) znamy od lat kilkudziesięciu, a nie rozumiemy genezy.

Także w genetyce somatycznej metoda ISH przyczyniła się do uściślenia regionalnej lokalizacji genów, np. genu GM-CSF w chromosomie 5q [22], genu łańcucha beta receptora antygeny limfocyty T do 7q32 [34], genu receptora IL-2 w chromosomie 10p14 [51] i szeregu innych. W poszerzeniu diagnostyki w przewlekłej białaczkę szpikowej metodą ISH wykrywa się fuzyjny gen *bcr-abl* w jądrze interfazalnym bez uciekania się do dokumentacji chromosomu Ph' [2, 47]. Hybrydocytochemicznie można badać także ekspresję poszczególnych genów, poddanych wpływom regulacyjnym czynników endo- lub egzogennych (artykuł na ten temat przedstawił niedawno na łamach *Postępów Biologii Komórki* Zabel [53]). Na terenie komórek uwidacznia się wtedy sygnał sondy odpowiednio komplementarnej do mRNA. Można wówczas uchwycić "gen w akcji" na obszarach rozwijających się struktur morfologicznych w ontogenezie. Można także ocenić wpływ komórkowych protoonkogenów i genów przeciwnowotworowych na procesy wzrostu i różnicowania w liniach docelowych komórek. Można wreszcie uchwycić ekspresję danego genu w ewolucji gatunków.

ZASADA METODY

Hybrydyzacja *in situ* polega na lokalizowaniu sekwencji DNA lub RNA bezpośrednio w materiale biologicznym (preparat cytologiczny, komórki, preparaty parafinowe tkanek) na

szkiełku podstawowym. Wykorzystywany jest tu fakt komplementarności zasad pomiędzy sekwencjami nukleotydów w materiale i – odpowiednio przygotowaną – sondą molekularną, którą może być cDNA, fragment DNA genomowego lub syntetyczny oligonukleotyd [4,29,35,37,54].

SONDA

Przygotowanie sondy do reakcji hybrydyzacji polega na takim jej wyznakowaniu, aby miejsce hybrydyzacji było łatwe do wykrycia w mikroskopie świetlnym, fluorescencyjnym bądź elektronowym. Znakowanie sondy przeprowadzać można techniką PCR [37, 50], *random primer* [29, 37] lub metodą *nick* translacji [17, 25, 29, 41, 55], a stosowane prekursorzy mogą być izotopowe lub nieradioaktywne. Do znakowania izotopowego sond stosuje się najczęściej tryt (^3H), a także ^{125}J i ^{35}S [16, 17, 20, 32, 37]. Zaletą tego typu znakowania jest dosyć wysoka czułość, natomiast wadami – oprócz konieczności kontaktu z pierwiastkami promieniotwórczymi – są: obecność silnego tła, długi czas ekspozycji (do sześciu tygodni) i związane z tym ograniczenie rozdzielczości.

W znakowaniu nieizotopowym stosowanych jest szereg związków, takich jak: biotyna, digoksygenina, FITC, BrdU [12, 21, 28, 29, 33, 42]. Podstawowym plusem tej metody jest duża rozdzielczość (ok. 20 razy dokładniejsza lokalizacja sekwencji) i możliwość szybkiej detekcji sygnału (kilka godzin), co odgrywa dużą rolę w badaniach klinicznych [3].

NICK TRANSLACJA

Podczas znakowania sond molekularnych metodą *nick* translacji (NT) stosowane są dwa enzymy: DNA-aza I i DNA polimeraza I. DNA-aza I tworzy pęknięcia (*nicks*) na jednej z nici podwójnej spirali. Właściwości DNA polimerazy I jako egzonukleazy i polimerazy w kierunku $5'-3'$ wykorzystane są do naprawy łańcucha z wbudowaniem dostarczonych nukleotydów znakowanych (rys. 1).

Rozpoczynając od miejsca pęknięcia DNA polimeraza I usuwa nukleotydy od końca $5'$, jednocześnie dobudowując znakowane nukleotydy w kierunku $5'-3'$. W rezultacie każde pęknięcie przemieszcza się wzdłuż nici DNA [1, 37].

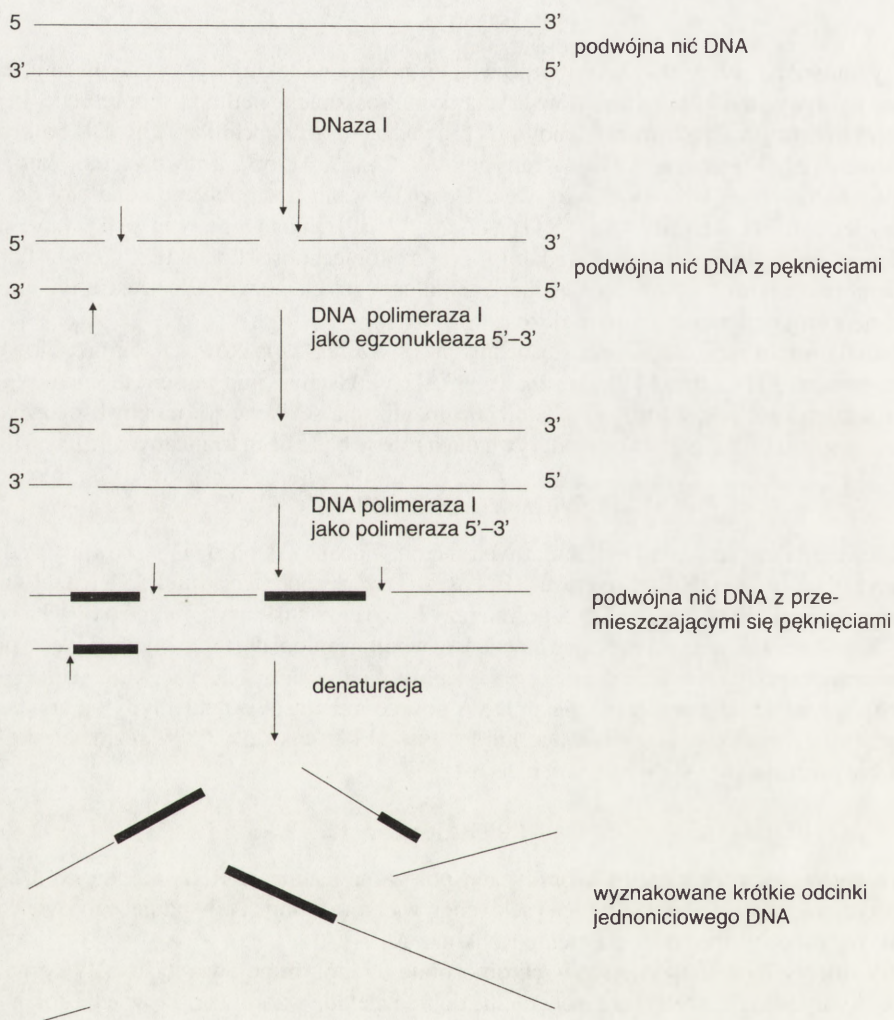
PREPARAT

Przygotowanie preparatu do hybrydyzacji polega na usunięciu RNA mogącego działać kompetycyjnie w stosunku do szukanej sekwencji w chromosomie i powodującego zwiększenie tła. W tym celu stosuje się trawienie RNA-azą A [14].

Aby zidentyfikować to miejsce w chromosomie, w którym pojawi się swoisty sygnał w wyniku hybrydyzacji, trzeba bardzo starannie dobrać metodę wzorów prążkowych i kolejność wykonania etapów jednego i drugiego postępowania tak, aby zapewnić cytochemiczne wykrycie sygnału sondy i zachować (czasem tylko w dokumentacji fotograficznej) wzór prążkowy [17]. Zhang i wsp. podali względnie prostą metodę ISH przy użyciu sondy kosmidowej¹ wyznakowanej dUTP digoksygeniną, a wykrywaną jednoetapową reakcją immunocytochemiczną za pomocą przeciwciała skierowanego przeciw digoksygeninie i znakowanego zasadową fosfatazą. Metoda wzorów prążkowych FPG (prążki R) była zastosowana po

¹Kosmid – konstrukcja (utwór) sztuczna zawierająca m.in. DNA faga lambda i markery oporności na antybiotyki.

hybrydyzacji, a przed inkubacją z kompleksem przeciwciało/alkaliczna fosfataza. Na jednej fotografii widać chromosomy we wzorach prążkowych i jednocześnie sygnał [55].



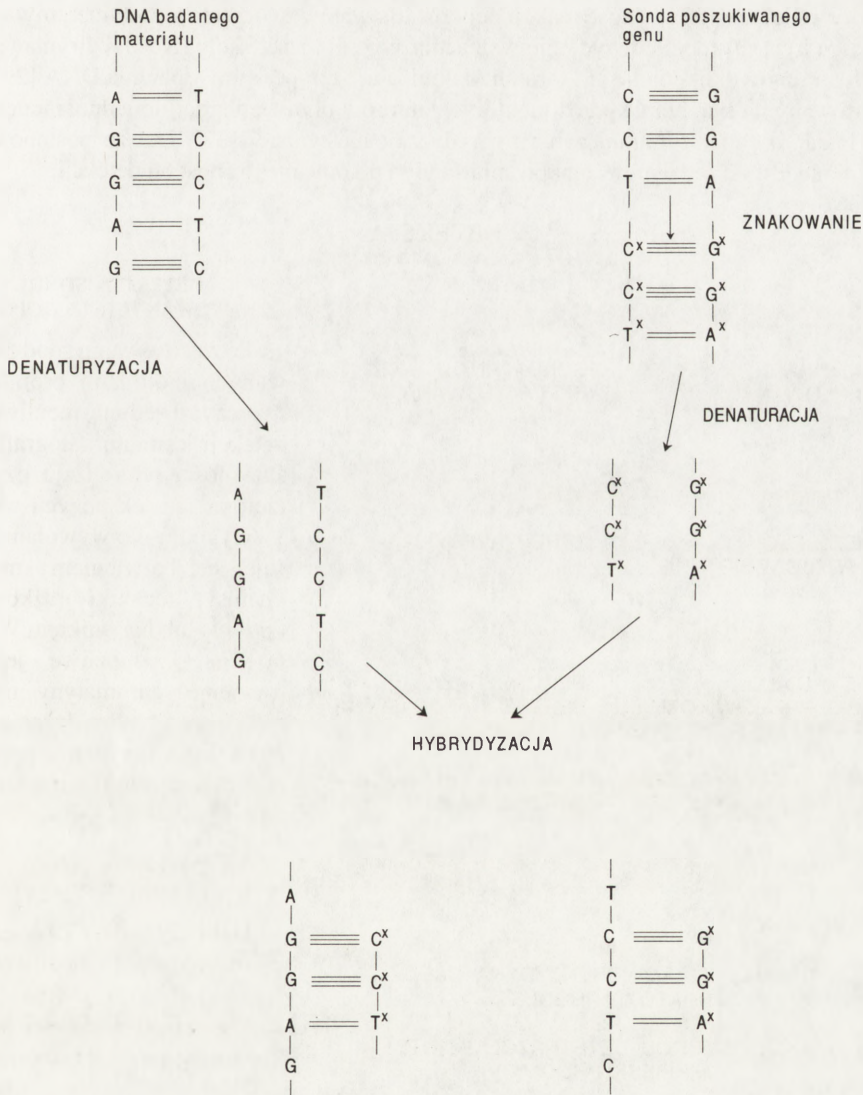
Rys. 1. Nick translacja wg JE Arranda [1]

DENATURACJA

Bezpośrednio przed hybrydyzacją należy zdenaturować DNA preparatu i sondy.

Denaturację sondy przeprowadza się w wysokiej temperaturze inkubując mieszaninę hybrydyzacyjną w 80°C, a następnie szybko schładzając.

DNA preparatów można denaturować w temperaturze pokojowej w obecności NaOH lub HCl bądź w temperaturze 70°C w 70-procentowym roztworze formamidu. Sposób i czas dematuracji uzależniony jest od rodzaju i wieku preparatów [29, 37].



Rys. 2. Hybrydyzacja wg R Neumana [35]

HYBRYDYZACJA

Optymalna dla reakcji hybrydyzacji (rys. 2) jest temperatura ok. 25°C wyższa od temperatury topnienia DNA (T_m). Wartość T_m zależy od: długości wzajemnie reagujących cząsteczek, stężenia kationów i obecności rozpuszczalników organicznych (np. amid kwasu mmmrówkowego). W związku z tym ISH można przeprowadzać dwiema metodami: zastosowaniem wyższej temperatury (67°C) w obecności wodnych roztworów soli oraz w roztworze formamidu w niższych temperaturach (39–42°C) [29, 37].

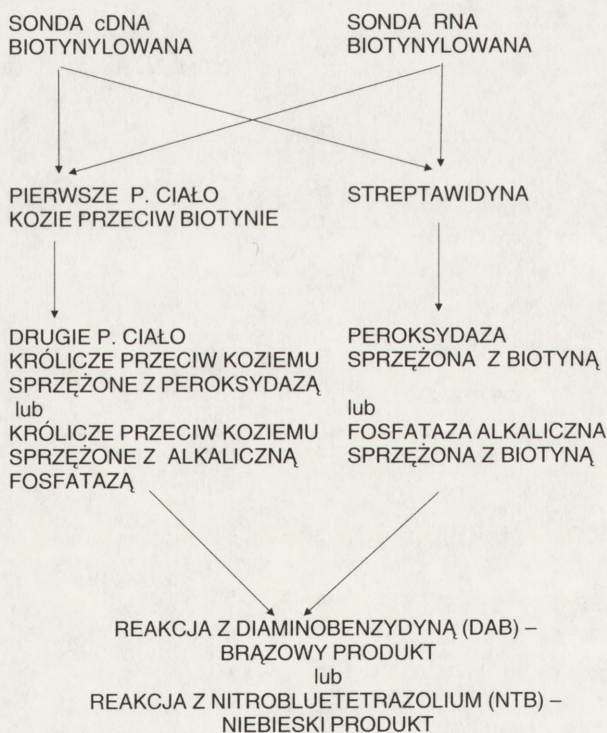
Obok formamidu ważnymi składnikami mieszaniny hybrydyzacyjnej są: siarczan dekstranu, który zwiększa efektywność reakcji poprzez ułatwienie tworzenia konglomeratów sondy w miejscu hybrydyzacji, co wydatnie wzmacnia sygnał, a także sole (NaCl, cytrynian sodu, bufor fosforanowy) podobnie jak formamid obniżające temperaturę topnienia DNA [29].

Stosowany na tym etapie przez niektórych autorów płyn Denharta lub jednołańcuchowy DNA mają za zadanie ograniczenie hybrydyzacji nieswoistej [37]. Dalsze postępowanie uzależnione jest od rodzaju wyznakowania sondy i planowanego sposobu detekcji.

DETEKCJA

DETEKCJA SOND ZNAKOWANYCH IZOTOPOWO

Po zastosowaniu sond znakowanych izotopami promieniotwórczymi jedyną możliwością detekcji jest autoradiografia. W zależności od rodzaju użytego izotopu czas ekspozycji wynosi 1–6 tygodni. Po wywołaniu stosuje się barwienie metodą Giemsa, techniki prążkowe G (zwykła lub barwnikiem Wrighta), F i Q, możliwe jest też trawienie chromatyny trypsyną przed hybrydyzacją, co pozwala na otrzymanie prążków po zakończeniu procesu [17, 55].



Rys. 3. Rodzaje detekcji sondy wg Sabera i wsp. [43]

DETEKCJA SOND NIERADIOAKTYWNYCH

Hybrydyzacja z użyciem tego rodzaju sond umożliwia szereg metod detekcji (rys. 3), w zależności od wielkości poszukiwanej sekwencji i stopnia rozdzielczości, który chcemy uzyskać (mikroskop świetlny, fluorescencyjny, elektronowy).

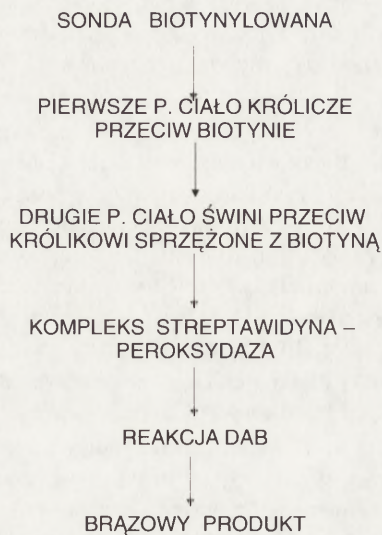
Wszystkie one wykorzystują reakcje powinowactwa (np. biotyna-awidyna [45]) i jedno- lub wielostopniowe reakcje immunologiczne.

Opisano również bezpośrednie wykrywanie sondy znakowanej fluorochromem (FITC) z użyciem mysiego przeciwciała monoklonalnego anty FITC i przeciwciała koziego przeciw myszy sprzężonego z tetrametylorodaminą (TRITC) [50].

Do wykrywania sond biotynylowanych dla sekwencji powtarzalnych wykorzystywane są reakcje powinowactwa biotyna-awidyna z zastosowaniem koniugatów awidyna-FITC lub awidyna-TRITC [9, 26, 27, 48]; można również przeprowadzać reakcje z peroksydazą i alkaliczną fosfatazą.

Stosowano również detekcję z użyciem pierwszego przeciwciała przeciwko biotynie i drugiego zaabsorbowanego na powierzchni cząsteczek złota, co pozwoliło na obserwację miejsca hybrydyzacji w mikroskopie elektronowym [23].

W przypadku używania sond dla pojedynczych kopii koniecznością staje się zastosowanie wieloetapowych reakcji immunocytochemicznych powodujących wzmocnienie sygnału bez zwiększenia tła. Wykorzystuje się tu tzw. reakcje "kanapkowe" (rys. 4), polegające na użyciu kolejno kilku przeciwciał, z których ostatnie sprzężone jest substancją, umożliwiającą wizualizację reakcji [5, 29].



Rys. 4. Wzmacnianie sygnału metodą "kanapkową" wg A Latos-Bieleńskiej [29]

ZASTOSOWANIE ISH W GENETYCE SOMATYCZNEJ I GENETYCE ROZWOJU

3.1. Ekspresja proto-onkogenów komórkowych, których produkty znajdują się na terenie jąder komórkowych w interakcji z DNA (c-myc, c-myb, c-fos) jest wyrażona w zależności od stanu proliferacji lub różnicowania ukierunkowanej linii komórek homopoetycznych. Badania hybrydyzacji in situ dowiodły, że niepobudzone, dojrzałe komórki nie manifestują wykrywalnych poziomów ekspresji tych proto-onkogenów [11, 24]. Jeżeli sonda oligonukleotydowa była komplementarna do mRNA pierwszego egzonu c-myc (koniec 3' obejmujący nukleotydy

3.2. Aby sprawdzić, które komórki z mikrośrodowiska hemopoetycznej i populacje krążących limfocytów wytwarzają czynniki wzrostowe, analizowano po hybrydyzacji in situ z odpowiednim antysensownym mRNA, wyznakowanym ³⁵S-UTP produkcję odpowiednich mRNA w komórkach z krwi obwodowej i szpiku, wstępnie rozdzielonych w sorterze komórkowym (FACS), a następnie wirowaniem na roztworach perkolu [52]. Zdolnymi do produkcji czynników wzrostowych okazały się limfocyty T₄, T₈, TK i ich liczba i intensywność produkcji znacznie się zwiększyły, gdy potraktowano je w hodowli dużymi dawkami IL-2. Do pozytywnej kontroli czułości testu posłużyła linia T komórkowa gibona MLA 144, wydzielająca duże ilości IL-2 oraz GM-CSF.

314–359), to sygnał był widoczny w cytoplazmie komórek plazmatycznych w *myeloma multiplex*, a nie w komórkach chłoniaka Burkitta, w których pierwszy egzon *myc* jest uszkodzony w wyniku translokacji t(8;14) [44].

3.3. Metodą ISH wykryli Dolf i wsp. [10] w metafazach linii komórek raka jelita grubego DiFi obecność powielonych genów receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) na terenie podwójnych, malutkich (DM – *double minutes*) skupisk chromatyny pozachromosomowej. Wiadomo było, m.in. z prac Carrola i wsp. [6] oraz Nowella i wsp. [36], że twory DM, jak i HSR (homogenicznie barwiące się regiony chromosomów) stanowią miejsca amplifikacji onkogenów komórkowych. Jednak dopiero metoda ISH udokumentowała fakt, że amplifikacja EGFR może odbywać się przez pozachromosomowe pośredniki w rodzaju epizomów lub DM. Jest to o tyle interesujące, że śródkomórkowa domena białka błonowego receptora EGF jest identyczna z produktem transformującego onkogenu *erb-B* o aktywności kinazy białkowej. Daje on stałe sygnały proliferacji niezależnie od ligandu, a stopień amplifikacji kodującego go genu koreluje ze stopniem tumorogenności.

3.4. Metoda ISH kontynuuje i pogłębia aktualnie realizowany rozdział biologii molekularnej, wyznaczający strukturalne homologie pomiędzy genami transformującymi a genami morfogenezy. Wiadomo, że proto-onkogeny są normalnymi i własnymi genami komórkowymi, których produkty odgrywają podstawową rolę w proliferacji i różnicowaniu komórek. Mutacje lub translokacje tych genów przemieniają je w elementy aktywne w złożonych procesach nowotworowych. W większości są one homologiczne z sekwencjami DNA czynników wzrostowych, receptorów czynników wzrostowych, białek G lub innych białek uczestniczących w przekazywaniu sygnałów, o własnościach wiązania DNA. Te homologie można znaleźć niezależnie od metody ISH porównując np. przewidziane sekwencje polipeptydowe produktu takiego genu i znane sekwencje z biblioteki genomowej. W taki sposób grupa hematologów w szpitalu Hammersmith w Londynie doszła do wniosku, że sekwencje kodujące 118 aminokwasów, obecne w genie ostrej białaczki szpikowej podtyp AML 1, są homologiczne w 68% do genu *runt*, kodującego u *Drosophila melanogaster* białko jądrowe kontrolujące morfogenezę [8]. Ekspresja niektórych komórkowych proto-onkogenów ma więc miejsce w czasie rozwoju osobniczego i jest regulowana w chrononie i topologii. Wróćmy do hybrydyzacji *in situ*. Przykładem stosowania metody ISH w tej dziedzinie jest proto-onkogen *int-1* aktywny w mysim raku sutka. Jego ekspresja w procesach embriogenezy myszy przypada na ścisły okres od 8,5. do 13. dnia [15]. Analiza lokalizacji *int-1* RNA za pomocą ISH w skrawkach tkanek rozwijającego się embrionu wskazała, że początek jego transkrypcji ma miejsce w subpopulacji komórek płytki nerwowej i jednocześnie wyjaśniła, że różnicowanie sąsiedniego neuroepithelium zachodzi jeszcze przed zamknięciem cewy nerwowej. Homologiczny gen u *Drosophila* (*Dint-1*) okazał się być dosyć popularnym genem, nazywanym dotychczas *wg* od *wingless*, ponieważ jego mutacja pozbawia te owady skrzydeł. Następne badania ISH wykazały ekspresję genu *Dint* w wąskim paśmie komórek blisko brzegów poszczególnych segmentów skrzydeł muszki owocowej.

Podobny przebieg miały badania z genem przeciwnowotworowym, którego brak lub delecja przyczyniają się do powstania guza Wilmsa, nowotworu nerki embrionalnej [39]. Nowotwór ten jest częścią składową zespołu wad rozwojowych, nazwanego w skrócie WAGR (od *Wilms tumor*, *Aniridia*, *Genito-urinary anomalies*, *mental Retardation*). Patogenezę tego zespołu wiąże się z defektem różnicowania mezenchymalnej komórki macierzystej i utraty funkcji genu przeciwnowotworowego, którego delecję stwierdzono metodą cytogenetyczną

w regionie 11p13. Wgląd w rolę transkryptu tego genu w embriogenezie i onkogenezie uzyskano metodą ISH w sondą komplementarnego mRNA w skrawkach histologicznych tkanek układu moczowo-płciowego i nowotworu nerki. Ekspresja tego genu nastąpiła w podocytach i bardziej prymitywnym pranerczu, co stanowi argument na jego znamiennej rolę w rozwoju funkcji filtracji nerki. Towarzyszące anomalie układu płciowego wynikają z plejotropowego wpływu mutacji genu Wilmsa. Ekspresja genu manifestowała się bowiem w trzech tkankach: listewce płciowej, płodowych gonadach i mezothelium [39].

3.5. Ostatni aspekt metody ISH dotyczy wykrywania obcego DNA, na przykład wirusowego [49]. W komórkach docelowych wirusa AIDS można tą metodą wykryć sekwencje kwasów nukleinowych HTLV-III [18], a w komórkach linii hodowanych *in vitro* – zakażenie wirusem opryszczki i cytomegalii [13]. Metoda ISH pozwoliła ostatnio na wykrycie miejsc integracji retrowirusów endogennych w chromosomach metafazalnych człowieka.

Jak wiadomo, wirusowy RNA jest przepisany odwrotną transkryptazą na "DNA gospodarza". Jest to jednak obcy DNA. Sondy molekularne dotyczyły retrowirusów HERV¹ 4.1, a sygnał wykryli Taruscio i Manuelidis [46] w postaci skupisk w okolicach prążków T, czyli telomerach. Rozkład miejsc integracji HERV 4.1 nie różnił się w badaniach metafaz osobnika rasy kaukaskiej i azjatyckiej i co więcej, wobec stałej pozycji i niezmiennych sekwencji DNA, ten typ retrowirusów endogennych okazuje się być bardzo stabilnym elementem ludzkiego genomu o minimalnej ruchliwości. Prążki telomerowe, bogate w G-C, mieszczące ok. 50% kopii HERV cechuje znana skłonność do złamań i gorących punktów (*hot spots*) po napromienieniu. Taka asocjacja sugeruje autorom, że HERV mogą posługiwać się tymi miejscami w sposób wybiórczy w czasie cykli amplifikacji i reintegracji lub że odwrotnie integracja HERV przyczynia się do strukturalnej łamliwości tych domen chromosomowych [46].

PODZIĘKOWANIE

Serdecznie dziękujemy Pani doc. dr hab. Annie Latos-Bieleńskiej za umożliwienie nam wykonania doświadczeń w Jej Zespole w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu i za szereg cennych wskazówek praktycznych.

LITERATURA

- [1] ARRAND JE. Preparation of nucleic acid probes. [w] Nucleic acid hybridization. BD Hames, SJ Higgins [red.]. Oxford IRL Press 1985: 30–32.
- [2] ARNOLDUS EPI, WIEGANT J, NOORDEMEER IA, WESSELS JW, BEVERSTOCK CC, GROSVELD GC, van der PLOEG M, RAAP AK. Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. *Cytogen Cell Genet* 1990; 54: 108–111.
- [3] BRIGATI DJ, MYERSON D, LEARY JJ, SPALHOLZ B, TRAVIS SZ, FONG CKY, HSIUNG GD, WARD DC. Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. *Virology* 1983; 126: 32–50.
- [4] BRITTEN RJ, DAVIDSON EH. Hybridization strategy. [w] Nucleic acid hybridization. Hames BD, Higgins SJ [red.] Oxford IRL Press 1985: 3–15.

¹ *Human Endogenous Retroviruses*

- [5] BURNS J, CHAN VTW, JONASSON, FLEMING K, TAYLOR S, McGEE J. Sensitive system for visualising biotinylated DNA probes hybridised in situ: rapid sex determination of intact cells. *J Clin Pathol* 1985; **38**: 1085–1092.
- [6] CARROLL SM, deROSE ML, GAUDRAY P, MOORE CM, NEEDHAM-VANDEVANTER DR, van HOFF DD, WAHL GM. Double minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 1525–1533.
- [7] CHEUNG SW, SUN L, FEATHERSTONE T. Molecular cytogenetic evidence to characterize breakpoints in Robertsonian translocations. *Cytogen Cell Genet* 1990; **54**: 97–102.
- [8] DAGA A, TIGHA JE, CALABI F. Leukemia/*Drosophila* homology. *Nature* 1992; **356**: 484.
- [9] DIRKS RW, van GIJLSWIJK RPM, TULLIS RH, SMIT AB, van MINNEN J, van der PLOEG M, RAAP AK. Simultaneous detection of different mRNA sequences coding for neuropeptide hormones by double in situ hybridization using FITC- and biotin-labeled oligonucleotides. *J Cytochem Histochem* 1990; **38**: 467–473.
- [10] DOLF G, MEYN RE, GURLEY D, PRATHER N, STORY MD, BOMAN BM, SCILIANO MJ, HEWITT RR. Extrachromosomal amplification of the epidermal growth factor receptor gene in a human colon carcinoma cell line. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1991; **3**: 48–54.
- [11] EMILIA G, DONELLI A, FERRARI S, TORELLI U, SELLERI L, ZUCCHINI P, MORETTI L, VENTURELLI D, CECCHERELLI G, TORELLI G. Cellular levels of mRNA from c-myc, c-myb and c-fes onc genes in normal myeloid and erythroid precursors of human bone marrow: an in situ hybridization study. *Br J Haematol* 1986; **62**: 287–292.
- [12] GARSON JA, van der BERGHE JA, KEMSHEAD JT. High-resolution in situ hybridization technique using biotinylated NMYC oncogene probe reveals periodic structure of HSRs in human neuroblastoma. *Cytogen Cell Genet* 1987; **45**: 10–15.
- [13] GENTILOMI G, MUSIENI M, GIBELLINI D, GALLINELLA S, VENTUROLI S. Double in situ hybridization for detection of Herpes Simplex Virus and Cytomegalovirus DNA using non-radioactive probes. *J Cytochem Histochem* 1992; **40**: 421–426.
- [14] GERHARD DS, KOWASAKI ES, BENCROFT FC, SZABO P. Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 3755–3759.
- [15] GUERRERO I. Proto-oncogenes in pattern formation. *TIG* 1987; **3**: 269–272.
- [16] HARPER ME, MARSELLE LM. In situ hybridization-application to gene localization and RNA detection. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; **19**: 73–80.
- [17] HARPER ME, SAUNDERS GF. Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma (Berl.)* 1981; **83**: 431–439.
- [18] HARPER ME, MARSELLE LM, GALLO RC, WONG-STAAAL F. Detection of HTLV III infected lymphocytes in lymph node and peripheral blood from AIDS patients by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 772–774.
- [19] HAASE AT, WALKER D, STOWRING L, WENTURA P, GEBALLE A, BLUM H, BRAHIC M, GOLDBERG R, O'BRIEN K. Detection of two viral genomes in single cell by double-label hybridization in situ and color microautoradiography. *Science* 1985; **227**: 189.
- [20] HENDERSON AS, WARBURTON D, AKWOOD KC. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; **69**: 3394–3398.
- [21] HERRMANN G, HERRMANN D. In situ-Hybridisierung. *Pathologie* 1988; **9**: 130–136.
- [22] HUEBNER K, ISOBE M, CROCE CM. The human gene encoding GM-CSF is at 5q21-q23, the chromosome region deleted in the 5q-anomaly. *Science* 1985; **230**: 1282–1285.
- [23] HUTCHISON NJ, LANGER-SAFER PR, WARD DC, HAMKALO BA. In situ hybridization at the electron microscope level: hybrid detection by autoradiography and colloidal gold. *J Cell Biol* 1982; **95**: 609–618.
- [24] KASTEN MB, STONE KD, CIVIN CI. Nuclear oncoprotein expression as a function of lineage, differentiation stage and proliferation status of normal human hematopoietic cells. *Blood* 1989; **74**: 1517–1524.
- [25] KOCH J, KLVRAA S, BOLUND L. An improved method of labelling of DNA probes by nick translation. *Nucl Acid Res* 1986; **14**: 7132.
- [26] KUO WL, TENJIN H, SEGRAVES R, PINKEL D, GOLBUS MS, GRAY J. Detection of aneuploidy involving chromosomes 13,18 or 21, by fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 112–119.
- [27] KUWANO A, LEDBETTER SA, DOBYNS WB, EMANUEL BS, LEDBETTER DH. Detection of deletions and cryptic translocations in Miller-Dieker Syndrome by in situ hybridization. *J Hum Genet* 1991; **49**: 707–714.
- [28] LANGER PR, WALDROP AA, WARD DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 6633–6637.

- [29] LATOS-BIELEŃSKA A. Hybrydyzacja in situ w cytogenetyce. [w] PAN, Kom. Genet. Człow. [red.] *Biuletyn Informacyjny*, Warszawa 1990; **2**: 31–41.
- [30] LATOS-BIELEŃSKA A, KLETT C, JUST W, HAMEISTER H. Refinement of localization of the human genes for myeloperoxidase (MPO), protein kinase C alpha polypeptidase PRKCA and the DNA fragment DI7S21 on chromosome 17q. *Hereditas* 1991; **115**: 69–72.
- [31] LUX SE, TSE WT, MENNINGER JC, JOHN KM, HARRIS P, SHALEV O, CHILCOTE RR, MARCHESI SL, WATKINS PC, BENNET V, MCINTOSH S, COLLINS FS, FRANCKE U, WARD DC, FORGET BG. Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8. *Nature* 1990; **345**: 736–739.
- [32] MAGGINI F, CREMONINI R, ZOLFINO C, TUCCI GF, D'OVIDIO R, DERLE V, DePACE C, SCARASCIA MUNGOZZA GT, CIONINI PG. Structure and chromosomal localization of DNA sequences related to ribosomal subrepeats in *Vicia faba*. *Chromosoma* 1991; **100**: 229–234.
- [33] MANUELIDIS L, LANGER-SAFER PR, WARD DC. High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes. *J Cell Biol* 1982; **95**: 619–625.
- [34] MORTON CC, DUBY AD, EDDY KL, SHOWS TB, SEIDMAN JG. Genes of beta chain of human T cell antigen receptor map to regions of chromosomal rearrangements in T cells. *Science* 1985; **228**: 582–585.
- [35] NEUMANN R. Die Technik der Nukleinsäurehybridisierung und ihre Bedeutung für diagnostische Fragestellungen. *Naturwissenschaften* 1987; **74**: 125–133.
- [36] NOWELL P, FINANZ J, DALLA-FAVERA R, GALLO RC, CROCE CM. Association of amplified oncogene c-myc with an abnormally banded chromosome 8 in a human leukaemic cell line. *Nature* 1983; **306**: 494–497.
- [37] PARDUE ML. In situ hybridization. [w] Hames BD, Higgins SJ [red.] *Nucleic acid hybridization*. Oxford IRL Press 1985: 179–202.
- [38] Van der PLOEG M. Hybridocytochemistry – state of the art. *Post Biol Kom* 1989; **16**: 349–363.
- [39] PRITCHARD-JONES K, FLEMING S, DAVIDSON D, BICKMORE W, PORTEUS D, GOSDEN C, BARD J, BUCKLER A, PELLETIER J, HOUSMAN D, van HEYNINGEN V, HASTIE N. The candidate Wilms tumor gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990; **345**: 194–196.
- [40] RIED T, MAHLER V, VOGT P, BLONDEN L, van OMMEN GJB, GREMER T, CREVER M. Direct carrier detection by in situ suppression hybridization with cosmid clones of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. *Hum Genet* 1990; **85**: 581–586.
- [41] RIGBY PWJ, DIECKMANN M, RHODES C, BERG P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA Polymerase I. *J Mol Biol* 1977; **113**: 237–251.
- [42] ROWLEY JD, DIAZ MO, ESPINOSA R, PATEL YD, van MELLE E, ZIEMIN S, TAILLON-MILLER P, LICHTER P, EVANS GA, KERSEY JH, et al. Mapping chromosome band 11q23 in human acute leukaemia with biotinylated probes: identification of 11q23 translocation breakpoints with a yeast artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 9358–9362.
- [43] SABER MA, NOVIKOFF PM, SHAFRITZ DA. Albumin and collagen mRNA expression in normal and analbuminemic rodent liver: analysis by in situ hybridization using biotinylated probes. *J Histochem Cytochem* 1990; **38**: 199–207.
- [44] SEIBEL NL, KIRSCH IR. Tumor detection through the use of immunoglobulin gene rearrangements combined with in situ hybridization. *Blood* 1989; **74**: 1791–1795.
- [45] SPEEL EJM, SCHUTTE B, RAMAEKERS FCS, HOPMAN AHN. The effect of avidin-biotin interactions in detection systems for in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1992; **40**: 135–141.
- [46] TARUSCIO D, MANUELIDIS L. Integration site preferences of endogenous retroviruses. *Chromosoma* 1991; **101**: 141–156.
- [47] TKACHUK DC, WESTBROOK CA, ANDREEFF M, DONLON TA, CLEARY ML, SURYANARAYAN K, HONGE M. Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. *Science* 1990; **250**: 559–562.
- [48] TRASK BJ, MASSA H, KENWRICK S, GITSCHIER J. Mapping of human chromosome Xq28 by two-color fluorescence in situ hybridization of DNA sequences to interphase cell nuclei. *Am J Hum Genet* 1991; **48**: 1–15.
- [49] UNGER ER, BUDGEON LR, MYERSON D, BRIGATI DJ. Viral diagnosis by in situ hybridization. *Am J Surg Pathol* 1986; **10**: 1–8.
- [50] WEIER HU, ZITZELSBERGER HF, GRAY JW. Non-isotopical labeling of murine heterochromatin in situ by hybridization with in vitro synthesized biotinylated gamma (major) satellite DNA. *BioTechniques* 1991; **10**: 498–505.
- [51] WARREN LJ, DONLON TA, LEO RV, GREENE WC. Localization of the gene encoding the human interleukin-2 receptor on chromosome 10. *Science* 1985; **228**: 1547–1549.

- [52] WIMPERIS JZ, NIEMAYER CM, SIEFF CA, MATHEY-PREVOT B, NATHAN DG, ARCECI RJ. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-3 mRNAs are produced by a small fraction of blood mononuclear cells. *Blood* 1989; **74**: 1525–1530.
- [53] ZABEL M. Hybrydocytochemia w badaniach nad regulacją genu kalcytyninowego w komórkach parafolikularnych tarczycy. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 47–53.
- [54] ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA J, MODARSKI M. Sondy DNA komplementarne do rDNA - ich zastosowanie w mikrobiologii. *Post Hig Med Dośw* 1991; **45**: 157–171.
- [55] ZHANG FR, HEILIG R, AURIAS A. A one-step efficient and specific non-radioactive non-fluorescent method for in situ hybridization of banded chromosomes. *Chromosoma* 1990; **99**: 436–439.

Otrzymano: 23.06.1992 r.

Przyjęto: 02.09.1992 r.

Adres autora: Lublin, ul. Radziwiłłowska 11

PRZEPIY W SUBSTANCJI POMIĘDZY CYTOPLAZMĄ A JĄDREM KOMÓRKOWYM

THE FLOW OF SUBSTANCES BETWEEN THE CYTOPLASM AND NUCLEUS

A. HORST

Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Streszczenie. Czynność aparatu genetycznego komórki wymaga stałego przepływu substancji z cytoplazmy do jądra komórkowego i na odwrót. Jak wiadomo, synteza białek, w tym enzymów niezbędnych do replikacji DNA (polimeraza DNA), jak również enzymów niezbędnych do transkrypcji, oraz dodatkowych czynników dla tych reakcji odbywa się wyłącznie w cytoplazmie. Z kolei synteza czynników jądrowych (transkrypcja DNA na mRNA, tRNA, rRNA) wraz z ich obróbką odbywa się wyłącznie w jądrze komórkowym. Z tego wypływa wniosek, że wobec przedzielenia jądra i cytoplazmy przez otoczkę jądrową, składającą się z niejako podwójnej błony komórkowej, musi istnieć specyficzny mechanizm transportowy, powodujący przejście odpowiednich ilości i jakości substancji z cytoplazmy do jądra komórkowego i na odwrót z jądra do cytoplazmy. Przeprowadzone badania wykazały, że transport z cytoplazmy do jądra jest głównie transportem czynnym, odbywającym się przez pory otoczki. Przenoszone substancje noszą na sobie krótkie pasmo reszt aminokwasowych stanowiących znacznik pozwalający na ich rozpoznanie przez aparat transportujący, tj. porę otoczki jądrowej. Transport z jądra komórkowego do cytoplazmy jest mniej poznany. Wiele przemawia za tym, że transport ten przedstawia się podobnie, a znacznikiem dla tego transportu zdaje się być *cap* na końcu 5' transportowanych RNA.

Summary. The function of the genetic apparatus of cells depends on permanent flow of substances from the cytoplasm into the nucleus and vice versa from the nucleus into the cytoplasm. As is well known, the synthesis of proteins – enzymes indispensable for DNA replication (DNA-polymerase), and enzymes for transcription of DNA into mRNAs, tRNAs, rRNAs (RNA polymerase I, II and III) including other factors for these reactions are solely done in the cytoplasm. Alternately, the transcription of nuclear elements (DNA into mRNA, tRNA, rRNA and others) is fulfilled and prepared only in the nucleus. A conclusion arises that because of separation of these two cellular compartments by nuclear envelope, composed of kind of a double cellular membrane, there must exist a mechanism enabling a qualitative and quantitative transport of substances from the cytoplasm into the nucleus and vice versa from the nucleus into the cytoplasm. Performed experiments showed that the transport from the cytoplasm into the nucleus is principally an active one through the nuclear pore and the transported substances have a short band of amino acid residues which play the role of a marker recognized by the transporting apparatus i.e. the proteins of the nuclear pore. The transport from the nucleus into the cytoplasm is less known, but it seems that there exists a similar mechanism of transport and the marker recognized by the transporting apparatus seems to be the cap on the 5' end of the transported RNA.

Wykaz ważniejszych skrótów: NLS – sygnał dla lokalizacji jądrowej białka (*nuclear localization signal or sequence*), NBP – białko wiążące się z NLS (*NLS-binding protein*), m⁷GpppG – w formie skrótowej m⁷G stanowi *cap* – guanina

metylowana w pozycji 7., m^3GpppG – w formie skrótowej m^3G lub m_3G – trójmetyloguanina stanowi strukturę *cap* dla snRNA serii U, U snRNA – bez *cap*.

WSTĘP

Wyodrębnienie się jądra komórkowego w toku ewolucji komórki miało z pewnością istotne znaczenie dla funkcji jądra jako aparatu genetycznego komórki. Wytworzenie otoczki jądrowej, składającej się niejako z podwojonej błony komórkowej z jednej strony z warstwą lamin, stanowiącej szkielet, na którym jest zbudowana chromatyna, zaś z drugiej strony połączonej z siateczką endoplazmatyczną, stanowiącą aparat syntetyzujący białka, miało istotne znaczenie w rozwoju tych dwóch przedziałów komórki. Tak zbudowana otoczka jądrowa wskazuje na szczelniejsze rozgraniczenie zawartości jądra komórkowego od cytoplazmy i na odwrót, anizeli to jest możliwe w przypadku błony komórkowej. Rozgraniczenie to nie może być jednak całkowite. Przez błonę komórkową przechodzą substancje albo poprzez dyfuzję od większego stężenia w kierunku do mniejszego, jednak częściej transport ten odbywa się dzięki specyficznym mechanizmom w zależności od rodzaju przechodzącej przez błonę substancji (np. lipidy mogą swobodnie przenikać przez warstwę lipidową błony, podczas gdy w przypadku rozpuszczalnych w wodzie białek i węglowodanów występują specyficznym wytworzone mechanizmy transportujące).

W odróżnieniu od błony komórkowej, przez którą w zasadzie substancje mogą przechodzić w każdym miejscu błony, transport przez otoczkę jądrową odbywa się przez wyraźnie odgraniczone otwory, zwane porami, stanowiące rodzaj organelli komórkowych, selektywnie przepuszczających substancje tak w jednym, jak i w drugim kierunku. Dyfuzja jako mechanizm nieselektywny odgrywa prawdopodobnie tylko małą rolę, co zdaje się wynikać z tego, że nawet substancje o małej masie cząsteczkowej (np. tRNA) są również selektywnie transportowane przez pory otoczki. Wysoce selektywny transport przez otoczkę jądrową konieczny jest dla sprostania zadaniu dostarczania w odpowiedniej ilości i jakości substancji z cytoplazmy do jądra w celu zapewnienia jego normalnej funkcji jako aparatu genetycznego komórki, jak również dostarczania do cytoplazmy produktów jądra komórkowego, aby zapewnić produkcję białek, niezbędnych do wykonywania zarówno czynności jądra komórkowego, jak i całego wielokomórkowego organizmu. W ten sposób otoczka jądrowa spełnia ważne zadanie regulacji czynności aparatu genetycznego komórki, jak i komórki jako producenta białek ustrojowych.

Z badań genetycznych wynika, że w jądrze komórkowym znajduje się zapis informacji genetycznej w postaci DNA, który w przypadku podziału komórki musi ulec podwojeniu (replikacji DNA), zaś w przypadku ekspresji genów DNA musi ulec transkrypcji na różnego rodzaju RNA (mRNA, tRNA i rRNA). Wszystkie te procesy wymagają dopływu z cytoplazmy odpowiednich enzymów: polimerazy DNA dla jego replikacji oraz polimeraz RNA DNA-zależnych I, II i III dla transkrypcji odpowiednio rRNA, mRNA i tRNA. Ponadto przebieg tych reakcji wymaga dopływu z cytoplazmy szeregu dalszych czynników, bez których reakcje te nie mogą się odbywać. Wreszcie produkty genów muszą przechodzić z terenu jądra do cytoplazmy, gdzie odbywa się synteza zarówno białek ustrojowych, jak i wyżej wymienionych białek jądrowych przechodzących z cytoplazmy do jądra komórkowego. W ten sposób otoczka jądrowa spełnia ważne zadanie regulacji ekspresji genów. Jedne z czyn-

ników transkrypcji przebywają stale w cytoplazmie, inne w jądrze komórkowym i dopiero przejście czynników z cytoplazmy do jądra powoduje niemal natychmiastową aktywację genu i transkrypcję [30]. Jak żywy jest ten ruch, najlepiej dowodzi liczba 100 do 500 cząsteczek histonów na minutę przechodzących z cytoplazmy na teren jądra w fazie S (syntezy) cyklu komórkowego, kiedy nowo zsyntetyzowany DNA musi łączyć się z histonami [55].

Zgodnie z badaniami Blobel ruch cząsteczek w komórce i jej organellach nie odbywa się chaotycznie, lecz jest ściśle ukierunkowany istnieniem odpowiednich barier i kanałów [7]. Taką barierą w otoczce jądrowej jest pora stanowiąca kompleks złożony z kilkudziesięciu, w większości dotąd niepoznanych białek.

Pora stanowi najważniejszy element otoczki jądrowej. W obrębie otoczki występują dwie błony:

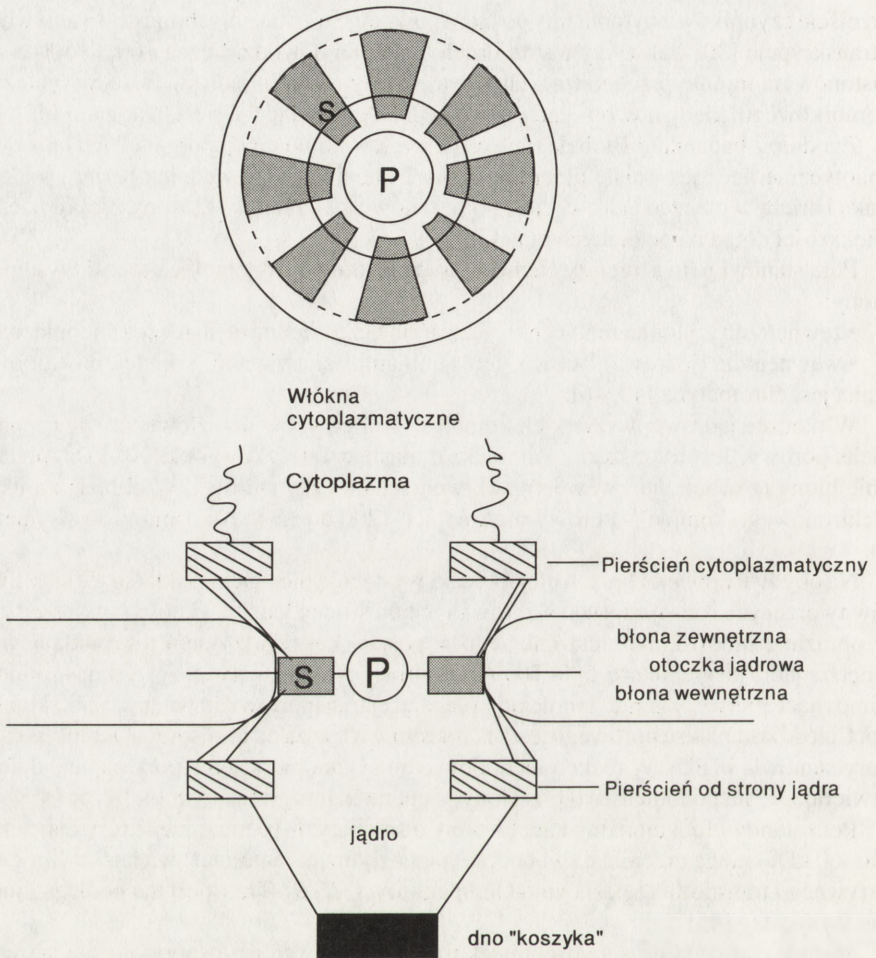
- zewnętrzna (cytoplazmatyczna) łącząca się bezpośrednio z siateczką endoplazmatyczną,
- wewnętrzna (jądrowa) łącząca się z laminami stanowiącymi szkielet, na którym zbudowana jest chromatyna [40, 46].

W otoczce jądrowej wszystkich komórek – od grzybów do człowieka – występuje kompleks porowy. Jest to obszerny kompleks o masie cząsteczkowej ok. 10^8 kDa, przenikający obie błony (zewnętrzną i wewnętrzną) tworzące otoczkę jądrową. W obrazie z mikroskopu elektronowego kompleks porowy ma średnicę 1200 do 1500 Å i ośmiokrotną symetrię (rys. 1).

Na obydwu powierzchniach błon otoczki występują pierścienie, składające się z 8 segmentów tworzących rodzaj szprych skierowanych do środka kanału. Całość pory przedstawia się w obrazie z mikroskopu elektronowego w postaci koszyka z dnem uwypuklającym się do wnętrza jądra na głębokość 500–700 Å. Od strony cytoplazmatycznej wystają krótkie włókna stanowiące pierwszy kontakt molekuly ulegającej transportowi do wnętrza jądra komórkowego. Całość kompleksu porowego jest ok. 3-krotnie większa od rybosomu. Około 5% całej masy pory stanowią białka. W reakcji na odpowiedni sygnał pierścienie pory ulegają deformacji i otwierają się na podobieństwo przesłony w aparacie fotograficznym [4, 54, 56].

Pora stanowi funkcjonalny kanał wodny o średnicy 9–10 nm, przez który małe cząsteczki (40–60 kDa) mogą przenikać swobodnie (przez dyfuzję), natomiast większe tylko za pomocą aktywnego transportu (zależnego od temperatury i ATP). Transport ten podlega kinetycznemu wysyceniu [45].

Metodą poznania właściwości białek transportowanych przez pory otoczki jądrowej były przede wszystkim badania poprzez mikroiniekcje białek do cytoplazmy. Transport przez pory otoczki jest dwukierunkowy i polega na: selektywnym wnikaniu białek do jądra komórkowego oraz wychodzeniu z jądra do cytoplazmy podjednostek rybosomowych i różnych RNA [24]. Niejądrowe białka o masie mniejszej niż 20–40, a nawet 60 kDa przechodzą prawdopodobnie przez pory otoczki jądrowej bez przeszkód (drogą dyfuzji) w obydwu kierunkach, natomiast większe białka nie przechodzą, co jest charakterystyczne dla wodnego środowiska kanału por. Z kolei białka jądrowe, wstrzyknięte do cytoplazmy, przechodzą niezależnie od wielkości do jądra komórkowego, gdzie ulegają zagęszczeniu. Powyższe dane dowodzą, że przechodzenie białek jądrowych z cytoplazmy do jądra komórkowego jest niezależne od ich syntezy lub konformacyjnych modyfikacji, np. poprzez częściową proteolizę [11].



Rys. 1. Schemat pory jądrowej (przerysowane za Nigg, Beauerle i Lührmann [45]); u góry widok z góry, u dołu widok z boku (na podstawie badań z mikroskopu elektronowego): P – czop, S – kolce utrzymujące czop

SYGNALNE CECHY BIAŁEK WARUNKUJĄCYCH PRZENIKANIE Z CYTOPLAZMY DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO

Aby białko przeszło z cytoplazmy do jądra komórkowego, musi ono mieć krótki ciąg reszt aminokwasowych stanowiących sygnał do przejścia przez porę jądra. Pierwsi De Robertis i wsp. w 1978 roku sugerowali istnienie sygnału na powierzchni białka, ukierunkowującego jego przejście do jądra komórkowego [16, 31]. Bezpośredniego dowodu istnienia sygnału powodującego przejście danego białka do jądra komórkowego dostarczyły badania nukleo-

plazminy – najobfitszego białka jądrowego jaja *Xenopus laevis* [15]. Białko to wstrzyknięte do cytoplazmy oocytu natychmiast przechodzi do jego jądra. Nukleoplazmina jest pentamerem, którego każda podjednostka ma chroniony rdzeń i eksponowany C-terminalny koniec w postaci "ogona". Po usunięciu wszystkich "ogonów" pentamerowy rdzeń pozostaje na stałe w cytoplazmie. Do przejścia tego rdzenia do jądra komórkowego wystarczy dołączenie do niego chociażby tylko jednego "ogona". Im więcej "ogonów" dołączono do rdzenia, tym szybciej przechodzi to białko do jądra. Z kolei część rdzeniowa pentameru nukleoplazminy wstrzyknięta do jądra komórkowego pozostaje tam na stałe. Przedstawione badania dowodzą, że do przejścia pentameru nukleoplazminy do jądra niezbędne są jej C-terminalne "ogony", natomiast do jego retencji w jądrze "ogon" nukleoplazminy nie jest potrzebny. Stąd wniosek, że C-terminalny koniec nukleoplazminy zawiera sygnał do jego przejścia z cytoplazmy do jądra komórkowego [15].

Dalsze badania zmierzały do precyzyjnego określenia, jakie reszty aminokwasowe biorą udział w tworzeniu sygnału dla lokalizacji jądrowej białka, zwanego z angielska NLS (*nuclear localization sequence* lub *signal*). Wykazano, że niekiedy wystarczy, jak w przypadku dużego antygenu T wirusa SV40, substytucja reszty lizyny w poz. 128 treoniną lub asparaginą, aby białko to występujące normalnie w jądrze komórkowym stało się białkiem cytoplazmatycznym, mimo że zachowało ono swoją właściwość wiązania się z DNA [37].

W wyniku dalszych badań, stosując różne mutanty dużego antygenu T wirusa SV40, stwierdzono, że sekwencja Pro-Lys-Lys-Lys-Arg- Lys-Val występująca w tym białku stanowi sygnał do jego przejścia z cytoplazmy do jądra komórkowego [33]. Okazało się, że wymieniona sekwencja reszt aminokwasowych dołączona do białka niejądrowego, jakim jest kinaza pirogronianowa, powoduje jego przejście do jądra komórkowego. Następne badania wykazały, że wymieniony krótki fragment (poz. 126/127–132) jest wprawdzie wystarczający do skierowania danego białka do jądra komórkowego, jednak dodanie sąsiadujących sekwencji znacznie wpływało na przyspieszenie procesu przechodzenia białka do jądra komórkowego. O ile dołączenie sekwencji następujących reszt aminokwasowych (poz. 127–147) nie przyspieszyło tego transportu, który tak jak poprzednio wynosił ok. 15 godzin, to dołączenie poprzedzających sekwencji (poz. 111–135) spowodowało jego znaczne przyspieszenie (do \pm 15 min) [51]. Badania wykazały, że wprawdzie we fragmencie 111–125 nie ma dodatkowego sygnału NLS warunkującego przejście białka z cytoplazmy do jądra komórkowego, to nie bez znaczenia zdają się być w tym dodatkowym fragmencie miejsca ulegające fosforylacji [51]. Tym samym wydaje się, że fosforylacja może odgrywać pewną rolę w transporcie białek z cytoplazmy do jądra komórkowego.

Sekwencje NLS mogą być pojedyncze, podwójne lub dwuczęściowe (tab. 1) [54]. Ogólnie NLS charakteryzują się sekwencjami bogatymi w aminokwasy zasadowe (lizyna, arginina); na obrzeżach tych sekwencji zazwyczaj występują reszty glicyny lub proliny, tj. aminokwasy umożliwiające zmiany konformacji cząsteczki białka, niezbędnej dla wyeksponowania fragmentu NLS na powierzchnię białka mającego ulec transportowi do wnętrza jądra komórkowego. NLS mogą występować w każdym miejscu cząsteczki, najczęściej jednak występują w jej części hydrofilnej, natomiast w białkach wielofunkcyjnych zazwyczaj w zawiasowej domenie. Z reguły NLS występują na powierzchni białek jądrowych tak, aby były łatwo rozpoznawane przez odpowiedni receptor (białko wiążącego się z NLS z ang. NBP – od *NLS-binding protein*). W sąsiedztwie NLS zazwyczaj występują reszty aminokwasowe ulegające łatwo fosforylacji [51, 54].

Dwuczęściowy sygnał jądrowy (NLS) składa się zazwyczaj z sekwencji dwóch zasadowych reszt aminokwasowych, przedzielonych ok. 10 resztami niezasadowymi, po czym występuje druga część, składająca się zazwyczaj z ok. 6 zasadowych sekwencji (tab. 1).

TABELA 1. Sygnały lokalizacji jądrowej (wg Schreiber, de Murcia i Menissier-de Murcia [54])

Białko	Poz. sekwencji	Seqwencja reszt aminokwasowych
I Białko z pojedynczym sygnałem		
antygen T SV40*	(123)**	STPP <u>KKKRK</u> VEDP***
Adenowirus E1A	(279)	PLDLSC <u>KRPRP</u> -(COOH)
Lamina A (człowiek)	(412)	GGGGV <u>KKR</u> LEST
SV40 VP1	(1)	(NH ₂)- <u>APTKRKG</u> SCPGAAP
PDGF (łańcuch A – czł.)	(192)	DTGR <u>PRESGKKRKR</u> LKTP-(COOH)
Adenowirus pTP	(317)	FVD <u>R</u> LPV <u>RRRRRR</u> VPPPP
Histon 28 (królik)	(24)	STSTDG <u>KKRS</u> KARKE
II Białko o dwóch sygnałach		
Białko rybosomalne L29		
(drożdże)	(1)	(NH ₂)-PSRFTK <u>TRK</u> HRGH (14) KGRIG <u>KHRKH</u> PPGG
Mat α 2 (drożdże)	(1)	(NH ₂)- <u>MNKIPIKDL</u> NNPO (140) VRILESWFAKNI
c-myc (człowiek)	(317)	KDYPA <u>AKRV</u> KLDSV (361) VLER <u>ORRN</u> ELKRSF
Antygen T wirusa polyoma	(186)	RTPV <u>SRKRPR</u> PAGA (277) ATPPK <u>KARE</u> DPAP
III Białko o dwuczęściowym sygnale		
Nukleoplazmina		
(<i>Xenopus</i>)	(149)	SPPKAV <u>KRPAAT</u> TKKAGO <u>AKKKK</u> LKDEKES
N1 (<i>Xenopus</i>)	(528)	SHLV <u>RKKRK</u> TTEESPLKDKDA <u>KKSK</u> QEPV
Polimeraza poly(ADP-rib)		
(człowiek)	(201)	G <u>YKSE</u> G <u>RKR</u> GDEVDGVD <u>EVA</u> KKK <u>SKKE</u> KDKDS
KIN 17 (mysz)	(234)	GSAASG <u>KR</u> K <u>ESSO</u> SSAOPAKKKK <u>SAL</u> DEIMEL
•p53*** (mysz)	(296)	LPPGSA <u>KRAL</u> P <u>TCT</u> SASPPQ <u>KKK</u> PLDGEY
•p53 (człowiek)	(299)	LPPGST <u>KR</u> ALPNNTSSSPQ <u>KKK</u> PLDGEY
•c-abl (mysz)	(587)	RLLPR <u>DRK</u> TNLFSA <u>LTKKKK</u> MMAP <u>TP</u> PKRS
•rec. progesteronu (królik)	(620)	CPACRL <u>RKCC</u> QAGMVLG <u>GRK</u> F <u>KKF</u> NKVRV
•rec. glukokortykoidów (szczur)	(492)	CPACRY <u>RKC</u> LOAGMNL <u>EARK</u> T <u>KKKIK</u> GIOOATAG

*Reszty aminokwasowe podane w jednoliterowym kodzie: Ala – A; Arg – R; Asn – N; ASP – D; Cys – C; Gln – Q; Glu – E; Gly – G; His – H; Ile – I; Leu – L; Lys – K; Met – M; Phe – F; Pro – P; Ser – S; Thr – T; Trp – W; Tyr – Y; Val – V. ** Liczby w nawiasach oznaczają pozycję podanej sekwencji reszt aminokwasowych. *** Sygnały lokalizacji jądrowej (NLS): wytłuszczone duże litery. Podkreślone sekwencje partycypują jako całość w transporcie dojądrowym. ****Kropka przed nazwą białka oznacza, że podana sekwencja jest sugerowana.

Samodzielnie obie zasadowe sekwencje NLS są z reguły niefunkcjonalne [54]. Z kolei wykazano, że mutacja każdej z oddzielnych reszt zasadowych w obrębie białka nukleoplazminy nie powoduje zahamowania jej przejścia do jądra komórkowego [52]. Zahamowanie przejścia nukleoplazminy do jądra komórkowego występuje dopiero wówczas, kiedy obie części NLS ulegają mutacji. Podobnie stwierdzono w przypadku białka N1 u *Xenopus*, wiążącego się z histonami H₃ i H₄, w którym również występuje dwuczęściowy NLS i dopiero mutacje obydwu części NLS powodują zahamowanie przejścia tego białka z cytoplazmy do jądra komórkowego [36]. Dane te potwierdzają również role reszt lizyny i arginy w NLS,

których substytucje spowodowane mutacją powodują zahamowanie transportu białka do jądra komórkowego.

Podwójny sygnał NLS może być też całkowicie niezależny. Na przykład białko Mat α 2 drożdży ma jeden sygnał NLS na końcu N-terminalnym i drugi pomiędzy resztami aminokwasowymi w poz. 140–151. Normalnie działającym jest sygnał na końcu N-terminalnym i dopiero mutacja tego NLS powoduje jego zastępowanie przez NLS znajdujący się pomiędzy resztami 140–151 [26].

Istotne znaczenie dla transportu białek do jądra komórkowego ma usytuowanie jego NLS. W wypadku zakotwiczenia fragmentu NLS do obcego białka, a zwłaszcza jego wtopienie do wnętrza cząsteczki – białko takie traci zdolność do przechodzenia do jądra komórkowego. Typowym przykładem jest włączenie NLS antygeny T wirusa SV40 do hydrofobowej części kinazy pirogronianowej, czego następstwem jest zahamowanie jej transportu do wnętrza jądra komórkowego [53]. Dane te dowodzą, że aby białko uległo transportowi do wnętrza jądra komórkowego, jego NLS musi być wyeksponowany na powierzchni cząsteczki.

BADANIA TRANSPORTU BIAŁEK Z CYTOPLAZMY DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO PRZY POMOCY SYNTETYCZNYCH PEPTYDÓW

Wiele danych odnośnie transportu białek z cytoplazmy do jądra komórkowego wniosły badania z użyciem syntetycznych peptydów oraz białek bezpośrednio nie związanych z NLS. Surowicza albumina bydłęca (BSA) albo cząstki złota koloidalnego sprzężone z syntetycznymi peptydami zawierającymi sekwencję NLS migrują do jądra komórkowego zarówno po wstrzyknięciu do cytoplazmy [19], jak i *in vitro* do izolowanych jąder komórek wątrobowych umieszczonych w ekstrakcie z jaj *Xenopus* [43]. Cząstki złota opłaszczane przez białka jądrowe (nukleoplazmina lub peptydy NLS antygeny T SV40) przechodzą wyłącznie przez pory otoczki do jądra komórkowego po ich wprowadzeniu do cytoplazmy jaj *Xenopus*, natomiast zmutowane białka jądrowe, pozbawione NLS, nie powodują przejścia cząstek złota do jąder komórkowych. Na podstawie tych danych określono, że przez pory otoczki jądrowej przechodzą cząstki do wielkości 250 Å [19]. Przed przejściem przez pory otoczki jądrowej opłaszczane cząstki złota układają się równolegle do cytoplazmatycznej błony otoczki [19, 43]. Szczegółowa analiza wykazała, że cząstki złota opłaszczane nukleoplazminą łączą się z włóknami w otoczeniu por otoczkowych, jak również z centralnym "czopem" pory, który prawdopodobnie stanowi właściwy "transporter" białka do jądra komórkowego [19].

Dla wykazania białkowych determinant powodujących transport danego białka do jądra komórkowego, skonstruowano hybrydę genów Mat α 2 drożdży kodującego jego transport do jądra komórkowego z genem *E. coli* λ ac Z, kodującym β -galaktozydazę. Uzyskano szereg hybrydowych białek – protein α 2 o różnych długościach reszt aminokwasowych: 3, 8, 13, 25, 67 lub całą cząsteczkę o długości 210 reszt aminokwasowych. Okazało się, że wystarczy 13 reszt aminokwasowych białka Mat α 2, aby pozostała część białka β -galaktozydazy wprowadzić do jądra komórkowego [26, 27].

Białka cytosolowe, wiążące sygnały inkorporacji do jądra komórkowego, są jednocześnie receptorami dla importu tych białek do jądra komórkowego, co zostało wykazane na podstawie wiązania dwóch głównych polipeptydów erytrocytów bydłęcych 54 i 56 kDa [1]. Dodanie tych białek do układu transportującego białka do jądra komórkowego zwiększa

transport 2–3-krotnie. Transport ten ulega wysyceniu i jest zależny od obecności białek cytosolowych. In vitro układ ten ulega zahamowaniu przez N-etylomaleimid (NEM), które z kolei może być zniesione przez nadmiar białek wiążących NLS [1].

BUDOWA POR OTOCZKI JĄDROWEJ

Jednym z głównych białek kompleksu porowego, zwanych nukleoporynami, są O-glikozylowane reszty N-acetyloglukozaminy. Głównym białkiem tej grupy jest glikoproteina p62. Białko to jest syntetyzowane w cytoplazmie różniąc się od N- i O-glikozylowanych białek siateczki endoplazmatycznej i aparatu Golgiego. Stosując swoiste monoklonalne przeciwciała przeciw N-acetyloglukozaminowanym białkom jądrowym poprzez immunofluorescencję i wytrącanie frakcji białek jądrowych wykazano w mikroskopie elektronowym, że część tych białek występuje w jądrze komórkowym, zaś część w obrębie kompleksu porowego [13]. Stwierdzono również, że część nukleoporyn występuje na powierzchni cytoplazmatycznej, podczas gdy inne na powierzchni jądrowej otoczki jądrowej.

Rola cukrów zawartych w nukleoporynach jest niejasna. Ich obecność wykrywa się za pomocą odpowiednich lektyn, głównie WGA (od *wheat germ agglutinin*, czyli aglutynina z kielków pszenicy). Badania przeprowadzone z użyciem WGA wykazały, że pozbawienie por białek wiążących się z tą aglutyniną powoduje utratę zdolności przenoszenia białek z cytoplazmy do jądra komórkowego. Bliższa analiza białek wiążących się z WGA wykazała, że w skład nukleoporyny p62 wchodzi dwa dalsze białka p58 i p57 (m. cz. 58 kDa i 57 kDa) tworzące razem kompleks ok. 600 kDa [45].

Do rodziny nukleoporyn obok p62 kręgowców należą białka NSP1 i NUP1 drożdży. W N-terminalnej połowie tych białek występuje powtarzająca się sekwencja Gly-Phe-X-Phe-Gly, której rola pozostaje niejasna. Wysłunęto sugestię, że wymieniony fragment wraz z O-glikozylowanymi cukrami rozpoznaje przenoszony ładunek (*cargo*) NBP kompleksów (NBP – *NLS Binding Protein*). C-terminalny koniec białka p62 zawiera prawdopodobnie 7-krotny zwój helisy stwarzający możliwość interakcji zwój ze zwojem (*coiled coil interaction*). Szereg danych wskazuje, że domeny te mogą pośredniczyć w interakcji białek por z cytoplazmą i laminami jądra komórkowego [45].

Następnym białkiem występującym w kompleksie białek tworzących kompleks porowy jest glikoproteina gp210. Początkowo białko to zidentyfikowano na podstawie badań immunocytochemicznych jako gp190 [21], potem jednak po ustaleniu jego m. cz. na 210600 Da (z dodatkowo jeszcze nie określoną ilością węglowodanów) określono je jako gp210 [25, 59]. Ponieważ białko to trudno ekstrahuje się z błon otoczki jądrowej, sugeruje się, że jest ono zintegrowane z lipidami tych błon. Łagodne trawienie otoczki jądrowej papainą uwalnia fragment 200 kDa, stąd sugestia, że pozostały mały 10 kDa fragment tego białka pozostaje związany z błonami otoczki. Skojarzone badania immunologiczne połączone z badaniami w mikroskopie elektronowym zlokalizowały białko gp210 w luminalnej części, czyli pomiędzy błonami otoczki jądrowej w okolicy pory [25].

Białko gp210 należy do głównych białek otoczki jądrowej wiążących konkanawalinę A (Con-A), specyficzną dla α -D-mannopyranozy i sterycznie pokrewnych cukrów. Pod wpływem trawienia endo- β -N-acetyloglukozaminidazą H białko to nieco szybciej wędruje w żelach z SDS, tracąc jednocześnie zdolność wiązania Con-A [25, 59]. Gp210 wiąże również

lektynę soczewicy, ale już nie z kielków pszenicy (WGA) wiążącej reszty N-acetyloglukozaminy i kwasu sialowego [25]. Biało gp210 składa się z 1886 reszt aminokwasowych. Na N-terminalnym końcu znajduje się sekwencja sygnałna łącząca gp210 z siateczką endoplazmatyczną. Sekwencja sygnałna jest nieobecna w dojrzałym białku mającym dwa dodatkowe fragmenty hydrofobowe w poz. 1482 i blisko C-terminalnego końca w poz. 1809. Sugeruje się, że obydwa te fragmenty stanowią domeny przechodzące przez pory otoczki [25]. Całość tych badań dowodzi, że białko gp210 jest transmembranalnym białkiem o małym cytoplazmatycznym "ogonie", z jednym transmembranalnym regionem i większością swej masy, w tym reszty węglowodanowe, co znajduje się w przestrzeni okołojądrowej, tj. pomiędzy błonami tworzącymi otoczkę jądrową. Ponadto białko gp210 łączy się bezpośrednio z siateczką endoplazmatyczną, co sugeruje, że czynność pory może być regulowana przez różne stężenia jonów wapnia operujące poprzez światło siateczki endoplazmatycznej [45]. Ta lokalizacja białka gp210 dowodzi również, że uczestniczy ono w strukturze kompleksu porowego otoczki jądrowej [25].

Rola nukleoporyn w transporcie białek z cytoplazmy do jądra komórkowego opiera się na następujących dowodach [55]:

- Równoczesne wyznakowanie kompleksów porowych cząsteczkami złota, opłaszczonymi nukleoplazminą i WGA (*wheat germ agglutinin* – aglutynina z kielków pszenicy) sugeruje, że nukleoporyny wchodzą w bezpośrednią interakcję z białkami, zanim przejdą przez pory otoczki jądrowej [4].

- Przeciwciała rozpoznające część nukleoporyn blokują import nukleoplazminy do jądra oraz eksport RNA z jądra do cytoplazmy [18].

- WGA blokuje import białek z cytoplazmy do jądra komórkowego [60], przy czym efekt WGA nie jest spowodowany zamknięciem kanału porowego, ponieważ przejście dekstranów nie jest zablokowane [55]. In vitro, pory pozbawione białek wiążących WGA, morfologicznie prawidłowe, nie wiążą białek noszących na sobie sygnał NLS. Z kolei po dodaniu białek wiążących WGA pory te in vitro funkcjonują prawidłowo. Stąd przyjmuje się, że nukleoporyny są miejscem zakotwiczenia kompleksów białkowych noszących na sobie sygnał NLS [55].

Nukleoporyny szczurze p62 i NSP1 oraz drożdży NUP1 są białkami strukturalnymi o powtarzających się prostych motywach. Wszystkie rozpoznawane są przez te same przeciwciała. Białka drożdży NUP1, rozpoznawane przez przeciwciała przeciw białku p62, są wielkości ok. 100 kDa i wchodzą w skład kompleksu porowego. W przypadku białka NSP1 powtarzający się motyw odpowiada konserwatywnej sekwencji hydrofilnych aminokwasów (Lys-Pro-Ala-Phe-Ser-Phe-Gly-Ala-Lys) i jest oddzielony od reszty białka mniej konserwatywną sekwencją 10 aminokwasów [42]. Ponieważ nie ma całkowitej homologii pomiędzy białkiem p62 i NUP1, rozpoznawanych przez to samo przeciwciało, sugeruje się, że przeciwciało to rozpoznaje raczej drugorzędowe struktury tych białek. Ponieważ C-terminalny koniec białek p62 (ssaków) i NSP1 (drożdży) niezbędny dla żywotności komórki jest identyczny, sugeruje się, że powtarzające się sekwencje N-terminalnego końca i części środkowej cząsteczki mogą być zastępowane przez motywy o podobnej funkcji [42].

Z innych białek pory jądrowej zidentyfikowano i sklonowano białko polipeptyd 204 kDa, mający sekwencję sygnałną do przejścia przez błony siateczki endoplazmatycznej i dwa potencjalne regiony zdolne do przenikania przez błony [21, 59]. Natywne białko ulega silnej N-glikozytacji mannozy, powodując zwiększenie masy do 210 kDa. Glikoproteina ta służy

prawdopodobnie do zakotwiczenia kompleksu białek porowych do błony lub katalizuje fuzję z otoczką jądrową dla utworzenia nowych por [55].

Zahamowanie transportu przez pory otoczki jądrowej może nastąpić przez zastosowanie odpowiednich przeciwciał. Również syntetyczne sekwencje zawierające ujemnie naładowane reszty aminokwasowe zamiast dodatnich (np. Asp-Asp-Asp-Glu-Asp zamiast Lys-Lys-Lys-Arg-Lys), stanowiące sygnał transportu antygeny T SV40 do wnętrza jądra komórkowego, mają podobne działanie, przy czym antygen dla tych przeciwciał był zlokalizowany głównie w kompleksie porowym otoczki jądrowej [60].

BIAŁKA POCHODZENIA WIRUSOWEGO JAKO TRANSPORTERY BIAŁEK Z CYTOPLAZMY DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO

W zależności od lokalizacji komórkowej białko może mieć różne funkcje. Proto-onkogen c-abl znajdujący się normalnie w jądrze komórkowym nie powoduje transformacji komórkowej nawet mimo dużej ekspresji. Zmutowana forma tego proto-onkogeny, pozbawionego sygnału do lokalizacji jądrowej, powoduje transformację nowotworową [58]. Potwierdzeniem tego jest następująca obserwacja. Zmutowany proto-onkogen c-abl z powodu utraty ok. 50 reszt aminokwasowych od końca N-terminalnego nie ulega translokacji do jądra komórkowego, powodując jednocześnie poprzez aktywację genów z wczesnego promotora SV40 transformację nowotworową komórki [31, 57]. W tym przypadku fragment pozostały po utracie wymienionych 50 reszt aminokwasowych nie ma sekwencji NLS z powodu mutacji 5 reszt lizyny na 5 reszt kwasu glutaminowego [21].

Niejako klasycznym białkiem ulegającym transportowi z cytoplazmy do jądra komórkowego jest duży antygen T wirusa SV40, noszący specyficzną sekwencję reszt aminokwasowych, stanowiących sygnał lokalizacji jądrowej NLS (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val). NLS pośredniczy w translokacji jądrowej białek jądrowych po ich wstrzyknięciu do cytoplazmy komórek, jak również chimer białek oraz niejądrowych białek sprzężonych z syntetycznymi peptydami zawierającymi NLS [2]. Mutacja punktowa w dużym antygenie T wirusa SV40 w poz. 128 Lys → Thr lub Asn całkowicie znosi jego transport z cytoplazmy do jądra komórkowego [32]. Największą cząsteczką białka wprowadzoną do jądra komórkowego poprzez przyłączenie sygnału NLS dużego antygeny wirusa SV40 jest ferrytyna (465 kDa), natomiast IgM o średnicy 250–400 Å i m. cz. 970 kDa już nie przenika do jądra komórkowego [38].

Ekspresja wczesnych i późnych genów wirusa SV40 wymaga aktywacji transkrypcji komórki gospodarza. W tym procesie zasadniczą rolę pełni duży antygen T tego wirusa, wpływający na wczesną i późną transkrypcję. W procesie transformacji nowotworowej antygen T hamuje wczesną transkrypcję, powodując replikację wirusa oraz w późnej transkrypcji syntezę białka wirionu. Stąd ogromne znaczenie i rola antygeny T będącego typowym białkiem o właściwościach przechodzenia z cytoplazmy do jądra komórkowego [58].

Przeprowadzone badania wykazały, że adenowirus 7 SV40 (PARAcT) jest niezdolny do transportu jądrowego dużego antygeny T wirusa SV40 [37]. Mutant Sv40(cT) cechuje się defektem replikacji, chociaż może być namnażany w komórkach COS-1. Mutacja ta powoduje jednoczesne zahamowanie dojądrowego transportu antygeny typu dzikiego, a komórki COS-1 zainfekowane zmutowanym wirusem SV40(cT)-3 tracą konstytutywną ekspresję jądrowego antygeny T [37]. Sekwencyjna analiza mutacji cT wykazała, że dodatnio naładowana reszta

lizyny w poz. 128 została zastąpiona przez obojętną resztę asparaginy, przy czym ta punktowa mutacja okazała się wystarczającą dla zahamowania transportu jądrowego tego białka [37].

W obrębie dużego antygeny T wirusa polyoma występują nie jeden, lecz dwa pokrewne elementy NLS, jednak nie identyczne z NLS dużego antygeny T wirusa SV40. Z tego pierwszy występuje w tym samym korespondującym miejscu antygeny T SV40 (Pro-Lys-¹²⁸Lys-Lys-Arg-Lys-Val), natomiast drugi również spokrewniony z NLS antygeny T wirusa SV40 (Val-Ser-Arg-¹⁹²Lys-Arg-Pro-Arg) nie koresponduje z odpowiednim antygenem NLS antygeny T wirusa SV40. Dane te dowodzą, że NLS antygeny T wirusa SV40 stanowi pewnego rodzaju prototyp białek napiętnowanych odpowiednią sekwencją sygnalną do przejścia z cytoplazmy do jądra komórkowego [50].

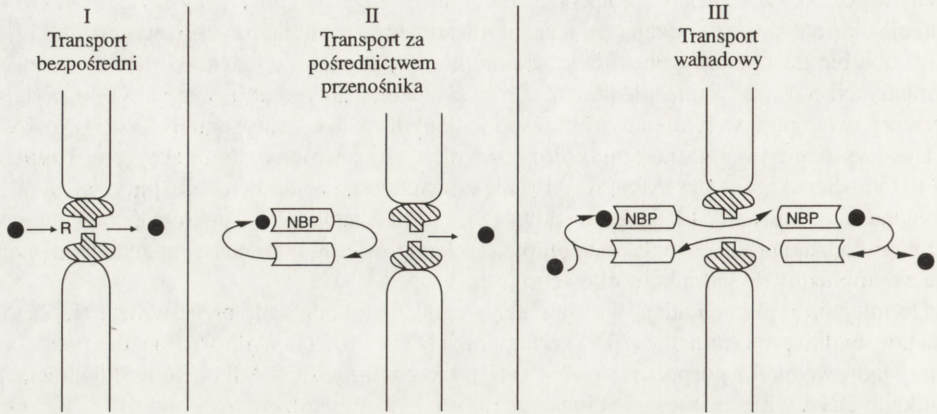
Do inicjacji replikacji adenowirusa niezbędne są dwa kodowane przez wirusa białka: 80 kDa tzw. białko preterminalne (pTP) i polimeraza DNA 140 kDa (AdPol). Ponadto potrzebne są trzy jądrowe białka gospodarza (NFI-NFIII), które wiążąc się z AdPol, stymulują inicjację replikacji DNA wirusa. Wreszcie elongacja odbywa się przy udziale AdPol, DBP (*DNA-binding protein*) i czynnika NFII (rodzaj topoiomerazy). Badaniem immunofluorescencyjnym wykazano, że AdPol, pTP i DBP są białkami jądrowymi. NLS białka pTP posiada sekwencję "Arg-Leu-Pro-Val-Arg-Arg-Arg-Arg-Val-Pro". AdPol1 występuje w cytoplazmie, natomiast AdPol2 w cytoplazmie i jądrze, co sugeruje, że jej sygnał lokalizacji jądrowej występuje w pierwszych 139 resztach aminokwasowych. Ponadto stwierdzono, że transport AdPol do jądra odbywa się poprzez interakcję z pTP [62].

BIAŁKA NBP

Białka NBP (*NLS-Binding Proteins*) stanowią stały składnik por otoczki jądrowej, odpowiedzialny za transport dojądrowy różnych substancji. Mogą one odgrywać rolę zarówno transportera przenoszącego na sobie ładunek w postaci transportowanych substancji (*ang. cargo*), jak i wahadłowca przenoszącego transportowane substancje do wnętrza jądra komórkowego, po czym po oddaniu ładunku wracającego do cytoplazmy, aby przenieść następny ładunek. Najlepiej ilustruje to rysunek 2.

Na podstawie powinowactwa do sekwencji NLS antygeny T SV40, tego najbardziej typowego białka przechodzącego z cytoplazmy do jądra komórkowego, wykryto szereg białek spełniających warunki białka NBP. Gerace wykrył białko p55 kDa wiążące się z antygenem T SV40, ale nie z kontrolnym peptydem o odwrotnej sekwencji reszt aminokwasowych mimo identycznego ładunku [21, 45]. Białko p55 stymulowało w warunkach *in vitro* transport dojądrowy w odpowiednim środowisku komórkowym. Białko p55 było również wrażliwe na pospolity inhibitor transportu dojądrowego – N-etylomaleimid. Ze względu na lokalizację białko p55 należy do wahadłowych transporterów dojądrowych [45].

Dwa dalsze białka NBP dotyczą białka drożdży p70 (NBP70) o m. cz. 70 kDa oraz białka ssaków p140 (140 kDa). Białko p140 jest typowym wahadłowym nośnikiem (*carrier*). Na podkreślenie zasługuje fakt, że obydwa białka p70 i p140 występują również w jąderku oraz mają własne NLS. Białko NBP70 wchodzi w bezpośrednią interakcję ze składnikiem por otoczki jądrowej NSP1. Co więcej białko NBP70 (prawdopodobnie identyczne z p70) jest rozpoznawane przez te same przeciwciała z dwoma następnymi białkami o masach 95 kDa i 45–55 kDa. Do wyjaśnienia pozostaje kwestia, czy wymienione białka jądrowe (p70 i p140)



Rys. 2. Różne możliwości transportu przez porę jądrową: I – transport bezpośredni – substancja przenoszona łączy się z receptorem (R), po czym przechodzi do jądra komórkowego; II – przenoszona substancja łączy się z receptorem (NBP), po czym następuje jej uwolnienie już w obrębie pory i przeniesienie do jądra komórkowego, zaś NBP pozostaje w cytoplazmie; III – przenoszona substancja łączy się z receptorem (NBP) i razem z nim przechodzi do jądra, po czym zostaje uwolniona, zaś NBP wraca do cytoplazmy (wg Nigg, Beauerle i Lührmann [45])

odgrywają specyficzną rolę w transporcie dojądrowym, gdzie główną rolę odgrywa synteza rybosomów, i w jakim stosunku czynność ta koreluje z ich transportem dojądrowym [45].

W przypadku białka jądkowego No 38 import do jądra komórkowego wymaga odpowiedniego NLS, natomiast w jąderku białko to ulega oligomeryzacji [45]. Z kolei import lamin do otoczki jądrowej wymaga hydrofobowej modyfikacji C-terminalnego końca (izoprenolowa i karboksylowa modyfikacja), natomiast rozpad lamin odbywa się pod wpływem mitotycznie aktywnej $p34^{cdc2}$ kinazy [45].

DOJĄDROWY TRANSPORT U snRNP

Większość RNA występuje w komórce sprzężone z białkami w postaci nukleoprotein (RNP), stąd z góry można założyć, że sygnały lokalizacji jądrowej mogą być związane albo z częścią białkową, albo nukleinową nukleoprotein. Białka występujące w snRNP mogą być podzielone na białka Sm, występujące w snRNA U1, U2, U4 i U5 oraz specyficzne białka występujące tylko w określonych zespołach [45]. Metaboliczna droga (*pathway*) snRNP przedstawia się następująco: prekursorowy RNA po jego syntezie przechodzi do cytoplazmy, gdzie łączy się z białkami Sm tworząc rdzeń Sm RNP, po czym następuje potrójna metylacja do m^3GpppG tworzącego strukturę *cap* i powrót do jądra komórkowego [45]. Ponieważ białka Sm nie przechodzą do jądra komórkowego, sygnał warunkujący transport (NLS) musi znajdować się albo w obrębie snRNA, albo też zostaje wytworzony na skutek interakcji białka z snRNA [45].

Przeprowadzone badania wykazały, że struktura *cap* m^3GpppG i bliżej niezidentyfikowany motyw rdzeniowego białka Sm snRNP łącznie tworzą dwuczęściową strukturę NLS dla snRNP (wg Lührmanna [45]). Wskutek braku 5'-terminalnej struktury *cap* lub braku białek

do utworzenia struktury *cap* U1 RNA nie przechodzi do jądra. Stąd sugestia, że obie części dwuczęściowego NLS są niezbędne do ukierunkowania U snRNP do jądra komórkowego. Transport jądrowy U1 snRNP, zawierający strukturę *cap* m³G, może być zahamowany przez wysokie stężenia m³GpppG lub cząstki U1 snRNP pozbawione struktury m³G *cap* [45]. Sugeruje się, że dwuczęściowy NLS zwiększa jego zasadność w procesie dojądrowego transportu, względnie jedna jego część oddziałuje na przyłączenie do białka NBP, druga zaś potrzebna jest do jego przemieszczenia z pory otoczki do nukleoplazmy. Jest znamienne, że WGA nie wpływa hamująco na ten transport, co zdaje się dowodzić, że są to odrębne procesy. Z kolei WGA wpływa hamująco na dojądrowy transport U6, co dowodzi, że U6 jest typowym białkiem kariofilnym [48], a transport dojądrowy wynika z połączenia snRNA z białkiem U6 [45].

TRANSPORT Z JĄDRA KOMÓRKOWEGO DO CYTOPLAZMY

Transport przez pory jądrowe musi odbywać się również w kierunku odwrotnym, to jest z jądra komórkowego do cytoplazmy, dokąd przechodzą kwasy rybonukleinowe, jak również duże cząstki rybosomowe zgrupowane w jąderku. Również w tych badaniach użyto cząstek złota koloidalnego opłaszczonych RNA o średnicy wielkości do 230 Å, które wstrzyknięte do jądra komórkowego przechodzą również tylko przez pory otoczki do cytoplazmy [17]. Transport ten jest zależny od temperatury. Przez pory otoczki z jądra do cytoplazmy przechodzą nie tylko cząstki złota opłaszczone przez różne fizjologiczne związki RNA (mRNA, tRNA, 5S rRNA, poly-A), ale również przez нефизjologiczne związki, takie jak poly-dA lub poly-dI [17]. Dalsze badania wykazały jednak, że rRNA przechodzi jedynie w połączeniu z bliżej nieznanymi białkami, 5S rRNA tylko w połączeniu z czynnikiem transkrypcji TFIIIA lub białkiem rybosomowym L5. W przypadku mutacji wymienionych białek, powodującej brak wiązania z rRNA, następuje zatrzymanie rRNA w jądrze komórkowym [17, 55]. Wykazano również, że transport przez pory może odbywać się w obydwu kierunkach, prawdopodobnie przy pomocy tego samego mechanizmu transportującego [17].

Podstawową rolę w transporcie produktów jądra komórkowego do cytoplazmy pełnią prawdopodobnie białka wiążące te produkty. Tym samym proces ten powoduje zatrzymanie białek jądrowych w jądrze komórkowym. Prekursorowe RNA zostają zatrzymane w jądrze komórkowym, natomiast dojrzały mRNA, tRNA i podjednostki rybosomów (w tym rRNA) przechodzą do cytoplazmy. Proces ten jest wysoce specyficzny – pojedyncza zmiana nukleotydu C→U (poz. 57) inicjującego tRNA₁^{Met} kręgowców powoduje 20-krotne zmniejszenie eksportu z jądra do cytoplazmy [61].

Bezpośredni produkt transkrypcji hnRNA łącząc się z białkami tworzy kompleks hnRNA-hnRNP-snRNP. Podczas dojrzewania mRNA kompleks ten utrzymuje się w jądrze komórkowym. Przyjmuje się, że wymiana białek hnRNP na białko wiążące mRNA umożliwia jego transport z jądra do cytoplazmy, przy czym szereg białek jak na przykład czynnik transkrypcji A1 w sposób wahadłowy krąży pomiędzy jądrem a cytoplazmą. W cytoplazmie czynnik A1 jest związany z mRNA i dopiero transkrypcja za pomocą polimerazy RNA II powodując całkowite uwolnienie mRNA do translacji umożliwia powrót A1 do jądra komórkowego [48].

Cząsteczki RNA syntetyzowane przez polimerazę RNA II jako sygnał przejścia z jądra do cytoplazmy mają na swych 5'końcach strukturę *cap* m⁷GpppG. Cząsteczki U1 snRNA

pozbawione struktury *cap* (pppG na końcu 5') nie przechodzą do cytoplazmy [45]. Struktura m⁷G *cap* na końcu 5' wystarcza do eksportu U1 snRNA, jednak inne struktury potrzebują dodatkowych czynników do przejścia z jądra do cytoplazmy. Pre-mRNA niezdolne do składania (*splicing*) nie są zdolne do przejścia z jądra do cytoplazmy, zwłaszcza jeżeli mają introny [45]. Przechodzenie RNA przez pory otoczki odbywa się zawsze od końca 5', a kończy się na końcu 3'.

Transport tRNA z jądra do cytoplazmy jest silnie uzależniony od temperatury, optymalną jest temperatura 31°C. Transport tRNA z jądra do cytoplazmy ulega wysyceniu 190 x 10⁷ cząsteczek na 1 minutę i na dojrzałe jądro w temperaturze 21°C [61].

WYKRYWANIE SYGNAŁÓW LOKALIZACJI JĄDROWEJ

Głównymi metodami wykrywania sygnałów lokalizacji jądrowej są:

- metoda odejmowania przez usunięcie fragmentu białka, czego następstwem jest utrata zdolności przechodzenia danego białka przez otoczkę jądrową,
- metoda dodawania odpowiedniego peptydu do białka cytoplazmatycznego, czego następstwem jest jego przechodzenie do jądra komórkowego.

Dodany peptyd może być naturalny lub syntetyczny, dodany do badanego białka metodą transfekcji.

Z metod laboratoryjnych do wykrywania białek w cytoplazmie lub jądrze stosuje się: immunofluorescencję (przez sprzęganie badanego białka z substancjami fluoryzującymi), reakcje histochemiczne, badania w mikroskopie elektronowym oraz frakcjonowanie komórek na podfrakcje [54].

TRANSPORT Z CYTOPLAZMY DO JĄDRA JEST PROCESEM AKTYWNYM

Transport do jądra komórkowego jest wieloetapowym procesem, polegającym najpierw na związaniu przenoszonej substancji zawierającej element NLS z odpowiednim białkiem NBP (*NLS-binding protein*), po czym kompleks ten łączy się z kompleksem białek porowych, aby przy udziale ATP ulec translokacji do jądra komórkowego [54, 55]. Brak ATP (in vitro) uniemożliwia normalne wiązanie z białkami por otoczki. Jednocześnie import do jądra komórkowego jest zahamowany, co dowodzi, że samo przemieszczenie importowanego białka do jądra wymaga zużycia energii ATP [43]. In vivo, białka akumulują na powierzchni otoczki jądrowej w okolicy por również po usunięciu ATP, jednak do wnętrza jądra przechodzą dopiero po uzupełnieniu ATP. Sam mechanizm działania ATP jest niejasny, przypuszcza się, że hydroliza ATP jest potrzebna do uwolnienia białek zawierających NLS od ich wiązania w obrębie por [55].

Aktywny transport białek jądrowych przez pory otoczki nie ulega obecnie wątpliwości, natomiast otwartą pozostaje kwestia, czy drobnocząsteczkowe białka mogą również przechodzić do jądra przez wodne środowisko pory drogą dyfuzji? Wprawdzie dekstrany i białka o masie cząsteczkowej poniżej 60 kDa mogą przechodzić do jądra drogą dyfuzji, to jednak w przypadku histonów, odgrywających jak wiadomo istotną rolę w procesie syntezy DNA

(nowosyntetyzowany DNA musi natychmiast łączyć się z histonami), sprawa się komplikuje. Wykazano bowiem, że transport do jądra małych cząsteczek histonów (H2B m. cz. ok. 15 kDa i H1 m. cz. ok. 21 kDa) jest zależny od temperatury i zużycia ATP, co sugeruje, że jest to transport aktywny, przy czym transport do jądra wymienionych histonów może być samodzielny, lecz może odbywać się również w postaci kompleksu z nukleoplazminą mającą odpowiedni NLS [9, 36].

Odrębne zagadnienie stanowi obecność niskocząsteczkowych białek w obrębie jądra komórkowego wbrew gradientowi stężeń w stosunku do cytoplazmy [9, 12]. Doświadczenie przeprowadzone z cytochromem c (m. cz. ok. 15 kDa) wstrzykniętym do cytoplazmy wykazało jego przechodzenie do jądra komórkowego drogą dyfuzji. W przypadku fuzji cytochromu c z NLS jego przechodzenie do jądra komórkowego było zależne od temperatury i ATP [10]. Podobnie fuzja cytochromu c₁ z NLS wirusa SV40 spowodowała jego przechodzenie do jądra komórek drożdży zależne od temperatury i energii ATP.

Mimo znacznych postępów w badaniu mechanizmów przechodzenia białek jądrowych z cytoplazmy do jądra komórkowego, jak i na odwrót przechodzenia produktów jądra komórkowego (mRNA, tRNA i fragmentów rybosomów) do cytoplazmy, wiele zagadnień pozostaje nadal nierozwiązanych [55]. Dlaczego różne białka wiążące NLS (NBP) rozpoznają ten sam kompleks białek mających w swej strukturze NLS? W jaki sposób w wypadku kotransportu białek z białkiem wiążącym NLS dochodzi do odłączenia się białek w obrębie jądra komórkowego? Czy kompleksy białek w obrębie pory otoczkowej stanowią receptory dla białek NBP?

REGULACJA TRANSPORTU JĄDROWEGO

Proces przechodzenia białek do jądra komórkowego, jak również odwrotnie produktów jądra komórkowego do cytoplazmy, podlega jak wszystkie czynności komórek regulacji, będąc tym samym jednym z elementów wpływających na czynność komórek. Typowym przykładem jest receptor glukokortykoidów regulujący transkrypcję odpowiednich genów pod wpływem hormonów sterydowych. W stanie wolnym receptor glikokortykoidów jest białkiem cytosolowym wiążącym się z właściwym dla niego hormonem, czego następstwem jest transformacja receptora, powodująca transport kompleksu hormon-receptor z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie następuje jego związanie z odpowiednim miejscem DNA (ang. GRE – *glucocorticoid response element*). W rezultacie dochodzi do modulacji sąsiadujących z GRE promotorów i następnie do transkrypcji. W ten sposób receptor, jako bezpośredni przekaźnik sygnału, poprzez transformację pośredniczy w działaniu hormonu na ekspresję odpowiedniego genu lub genów z dostarczeniem produktów typowych dla reakcji działania glukokortykoidów na organizm [46, 47]. Hormon niezwiązany ze swoim receptorem jest nieaktywny, przypuszczalnie z powodu selektywnego łączenia się z białkiem szoku cieplnego hsp 90 [46].

Przeprowadzone badania wykazały, że receptor glukokortykoidów ma dwa sygnały lokalizacji jądrowej, jeden (28 reszt aminokwasowych) we fragmencie DNA przylegającym do domeny receptora wiążącego się z DNA oraz drugi we fragmencie 256 reszt aminokwasowych, w którego obrębie znajduje się również domena wiążąca się z DNA. Czas przechodzenia receptora związanego z hormonem z cytoplazmy do jądra jest bardzo krótki, czego

wyrazem jest szybka reakcja transkrypcji spowodowana łączeniem się kompleksu hormon-receptor z DNA [46, 47]. W ten sposób mechanizm transportujący kompleks receptor-hormon z cytoplazmy do jądra odgrywa istotną rolę w działaniu glukokortykoidów na organizm.

Obecny w strukturze receptora glukokortykoidów NLS jest niefunkcyjalny i dopiero pod wpływem połączenia się z hormonem sterydowym, wskutek zachodzącej transformacji struktury, receptor z białka cytoplazmatycznego staje się białkiem jądrowym i przechodzi do jądra komórkowego. Dane te dowodzą, że NLS wolnego receptora jest prawdopodobnie ukryty we wnętrzu cząsteczki receptora i dopiero jego połączenie się z hormonem powoduje odsłonięcie jego NLS. W ten sposób czynność receptora glukokortykoidów jest zależna od jego lokalizacji komórkowej.

Ważnym czynnikiem regulującym transport jądrowy są procesy fosforylacji-defosforylacji. Czynniki transkrypcji drożdży SW15 w fazach S, G2 i M cyklu komórkowego pozostaje w cytoplazmie, natomiast w fazie G1, kiedy następuje aktywacja genu endonukleazy HO, SW15 wchodzi do jądra komórkowego [41]. Translokacja SW15 jest odwrotnie skorelowana z aktywnością CDC28 kinazy, zależnej od cyklu komórkowego [45]. NLS czynnika SW15 jest dwuczęściowy. Trzy reszty seryny w bliskości NLS ulegają fosforylacji przez kinazę CDC28, ich fosforylacja powoduje przejście SW15 do jądra komórkowego. Z kolei defosforylacja SW15 w końcowej fazie mitozy, kiedy CDC28 jest nieaktywne, stymuluje jego wejście do jądra [40]. Również przejście do jądra komórkowego chimery TAg- β -galaktozydazy zależy od fosforylacji przez kinazę kazeinową II. Powyższe dane dowodzą, że fosforylacja i defosforylacja, związane z cyklem komórkowym, mogą być ważnymi czynnikami regulującymi transport do jądra komórkowego [45, 51]. Wreszcie przeprowadzone badania wykazały, że proces fosforylacji jest ważnym czynnikiem regulującym transport dojądrowy w procesie embriogenezy. Oocyty *Xenopus* zawierają w cytoplazmie znaczne ilości proto-onkogenu c-myc. Z chwilą zapłodnienia równocześnie z fosforylacją, ulegają one przemieszczeniu do jądra komórkowego [45].

REGULACJA TRANSKRYPCJI POPRZEZ DOJĄDROWY TRANSPORT

Współczesne badania wykazują, że do głównych czynników regulujących aktywność genów należy również transport do jądra czynników znajdujących się normalnie w cytoplazmie, a z chwilą ich przemieszczenia do jądra komórkowego następuje prawie natychmiastowa aktywacja genu i jego transkrypcja. Przykładów takich można obecnie wymienić kilka, jak omówiony już transport receptora glukokortykoidów, czynnika SW15 u drożdży, czynnika ISGF3 aktywującego gen α -interferonu i innych [29, 30, 45].

Do najważniejszych pod tym względem wydaje się należeć czynnik NF- κ B zaliczany do tzw. czynników wspomagających (*enhancer*) indukcję syntezy łańcucha κ immunoglobulin podczas procesów zapalnych [34], aktywacji układu immunologicznego, w procesach ostrej fazy i innych [30,45]. Czynniki wspomagające (ang. *enhancer*) i promotor stanowią główne elementy regulacji ekspresji genów eukariotów, kontrolujących komórkowo- i tkankowo-specyficzną ekspresję. Typowym czynnikiem wspomagającym genu łańcucha lekkiego κ immunoglobulin jest czynnik wspomagający NF- κ B, będący głównym induktorem transkrypcji łańcucha lekkiego κ . Podobnie jak lokalizacja receptora glukokortykoidów w komórce decyduje o jego aktywności, tak również lokalizacja czynnika

NF- κ B wpływa na jego aktywność. W stymulowanych limfocytach B NF- κ B znajduje się w jądrze komórkowym, a wiążąc się z DNA reguluje transkrypcję lekkich łańcuchów κ immunoglobulin, podczas gdy w nieaktywnych komórkach B czynnik ten znajduje się w cytoplazmie [6]. W cytoplazmatycznej postaci NF- κ B jest nieaktywny, nie wiąże się z DNA z powodu związania z inhibitorem I κ B [22]. Fosforylacja inhibitora przerywa wiązanie kompleksu I κ B-NF- κ B, dzięki czemu uwolniony NF- κ B przechodzi do jądra komórkowego, pobudzając transkrypcję genu łańcucha lekkiego κ immunoglobuliny [22].

Aktywna forma NF- κ B składa się z dwóch komponent p50 i p65 [34], składających się na heterodimer wpływający na DNA [30, 45]. Obie podjednostki wykazują homologię w obrębie 300 reszt aminokwasowych, niezbędnych do wiązania z DNA, a ich C-terminalne końce warunkują heterodimeryzację [30]. Dalsze badania wykazały obecność w nich homologicznych fragmentów wspólnych z rodziną onkogenów "rel" oraz genem "dorsal", kontrolującym w embriogenezie część grzbietową muszki owocowej (*Drosophila*) [9, 14, 28]. Wreszcie wykazano, że c-rel i NF- κ B mogą w warunkach fizjologicznych tworzyć heterodimery. W ostatecznej konkluzji oba tworzą jeden system czynników transkrypcji [30].

Mimo homologii p50 i p65 są funkcjonalnie różne. Tylko p65 jest zdolne wchodzić w interakcję z obydwoma podjednostkami I κ B α i β i tylko C-terminalny koniec zdolny jest do transaktywacji genów. Z kolei p50 jest zdolne do supresji transaktywacji NF- κ B, prawdopodobnie wskutek kompetycyjnego wiązania z DNA [30]. W warunkach fizjologicznych, kiedy poziom NF- κ B jest niski, aktywność p65 zdaje się zależeć głównie od ilości p50.

Nowsze badania wykazały, że nie tylko czynnik NF- κ B podlega kontrolnym mechanizmom transportu dojądrowego, lecz również prekursorowa podjednostka p50, tj. p110. Prekursorowa podjednostka p110 znajduje się w cytoplazmie wspólnie ze zmutowanym antygenem T SV40, pozbawionym zdolności przechodzenia do jądra komórkowego. Jest to o tyle ciekawe, że zarówno p50, jak i p110 mają ten sam NLS w C-terminalnym końcu domeny. Brak dojądrowego ukierunkowania, mimo obecności NLS w obrębie p110 sugeruje, że jest to wynikiem jego wewnątrzcząsteczkowego maskowania. Monospecyficzne przeciwciało przeciw okolicy NLS p50, nie miało dostępu do p110 i dopiero usunięcie 200 reszt aminokwasowych od C-terminalnego końca dało jednakową reakcję immunologiczną, a fragmenty usuniętej części p110 reagowały z N-terminalną częścią p50. Dane te tłumaczą, dlaczego p50, uwolnione z p110, pozostaje w nienaruszonych komórkach w cytoplazmie i jest nieaktywne z powodu związania z p110 [30].

Jak bardzo powiązane są różne czynności aparatu komórkowego, dowodzi obecność w komórce białek podobnych lub nawet o tych samych właściwościach. I tak białka p50 i p60 wykazują wysoką homologię, nie tylko między sobą, ale również z produktami protoonkogeny "c-rel" oraz morfogenu "dorsal" (grzbietowego) u drozofili. Istnieje szereg danych wskazujących na to, że translokacje jądrowe, jak i wiązania z DNA występują również pod wpływem innych białek. C-rel jest zasocjowane z białkiem pp40 kurcząt, a to z kolei z postacią β I κ B (inhibitora NF- κ B) z łożyska człowieka. Zależności działania tych czynników są jeszcze dalekie od ostatecznego wyjaśnienia [45].

Podobnie jak w NF- κ B w szeregu dalszych białek w końcu N-terminalnym reszt aminokwasowych występuje fragment o znacznej homologii z obecnością NLS (podobnego do NLS antygeny T SV40) poprzedzonego na około 20 reszt aminokwasowych wysoce konserwatywną resztą seryny. Jest dość prawdopodobne, że fosforylacja tej seryny przerywa

interakcję z czynnikami cytoplazmatycznymi lub aktywuje NLS, co umożliwia transport do jądra komórkowego z następowym pobudzeniem transkrypcji [55].

TRANSPORT DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO W POWIĄZANIU Z CYKLEM KOMÓRKOWYM

Podczas mitozy u większości komórek występuje dezintegracja otoczki jądrowej, aby po ukończonej mitozie na powrót się zorganizować. Z powodu zaniku otoczki białka jądrowe zostają uwolnione, po czym dzięki dojądrowemu transportowi zostają na powrót zgromadzone w jądrze komórkowym. Przeprowadzone badania wykazały, że transport cząstek złota opłaszczonych nukleoplazminą do jąder komórek dzielących się był 7-krotnie większy, aniżeli w komórkach dzielących się [20]. Sugeruje się, że ten zwiększony przepływ białek do jądra komórkowego przez otoczkę jądrową był spowodowany zmianami w obrębie por lub zmianami strukturalnymi połączonymi ze zwiększoną energią w różnych etapach wzrostu komórki [55].

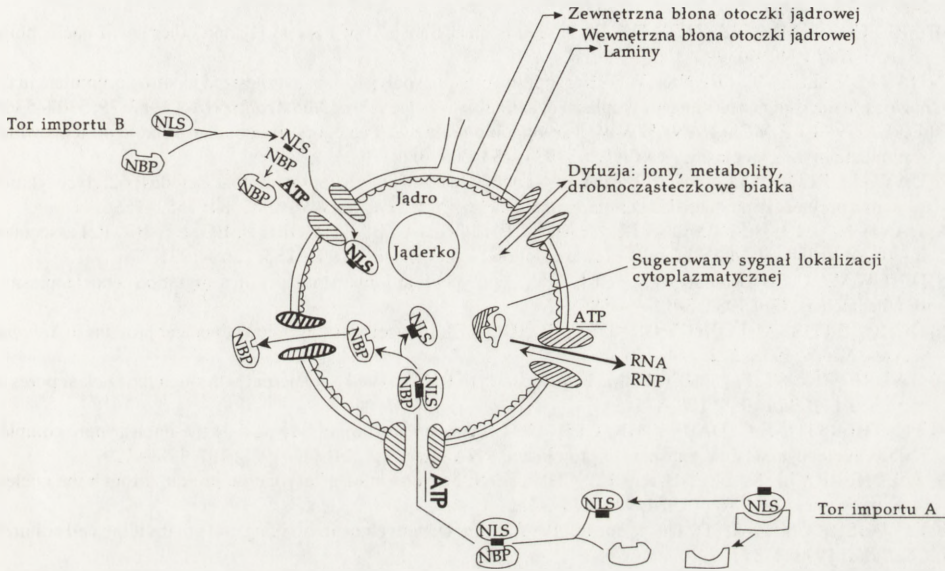
Inni autorzy [8] sądzą, że replikacja DNA odbywa się dzięki specyficznemu czynnikowi replikacyjnemu (*licensing factor*) niezdolnemu do przechodzenia przez otoczkę jądrową i dopiero po degradacji otoczki podczas mitozy czynnik ten dostaje się do środowiska jądrowego, gdzie łącząc się z DNA umożliwia jego replikację, ulegając następnej inaktywacji. Ponowna replikacja DNA staje się możliwa dopiero po następnej mitozie, kiedy wskutek rozpadu otoczki czynnik ten na nowo łączy się z DNA, umożliwiając ponowną replikację.

Powyższy pogląd znajduje w pewnej mierze potwierdzenie w następujących badaniach. Proto-onkogen *c-abl* koduje białkową kinazę tyrozynową występującą w cytoplazmie i jądrze komórkowym. C-terminalny koniec *c-abl* zawiera domenę wiążącą DNA, niezbędną do łączenia się z chromatyną. Ta właściwość łączenia się *c-abl* z DNA zanika podczas mitozy z powodu fosforylacji C-terminalnego końca *c-abl*. W badaniu *in vitro* domena wiążąca DNA ulega zniesieniu przez *cdc2* kinazą. Homozygotyczne mutanty myszy, produkujące *c-abl* kinazę tyrozynową pozbawioną fragmentu wiążącego DNA, giną po urodzeniu z powodu licznych defektów. Stąd przyjmuje się, że wiązanie *c-abl* kinazy tyrozynowej z DNA jest niezbędne dla utrzymania prawidłowych procesów życiowych [35].

Na zakończenie, w celu łatwiejszego zrozumienia całości niniejszego przeglądu przedstawiam na rysunku 3 ogólny schemat tego jeszcze dość zawiłego i niedostatecznie wyjaśnionego procesu transportu z cytoplazmy do jądra i z jądra do cytoplazmy, głównie na podstawie odpowiedniego rysunku z pracy Schreiber'a i wsp. [54].

PODZIĘKOWANIE

Pani Aleksandrze Jakubowskiej składam serdeczne podziękowanie za trud wielokrotnego przepisywania niniejszej pracy.



Rys. 3. Schemat transportu przez pory otoczki jądrowej [45, 54]: tor importu A: – uwolnienie białka z NLS z białka zakotwiczonego: – utworzenie kompleksu NLS/NBP – kompleks NLS/NBP przechodzi przez porę – na terenie jądra kompleks NLS/NBP ulega rozpadowi – NBP wraca do cytoplazmy i uczestniczy w ponownej reakcji; tor importu B: kompleks NLS/NBP ulega rozpadowi po połączeniu się z porą, do jądra wnika tylko białko połączone z NLS, NBP pozostaje w cytoplazmie; NLS – sygnał dla lokalizacji jądrowej białka (*nuclear localization signal or sequence*), NBP – białko wiążące się z NLS (*NLS-binding protein*)

LITERATURA

- [1] ADAM SA, GERACE L. Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell* 1991; **66**: 837–847.
- [2] ADAM SA, LOBL TJ, MITCHELL MA, GERACE L. Identification of specific binding proteins for a nuclear location sequence. *Nature* 1989; **337**: 276–279.
- [3] AKEY CW. Visualization of transport-related configurations of the nuclear pore transporter. *Biophys J* 1990; **58**: 341–355.
- [4] AKEY CW, GOLDFARB DS. Protein import through the nuclear pore complex is a multistep process. *J Cell Biol* 1989; **109**: 971–982.
- [5] ANGULO JF, ROUER E, MAZIN A, MATTEI MG, TISSIER A, HORELLOU P, BENAROUS R, DEVORET R. Identification and expression of the cDNA of KIN17 a zinc-finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein. *NAR* 1991; **19**: 5117–5123.
- [6] BAEUERLE PA, BALTIMORE D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- κ B transcription factor. *Cell* 1988; **53**: 211–217.
- [7] BLOBEL G. Gene gating: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 8527–8529.

- [8] BLOW JJ, LASKEY RA. A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature* 1988; **332**: 546–548.
- [9] BOURS V, VILLALOBOS J, BURD PR, KELLY K, SIEBENLIST U. Cloning of mitogen-inducible gene encoding κ B DNA-binding protein with homology to the rel oncogene and to cell-cycle motifs. *Nature* 1990; **348**: 76–78.
- [10] BREEUWER M, GOLDFARB DS. Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. *Cell* 1990; **60**: 999–1008.
- [11] DABAUVALLE MC, FRANKE WW. Karyophilic proteins: polypeptides synthesized in vitro accumulate in the nucleus on microinjection into the cytoplasm of amphibian oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 5302–5306.
- [12] DABAUVALLE MC, FRANKE WW. Karyophobic proteins. A category of abundant soluble proteins which accumulate in the cytoplasm. *Exp Cell Res* 1984; **153**: 308–326.
- [13] DAVIS LI, BLOBEL G. Nuclear pore complex contains a family of glucoproteins that includes p62: glycosylation through a previously unidentified cellular pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 7552–7556.
- [14] DAVIS N, GHOSH S, SIMONS DL, TEMPST P, LIU H-C, BALTIMORE D, BOSE jr HR. Rel associated pp-40: An inhibitor of the rel family of transcription factors. *Science* 1991; **253**: 1268–1271.
- [15] DINGWALL C, SHARNICK SV, LASKEY RA. A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasm into the nucleus. *Cell* 1982; **30**: 449–458.
- [16] DE ROBERTIS EM, LONGTHORNE RF, GURDON JB. Intracellular migration of nuclear proteins in *Xenopus* oocytes. *Nature* 1978; **272**: 254–256.
- [17] DWORETZKY ST, FELDHERR CM. Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol* 1988; **106**: 575–584.
- [18] FEATHERSTONE C, DARBY MK, GERACE L. A monoclonal antibody against the nuclear pore complex inhibits nucleocytoplasmic transport of protein and RNA in vivo. *J Cell Biol* 1988; **107**: 1289–1297.
- [19] FELDHERR CM, KALLENBACH E, SCHULTZ N. Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol* 1984; **99**: 2216–2222.
- [20] FELDHERR CM, AKIN D. The permeability of the nuclear envelope in dividing and nondividing cell cultures. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1–8.
- [21] GERACE L, BURKE B. Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol* 1988; **4**: 335–374.
- [22] GHOSH S, BALTIMORE D. Activation in vitro of NF- κ B by phosphorylation of its inhibitor I κ B. *Nature* 1990; **344**: 678–682.
- [23] GOLDFARB DS, GARIÉPY J, SCHOOLNIK G, KORNBERG RD. Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature* 1986; **322**: 641–644.
- [24] GOLDFARB D, MICHAUD N. Pathways for the nuclear transport of proteins and RNAs. *Trends Cell Biol* 1991; **1**: 20–24.
- [25] GREBER FU, SENIOR A, GERACE L. A major glycoprotein of the nuclear pore complex is a membrane-spanning polypeptide with a large luminal domain and a small cytoplasmic tail. *EMBO J* 1990; **9**: 1495–1502.
- [26] HALL MN, CRAIK C, HIRAKA Y. Homeodomain of yeast repressor α 2 contains a nuclear localization signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 6954–6958.
- [27] HALL MN, HEREFORD L, HERSKOWITZ I. Targeting of *E. coli* β -galactosidase to the nucleus in yeast. *Cell* 1984; **36**: 1057–1065.
- [28] HANSEN SK, NERLOW C, ZABEL U, VERDE P, JOHNSON M, BAEUERLE PA, BLASIF. A novel complex between the p65 subunit of NF- κ B and c-Rel binds to a DNA element involved in the phorbol ester induction of the human urokinase gene. *EMBO J* 1992; **11**: 205–213.
- [29] HASKILL S, BEG AA, TOMPKINS SM, MORRIS JS, YUROCHKO AD, SAMPSON-JOHANNES A, MONDAL K, RALPH P, BALDWIN jr AS. Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I- κ B-like activity. *Cell* 1991; **65**: 1281–1289.
- [30] HENKEL T, ZABEL U, van ZEE K, MÜLLER JM, FANNING E, BAEUERLE PA. Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF- κ B subunit. *Cell* 1992; **68**: 1121–1133.
- [31] HUNT T. Cytoplasmic anchoring proteins and the control of nuclear localization. *Cell* 1989; **59**: 949–951.
- [32] KALDERON D, RICHARDSON WD, MARKHAM AF, SMITH AE. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large T antigen. *Nature* 1984; **311**: 433–438.
- [33] KALDERON D, ROBERTS BL, RICHARDSON WD, SMITH AE. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 1984; **39**: 499–509.
- [34] KAWAKAMI K, SCHEIDERIT C, ROEDER RG. Identification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF- κ B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 4700–4704.

- [35] KIPREOS ET, WANG JYJ. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science* 1992; **256**: 382–384.
- [36] KLEINSCHMIDT JA, SEITER A. Identification of domains involved in nuclear uptake and histone binding of protein N1 of *Xenopus laevis*. *EMBO J* 1988; **7**: 1605–1614.
- [37] LANDFORD RE, BUTEL JS. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* 1984; **37**: 801–813.
- [38] LANFORD RE, KANDA P, KENNEDY RC. Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. *Cell* 1986; **46**: 575–582.
- [39] MEYER R, HATADA EN, HOHMANN H-P, HAIKER M, BARTSCH D, RÖTHLISBERGER U, LAHM H-W, SCHLAEGER EJ, van LOON APGM, SCHEIDEREIT C. Cloning of the DNA, binding subunit of human nuclear factor κ B: the level of its mRNA is strongly regulated by phorbol ester or tumor necrosis factor α . *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 966–970.
- [40] MOLL T, TEBB G, SURANA U, ROBITSCH H, NASMYTH K. The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SW15. *Cell* 1991; **66**: 743–758.
- [41] NASMYTH K, ADOLF G, LYDALL D, SEDDON A. The identification of a second cell cycle control of the HO promoter in yeast: cell cycle regulation of SW15 nuclear entry. *Cell* 1990; **62**: 631–647.
- [42] NEHRBASS U, KERN H, MUTVEI A, HORSTMANN H, MARSHALLSAY B, HURST E. NSP1: a yeast nuclear envelope protein localized at the nuclear pore exerts its essential function by its carboxy-terminal domain. *Cell* 1990; **61**: 979–989.
- [43] NEWMYER DD, FORBES DJ. Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation. *Cell* 1988; **52**: 641–653.
- [44] NEWPORT JW, FORBES DJ. The nuclear structure, function and dynamics. *Annu Rev Biochem* 1987; **56**: 535–563.
- [45] NIGG EA, BEAUERLE PA, LÜHRMANN R. Nuclear import-export: in search of signals and mechanisms. *Cell* 1991; **66**: 15–22.
- [46] PICARD D, SALSER SJ, YAMAMOTO KR. A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell* 1988; **54**: 1073–1080.
- [47] PICARD D, YAMAMOTO KR. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 1987; **6**: 3333–3340.
- [48] PINOL-ROMA S, DREYFUSS G. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* 1992; **355**: 730–732.
- [49] REICHEL T, HOLZENBURG A, BUHLE EL, JARNIK M, ENGEL A, AEBI U. Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* 1990; **110**: 883–894.
- [50] RICHARDSON WD, ROBERTS BL, SMITH AE. Nuclear location signals in polyoma virus large-T. *Cell* 1986; **44**: 77–86.
- [51] RIHS HP, PETERS R. Nuclear transport kinetics depend on phosphorylation-site-containing sequences flanking the karyophilic signal of the Simian virus 40 T-antigen. *EMBO J* 1989; **8**: 1479–1484.
- [52] ROBBINS J, DILWORTH SM, LASKEY RA, DINGWALL C. Two interdependent basic domains in nucleoplasm nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 1991; **64**: 615–623.
- [53] ROBERTS L, RICHARDSON WD, SMITH AE. The effect of protein context on nuclear location signal function. *Cell* 1987; **50**: 465–475.
- [54] SCHREIBER V, de MURCIA G, MÉNISSIER-de MURCIA J. Le transport des protéines dans le noyau: les signaux de localisation nucléaire et leurs récepteurs. *Médecine Sci* 1992; **8**: 134–139.
- [55] SILVER PA. How proteins enter the nucleus. *Cell* 1991; **64**: 489–497.
- [56] STEWART M, WHYTOK S, MILLS A. Associated of gold-labeled nucleoplasm with the centers of ring components of *Xenopus* oocytes nuclear pore complexes. *J Mol Biol* 1990; **213**: 575–582.
- [57] VAN ETEN RA, JACKSON P, BALTIMORE D. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell* 1989; **58**: 669–678.
- [58] WILDEMAN AG. Transactivation of both early and late simian virus 40 promoters by large tumor antigen does not require nuclear localization of the protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2123–2127.
- [59] WOZNIAK RW, BARTNIK E, BLOBEL G. Primary structure analysis of an integral membrane glycoprotein of the nuclear pore. *J Cell Biol* 1989; **108**: 2083–2092.
- [60] YONEDA Y, IMAMOTO-SONOBE N, MATSUOKA Y, IWAMOTO R, KIHIO Y, UCHIDA T. Antibodies to Asp-Asp-Glu-Asp can inhibit transport of nuclear proteins into the nucleus. *Science* 1988; **242**: 275–278.

- [61] ZASLOFF M. tRNA transport from the nucleus in a eukaryotic cell: Carrier-mediated translocation process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 6436–6440.
- [62] ZHAO L-J, PADMANABHAN R. Nuclear transport of adenovirus DNA polymerase is facilitated by interaction with preterminal protein. *Cell* 1988; **55**: 1005–1015.

Otrzymano: 30.06.1992 r.

Przyjęto: 15.09.1992 r.

Adres autora: 60-479 Poznań, ul. Strzeszyńska 32

HIPOTEZA O RÓŻNORODNOŚCI KOMÓREK, Z KTÓRYCH MOŻE POCHODZIĆ PRZEWLEKŁA BIAŁACZKA LIMFATYCZNA B-KOMÓRKOWA

HYPOTHESIS THAT VARIOUS B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIAS DERIVE FROM DIFFERENT B-CELL LINEAGES

Zofia Monika RUPNIEWSKA, Jacek ROLIŃSKI, Ewa WĄSIK

Klinika Hematologii AM w Lublinie

Streszczenie. Na podstawie badań własnych i przeglądu piśmiennictwa wysunięto hipotezę, że różne przypadki przewlekłej białaczki limfaticznej B-komórkowej (PBL-B) pochodzą z odmiennych komórek linii B. Mogą to być: macierzyste komórki wspólne dla linii mieloidalnej i limfocytów B, macierzyste komórki wspólne dla limfocytów B i T, otrzewnowe komórki B CD 5⁺ (wariant stanowiący nawrót do limfopoezy płodowej), grasiczne komórki B CD 5⁺ i szpikowe komórki B CD 5⁻. Być może te odmienne punkty wyjścia PBL-B warunkują obserwowaną przez genetyków, immunologów i klinicystów heterogenność PBL-B.

Summary. Basing on our own results and papers reviewed we hypothesised that various B-cell chronic lymphocytic leukemias (CLL) derive from different B-cell lineages. They include: stem cell with both myeloid and B-cell differentiation ability, stem cell with B- and T-cell differentiation ability, peritoneal B-cell CD 5⁺ (variant form of returning embryonal lymphopoiesis), thymic B-cell CD 5⁺, and myeloid B-cell CD 5⁻. Possibly these different points of origin reflect the heterogeneity of B-cell CLL observed in genetical, immunological and clinical studies.

Od szeregu lat są prowadzone przez nas badania nad heterogennością przypadków przewlekłej białaczki limfaticznej B komórkowej (PBL-B). Śledząc ekspresję powierzchniowych immunoglobulin na białaczkowych komórkach (SIg) oraz cechy wskazujące na zdolność do dojrzewania tych komórek, jak np. badania cytoplazmatycznych immunoglobulin (CytIg), zdolność tworzenia "tysinek" immunologicznych oraz oznaczanie surowiczych immunoglobulin wykazano, że w PBL-B występuje odwracalny blok różnicowania białaczkowych komórek. Blok ten u różnych pacjentów może mieć miejsce na różnych etapach różnicowania komórek linii B, począwszy od komórki pre-B aż do komórki plazmocytoidalnej [47, 48, 49, 50].

Różnym reakcjom komórek limfoidalnych "in vitro" klinicznie odpowiada heterogenność przypadków PBL-B, która przejawia się: różnorodnością obrazów morfologicznych szpiku,

odmiennością fenotypów immunologicznych limfocytów krwi obwodowej w różnych przypadkach (m.in. stopniem ekspresji SIg, a także stopniem przemieszania cech niedojrzałości i dojrzałości populacji limfocytów krwi obwodowej) i wreszcie wiąże się z odpowiedzią klonu białaczkowego na leczenie [29].

Prowadząc badania SIg limfocytów krwi obwodowej, szpiku i węzła chłonnego w części przypadków PBL-B wykazano monoklonalność populacji limfocytów we krwi obwodowej (ten sam łańcuch lekki i ciężki), podczas gdy w szpiku i węzle chłonnym występowała poliklonalność. Różnice te być może wynikają z późniejszego zajęcia szpiku lub węzła chłonnego niż krwi obwodowej, a więc pierwotne miejsce transformacji w przypadkach tych leżałoby pozaszpikowo, a komórki białaczkowe poprzez krew wtórnie zasiedlałyby szpik i węzły chłonne [54, 57, praca przygotowywana do druku].

Wszystkie te nasze obserwacje pozwalają przypuszczać, że w poszczególnych przypadkach PBL-B transformacja nowotworowa może mieć miejsce w różnych subpopulacjach komórek B. Sugestia ta znajduje potwierdzenie w niedawnych publikacjach kilku autorów, którzy u myszy badali komórki B noszące antygen Ly-1 (tzw. komórki B Ly-1⁺).

Mysi antygen Ly-1 jest odpowiednikiem ludzkiego antygeny CD 5 [praca pogładowa 51]. Antygen CD 5 obok monoklonalnych SIg i klonalnej rearanżacji genów Ig jest jednym z charakterystycznych markerów komórek PBL-B.

Zdaniem autorów międzynarodowej Grupy Badaczy Francusko-Amerykańsko-Brytyjskich [4] cztery markery decydują o rozpoznaniu przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej, są to:

- słaba ekspresja powierzchniowych immunoglobulin (SIgM lub SIgM i SIgD),
- zdolność tworzenia rozet z erytrocytami myszy przez co najmniej 30% komórek,
- ekspresja antygeny CD 5 na ponad 50% komórek,
- ekspresja antygeny CD 22 na ponad 30% komórek.

U dorosłych osób zdrowych występuje także niewielka populacja limfocytów B noszących antygen CD 5. Populacja limfocytów B CD 5⁺ tworzy klon komórek długo żyjących, ponieważ obok antygeny CD 5 ma także (jak wszystkie zresztą komórki B) jego ligand – antygen CD 72. W związku z tą niezwyklej koincydencją van de Velde i wsp. [63] sugerują, że interakcja CD 5 ⇌ CD 72 powoduje autostymulacyjny wzrost komórek białaczkowych. Z drugiej jednak strony Tooze i wsp. [62] wykazali, że na komórkach CD 5⁺ chorych z PBL-B występują różnice w ekspresji CD 5 i CD 72 w porównaniu z komórkami B CD 5⁺ z krwi pępowinowej. Mianowicie komórki chorych z PBL-B noszą o 150% więcej antygeny CD 5 niż komórki B z krwi pępowinowej, przeciwnie natomiast te ostatnie charakteryzuje o 70% wyższa ekspresja antygeny CD 72. Badania *messenger RNA* (mRNA) antygenów CD 5 i CD 72 wprawdzie potwierdziły, że wartości CD 5 mRNA z komórek PBL-B są o 200% wyższe niż z komórek krwi pępowinowej, ale także CD 72 mRNA było o 160% wyższe niż z komórek B krwi pępowinowej. Zdaniem autorów wysokie wartości CD 72 mRNA przy jego niskiej ekspresji na powierzchni komórek PBL-B mogą świadczyć albo o niestabilności białka CD 72, albo o jego modulacji. Komórki PBL-B wykazują ponadto szereg innych cech wspólnych z prawidłowymi komórkami B CD 5⁺. Do tych wspólnych cech m.in. należą:

- ◊ niski stopień ekspresji SIg,
- ◊ zdolność tworzenia rozet z erytrocytami myszy,
- ◊ zdolność wytwarzania autoprzeciwciał (stąd stosunkowo częste występowanie chorób autoimmunologicznych u chorych z PBL-B).

W warunkach prawidłowych populacja limfocytów B CD 5⁺ występuje przede wszystkim w życiu płodowym. Antygen CD 5 pojawia się między 22 a 24 tygodniem życia płodowego na powierzchni głównej populacji komórek B, którą cechuje niski stopień ekspresji SIg (SIgM i SIgD). Komórki B CD 5⁺ stanowią główną populację (40–60%) komórek B w płodowej śledzionie, węzłach chłonnych i krwi pępowinowej [2, 5, 7, 21, 46]. Po okresie okołoporodowego zmniejszenia się populacji komórek B wywołanego przeciwciałami anti-mi, regenerują niemal wyłącznie komórki B CD 5⁻ ujemne (B CD 5⁻). Niemniej jednak antygen CD 5 występuje na powierzchni subpopulacji komórek B u osób dorosłych stanowiącej 15–25% komórek B krwi obwodowej i śledziony [8]. Komórki B CD 5⁺ u dorosłych spotyka się także na obwodzie centrów rozrodczych węzłów chłonnych (*mantle zone B cells*) [7] i w migdałkach, ale nie znaleziono ich w szpiku [16], względnie wykryto w śladowych ilościach (niepublikowane badania własne). Komórki B CD 5⁺ stanowią więc odrębną, samoodnawiającą się subpopulację odmienną od "konwencjonalnych" komórek B CD 5⁻ [22].

U dorosłych myszy komórki Ly-1⁺ stanowią główną populację komórek limfoidalnych w jamach: otrzewnowej, opłucnowej i osierdziowej, które wykształcają się z płodowej jamy ciała. Także w wysiękach otrzewnowych [22, 38] i opłucnowo-osierdziowych [32] przeważa populacja komórek B Ly-1⁺. Ponadto komórki B Ly-1⁺ występują w blaszce właściwej jelit (komórki w większości wytwarzające IgA) [30]. Natomiast w innych obwodowych narządach limfoidalnych komórki te spotyka się w znikomym odsetku (poniżej 5%).

Wybiórcze nagromadzenie się komórek B CD 5⁺ w anatomicznie odrębnych jamach: opłucnowo-osierdziowej z jednej strony i otrzewnowej z drugiej, zdaniem Marcosa i wsp. [33] sugeruje, że albo one same, albo ich prekursorzy skolonizowały płodową jamę ciała (*coelom*) jeszcze przed podzieleniem jej przez przeponę (w 13–14 dniu życia płodowego myszy).

Autorzy ci przypuszczają, że komórki B Ly-1⁺ odpowiadają najwcześniejszemu okresowi limfopoezy w życiu zarodkowym ssaków i są komórkami "założycielskimi" (*founder*) linii limfocytów B. Prawdopodobnie są one pierwszą generacją pochodzącą od płodowej limfopoetycznej komórki macierzystej znajdującej się w ogniskach przyaortalnych i zdolnej do regionalnego kolonizowania tkanek hemopoetycznych. Z płodowej jamy ciała komórki B CD 5⁺ migrują do śledziony, gdzie pod wpływem komórek T ulegają wybiórczej proliferacji i kolonizują sąsiadujące struktury epitelialno-mezenchymalne. (U osobników dorosłych pozostałością płodowej jamy ciała jest otrzewna.)

Natomiast linia szpikowej komórki B SIg⁺, Ly-1⁻ rozwija się w późniejszym okresie ontogenezy, dopiero po okołoporodowym zasiedleniu szpiku przez komórki macierzyste. U zdrowych osobników dorosłych komórki B Ly-1⁻ stanowią dominującą populację krótko żyjących limfocytów B. Jednakże powstanie i rozwój tej populacji są zdaniem Marcosa i wsp. [33] regulowane przez komórki B Ly-1⁺ z płodowej jamy ciała.

Interesujące są także powiązania między limfocytami B Ly-1⁺ a limfocytami T z ekspresją łańcuchów gamma i delta receptora komórki T. Zarówno epitelialne komórki T gamma⁺, delta⁺, jak i komórki B Ly-1⁺ charakteryzuje:

- brak różnorodności złączy (*junctions*) rearanżowanych genów kodujących ich receptory,
- unikalne umiejscowienie (m.in. w strukturach związanych z jelitami), gdzie stanowią dominującą populację,
- zdolność do samoodnowy,
- powstawanie we wczesnym okresie ontogenezy z bardzo młodej rozwojowo komórki macierzystej, która w miarę rozwoju osobniczego jest tracona i nie występuje u osobników dorosłych, przy czym komórki T gamma⁺, delta⁺ różnicują się poza grasicą,

- zdolność do odpowiedzi na własne antygeny i ekspresja obu tych klonów (komórek T gamma⁺, delta⁺ i B Ly-1⁺) w różnych stanach immunopatologicznych,
- zdolność pewnych komórek T gamma⁺, delta⁺ do specyficznego rozpoznawania idiotypów SIg na komórkach B Ly-1⁺ [25, 33].

Epitelialne komórki T gamma⁺, delta⁺ powstające najwcześniej, wybiórczo migrują do skóry i nabłonek (m.in. nabłonek jelitowy u myszy), gdzie stanowią dominującą populację. Komórki B Ly-1⁺, które pojawiają się mniej więcej w tym samym czasie co jelitowe komórki T gamma⁺, delta⁺, stanowią dominującą populację w otrzewnej. Należy tutaj dodać, że prymitywne organizmy w jamie ciała mają jedynie powierzchnię nabłonkową zamykającą pierwotne jelito [25].

Poza otrzewną komórki B Ly-1⁺ niespodziewanie wykryto w grasicy myszy [1, 36]. Jak się wydaje grasicze komórki B Ly-1⁺ różnią się co najmniej czterema cechami od otrzewnowych komórek B Ly-1⁺.

Po pierwsze: Grasicze komórki B Ly-1⁺ mają znacznie więcej SIg niż ich odpowiednik z otrzewnej, ale nigdy nie wytwarzają spontanicznie autoprzeciwciał [36]. Natomiast otrzewnowe komórki B Ly-1⁺ są aktywnymi komórkami wytwarzającymi spontanicznie autoprzeciwciała [8, 20, 21, 23], chociaż autoprzeciwciała te cechuje niski stopień powinowactwa zarówno wobec własnych, jak i obcych antygenów [9]. Jak się wydaje fizjologiczna rola tych przeciwciał polega na oczyszczeniu (*clearing*) krwi z krążących własnych antygenów, dzięki czemu zmniejsza się ryzyko autoimmunizacji, zwłaszcza że autoantygeny nawet w warunkach prawidłowych są stale uwalniane z rozpadających się tkanek.

Po drugie: Grasicze komórki B Ly-1⁺ noszą najczęściej łańcuch lekki kappa, podczas gdy otrzewnowe komórki B Ly-1⁺ charakteryzuje zwiększona ekspresja łańcucha lekkiego lambda [cyt. wg 59].

Po trzecie: Odsetek (ok. 60%) grasiczych komórek B Ly-1⁺ utrzymuje się na stałym poziomie począwszy od okresu życia płodowego aż do dojrzałości [39]. Natomiast odsetek otrzewnowych komórek B Ly-1⁺ ulega obniżeniu wraz z dojrzewaniem zwierzęcia. I tak u 4-tygodniowej myszy odsetek komórek B Ly-1⁺ w otrzewnej wynosi 46%, zaś u 3-miesięcznej myszy tylko 16%, chociaż ich bezwzględna liczba wzrasta z wiekiem [20, 28].

Po czwarte: Than i wsp. [59] wykazali, że u letalnie napromienionej myszy C57BL/6 grasicze komórki B Ly-1⁺ mogą być rekonstruowane przez przeszczepienie szpiku. Sugeruje to, że pochodzenie grasiczych komórek B Ly-1⁺ jest takie same jak "konwencjonalnych" komórek B Ly-1⁻. Natomiast otrzewnowe komórki B Ly-1⁺ mogą zostać zrekonstruowane dopiero po przeszczepieniu płodowej wątroby (14-dniowego płodu). Komórki płodowej wątroby mają zresztą także zdolność do rekonstrukcji grasiczych komórek B Ly-1⁺.

Na rysunku 1 cytowanej pracy Thana i wsp. [59] graficznie przedstawiono hipotetyczny model rozwoju otrzewnowych i grasiczych komórek B Ly-1⁺ oraz "konwencjonalnych" komórek B Ly-1⁻.

Jeśli hipotezy Marcosa i wsp. [33] oraz Thana i wsp. [59] okażą się prawdziwe również w odniesieniu do ludzkich komórek B CD 5⁺, to należy oczekiwać, że poszczególne przypadki PBL-B pochodzą z różnych populacji komórek B, a co więcej nawet z komórek macierzystych, co sugerowano w naszych wcześniejszych pracach [52, 55, 56].

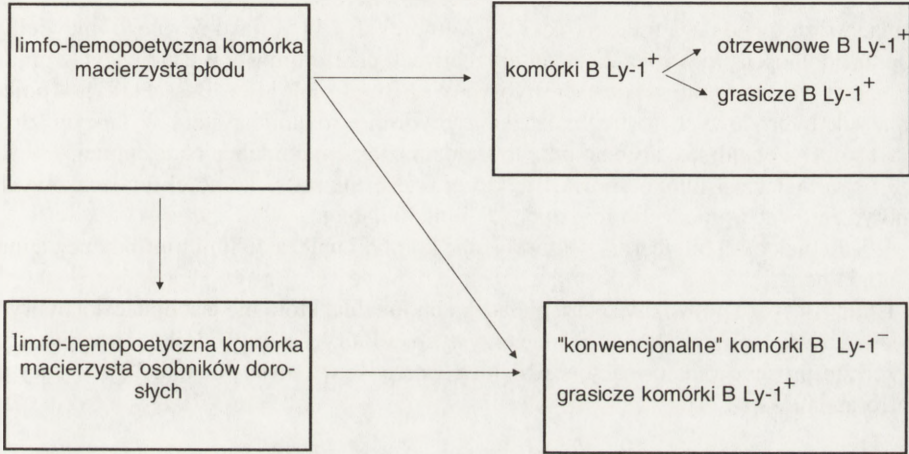
Około 80% przypadków PBL-B jest CD 5⁺ [14, 15]. Białaczki te mogą wychodzić:

◊ albo z otrzewnowych komórek B CD 5⁺, względnie z komórek B CD 5⁺ znajdujących się w innych strukturach limfoidalnych jamy brzusznej (byłby to niejako nawrót do limfopoety płodowej),

◇ albo z grasiczych komórek B CD 5⁺.

Można przypuszczać, że PBL-B pochodzące z otrzewnowych komórek B CD 5⁺ będą charakteryzowały się:

- słabą ekspresją SIg na białaczkowych komórkach,
- zaburzeniami autoimmunologicznymi,
- dużą masą guza w obrębie jamy brzusznej (organomegalia, konglomeraty węzłów chłonnych w otrzewnej, nacieki białaczkowe w jelitach).



Rys. 1. Graficzne przedstawienie hipotezy Thana i wsp. [59], które wykazuje ontogenetyczne różnice między otrzewnowymi a grasiczymi komórkami B Ly-1⁺

Sugestie te uzasadnia fakt, że homologiczne komórki B Ly-1⁺, u myszy zlokalizowane w otrzewnej i w blaszce właściwej jelit, charakteryzują się słabą ekspresją SIg oraz zdolnością do spontanicznego wytwarzania autoprzeciwciał i samoodnowy.

Natomiast białaczki wychodzące z grasiczych komórek B CD 5⁺ powinny cechować się:

- ◆ znacznie grubszą warstwą SIg na białaczkowych komórkach,
- ◆ ekspresją łańcucha kappa,
- ◆ obniżonym poziomem surowiczej IgM,
- ◆ raczej brakiem zaburzeń autoimmunologicznych.

Powyższe przypuszczenia wynikają z tego, że grasicze komórki B Ly-1⁺ u myszy charakteryzuje znacznie silniejsza ekspresja SIg niż ich odpowiednika otrzewnowego, noszą najczęściej łańcuch lekki kappa, nigdy nie wytwarzają spontanicznie przeciwciał, jak również nie wytwarzają IgM ani spontanicznie, ani po stymulacji LPS lub anty IgM plus interleukina 4. Dopiero po kontakcie z antygenem Ia blastycznych komórek T CD 4⁺ mogą proliferować i wytwarzać IgM [59].

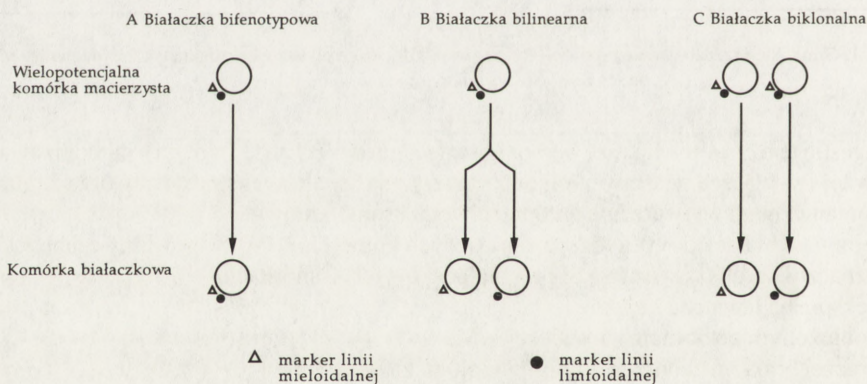
Zdaniem Fagueta i wsp. [14] ok. 20% przypadków PBL-B jest CD 5⁻, chociaż nawet w tych przypadkach we krwi obwodowej ok. 37% komórek B jest CD 5⁺. Ponadto autorzy ci nie przeprowadzili badań fenotypu immunologicznego limfocytów B znajdujących się w tkankach, gdzie populacja komórek B CD 5⁺ może być znacznie większa. Jest prawdopodobne, że przypadki te pochodzą z "konwencjonalnych" komórek B CD 5⁻. Zdaniem autorów

przypadki PBL-B CD 5⁻ klinicznie, hematologicznie i immunologicznie (poza tym że nie noszą antygeny CD 5) są nieodróżnialne od przypadków PBL-B CD 5⁺. Niemniej jednak klon białaczkowy CD 5⁻ był w badaniach tych autorów dwukrotnie mniejszy niż klon CD 5⁺ w przypadkach białaczek CD 5⁺. Stosunkowo małe rozmiary klonu białaczkowego CD 5⁻ można wyjaśnić tym, że komórki B CD 5⁻ nie mają zdolności autostymulacyjnych i bez kontaktu z komórkami T CD 4⁺ nie mogą proliferować [62]. Klinicznie przypadki te przebiegają bez organomegalii i masywnego nacieczenia węzłów chłonnych. Fagurt i wsp. [14] w żadnym z badanych przypadków (14 badanych) nie wykryli monoklonalnej gammopatii, a tylko w jednym wystąpiła ciężka niedokrwistość autohemolityczna. To ostatnie powikłanie można tłumaczyć zarówno dużą frakcją (ok. 37%) komórek B CD 5⁺, jak i pewnego (niewielkiego) stopnia zdolnością do wytwarzania autoprzeciwciał przez komórki B CD 5⁻ [cyt. z pracy 51]

Należy wreszcie omówić postaci hybrydowe PBL-B. Gale i Ben-Bassat [17] pod pojęciem białaczek hybrydowych (ostre białaczki hybrydowe) rozumieją stan, w którym złośliwa transformacja obejmuje zarówno linię limfoidalną, jak i mieloidalną. Należą tutaj:

- ostra białaczka bifenotypowa, w której więcej niż 10% komórek białaczkowych ma fenotyp zarówno komórki limfoidalnej, jak i mieloidalnej,
- ostra białaczka bilinearna, w której jedne komórki należą do linii limfoidalnej, a inne do mieloidalnej.

Istnieje jeszcze prawdziwa ostra białaczka biklonalna, która nie jest białaczką hybrydową i pochodzi z dwu różnych komórek macierzystych, w których zaszły odrębne i przypuszczalnie niezależne procesy transformacyjne. Różnice te przedstawiono na rysunku 2 cytowanej pracy Hoffbranda i wsp. [24].



Rys. 2. Podział ostrych białaczek o mieszanym fenotypie [24]: A – białaczka bifenotypowa – więcej niż 10% komórek blastycznych wykazuje markery charakteryzujące więcej niż jedną linię różnicowania; B – białaczka bilinearna – komórki blastyczne pochodzą od wspólnej komórki macierzystej, ale tworzą dwie odmienne populacje, z których każda wykazuje inny obraz markerów związanych z różnymi liniami różnicowania; występowanie tych różnych populacji można obserwować albo od początku choroby (białaczka synchroniczna), albo w następstwie ewolucji choroby (białaczka metachroniczna, z przełączeniem linii różnicowania); C – białaczka biklonalna – komórki blastyczne pochodzą z dwu różnych komórek macierzystych i tworzą dwa niezależne klony, jest wyjątkowo rzadka

Białaczka bifenotypowa jest zawsze synchroniczna (jednoczasowa), natomiast białaczka bilinearna może być zarówno synchroniczna, jak i metachroniczna (różnoczasowa), np. gdy w przebiegu ostrej białaczki limfoblastycznej rozwinię się ostra białaczka szpikowa. Z

pojęciem metachronicznych białaczek bilinearnych wiąże się "przełączenie linii różnicowania" (*lineage switch*). Gale i Ben-Bassat [17] jako przełączenie linii różnicowania rozumieją występowanie w przebiegu białaczki zmiany dominacji jednej linii różnicowania nad drugą, chociaż obie linie należą do tego samego klonu nowotworowego.

Bifenotypowość stosunkowo często występuje w przypadkach PBL-B. Zwykle białaczkowe komórki B wykazują obecność antygenów komórki T. I tak w ponad 20% przypadków PBL-B [12, 26, 34] wykryto ekspresję antygeny CD 1 c. Antygen ten występuje także na tymocytach części korowej grasicy (choć jego ekspresja jest słaba), komórkach siateczki strefy T (*interdigitating reticulum cells*), płodowych limfocytach B i komórkach Langerhansa [11]. W 5–20% przypadków PBL-B obserwowano słabą, ale wyraźną ekspresję CD 2 [cyt. wg 6]. CD 2 jest markerem komórek T odpowiadającym receptorowi dla krwinek czerwonych barana, określanym także jako antygen T 11 lub jako LFA-3 (*leukocyte function associated antigen - 3*) lub CD 58. Antygen CD 2 odgrywa rolę w adhezji międzykomórkowej i jak się wydaje wiąże jako ligand LFA-3 [11, 36a], LFA-3 występuje na komórkach różnych typów i m.in. jest homologiczny z białkiem T 11TS krwinek czerwonych barana, a więc odgrywa istotną rolę w tworzeniu rozet przez limfocyty T [60]. W około 20% przypadków PBL-B występuje ekspresja antygeny CD 3 [18]. Antygen CD 3 składa się z pięciu różnych łańcuchów polipeptydowych (gamma, delta, epsilon, dzeta i eta) tworzących wraz z dwoma jeszcze innymi łańcuchami (alfa i beta) receptor komórki T [3, 10]. Jednakże łańcuchy gamma, delta, epsilon, dzeta i eta mogą także występować na komórkach innych niż komórki T [11].

Stosunkowo często białaczkowe komórki PBL-B wykazują obecność antygeny CD 6 [cyt. wg 6, 13]. CD 6 jest markerem większości ludzkich komórek T (rozmięszczenie podobne do rozmieszczenia antygeny CD 3), ale także chociaż słabego stopnia jego ekspresję obserwowano na niektórych komórkach B [11]. Donoszono również o ekspresji CD 7 na białaczkowych komórkach [cyt. wg 13]. Antygen ten podobnie jak CD 6 jest markerem większości komórek T. Prawdopodobnie pełni on funkcję receptora dla części FcIgM [11]. W sporadycznych przypadkach PBL-B opisywano ekspresję antygenów CD 4 i CD 8 na białaczkowych komórkach [cyt. wg 6]. Antygen CD 4 jest markerem subpopulacji pomocniczych komórek T, chociaż występuje także na monocytach i makrofagach. (CD 4 m.in. pełni funkcję receptora dla wirusa AIDS). Antygen CD 8 jest markerem subpopulacji supresorowych komórek T [11]. Występowanie markerów komórek T na białaczkowych komórkach PBL-B zostało potwierdzone odkryciem, że w niektórych przypadkach obok klonalnej rearanżacji genów immunoglobulinowych istnieje także klonalna rearanżacja genów receptora komórki T.

Pachmann i wsp. [41] wykazali, że rearanżacja i ekspresja genów łańcucha alfa receptora komórki T jest częsta w PBL-B. Autorzy ci stwierdzili ekspresję mRNA łańcucha alfa w ok. 78% badanych prób (u 14 na 18 badanych), podczas gdy ekspresja mRNA łańcucha beta występowała w ok. 44% (u 7 na 16 badanych). Co więcej wykryli oni okrojone mRNA łańcucha alfa receptora komórki T.

Rearanżacja genów łańcucha beta receptora komórki T także nie jest specyficznym markerem komórki T występuje bowiem w 10% do 30% chłoniaków i białaczek wychodzących prekursorowych lub bardziej dojrzałych komórek B [19, 35]. Norton i wsp. [40] u 7% chorych z PBL-B (4 chorych w grupie 59 badanych) stwierdzili rearanżację genów łańcucha beta, przy współistniejącej rearanżacji łańcuchów ciężkich i lekkich Ig. Natomiast Dighiero i wsp. [13] podają, że klonalna rearanżacja łańcucha beta receptora komórki T występuje aż w 25% przypadków PBL-B. Opisano przypadek PBL-B z rearanżacją genów łańcuchów alfa, beta i gamma receptora komórki T obok rearanżacji genów łańcuchów IgM i kappa [42].

Doniesiono także o rearanzacji genów łańcucha delta w chłoniakach B komórkowych o niskim stopniu złośliwości (chłoniaki limfocytarne, centrocytarne i centroblastyczno-centrocytarne typu grudkowego) [61].

Istnieją sporadyczne doniesienia o bilinearnych przypadkach PBL-B. Shinohara i wsp. [58] opublikowali przypadek PBL-B, w którym wykryto takie same aberracje chromosomowe w hodowlach komórek stymulowanych trzema różnymi mitogenami (fitohemaglutyniną, mitogenem szkarłatki i wirusem Epsteina-Barr). 50% analizowanych metafaz już w trzecim dniu hodowli po stymulacji fitohemaglutyniną wykazywało nieprawidłowy kariotyp. Zdaniem autorów tak wczesne (w trzecim dniu hodowli) wystąpienie podziałów komórkowych sugeruje, że dzieliły się komórki T (białaczkowe komórki B od chorych z PBL-B dzielą się dopiero w piątym lub szóstym dniu hodowli).

Podobnie w opublikowanym przez nas przypadku PBL-B (chory J.H.) [53] aberracje chromosomowe (50% analizowanych metafaz) występowały w hodowlach komórek stymulowanych fitohemaglutyniną lub mitogenem szkarłatki już w trzecim dniu po stymulacji. Ponadto u naszego pacjenta oba te mitogeny indukowały zwłaszcza proliferację komórek T. Być może wszystkie te przypadki wychodzą z komórki macierzystej wspólnej dla linii komórek B i T, co sugerowaliśmy w naszych wcześniejszych pracach [52, 55, 56].

Kilku autorów [37, 43, 44, 45] w niektórych przypadkach PBL-B wykryło na białaczkowych komórkach ekspresję antygenów linii mielo-monocytów, takich jak: CD 11 b, CD 11 c, CD 13, CD 14, CD 15 i CD 33. Pinto i wsp. [45] sądzą, że 20–25% przypadków PBL-B charakteryzuje ekspresja kilku antygenów linii mielo-monocytów, przy czym białaczkowe komórki B CD 13⁺, CD 14⁺ i CD 33⁺ znajdują się nie tylko we krwi krążącej, ale również są osiadłe w węzłach chłonnych. Zdaniem tych autorów ekspresja CD 13 (30% badanych przypadków) i CD 33 (12% badanych przypadków) ma niepomysłne znaczenie prognostyczne i wiąże się z dużą masą nowotworu i rozlanym nacieczeniem szpiku.

CD 13 (aminopeptydaza N) dzięki zdolności do miejscowego zagęszczania aktywnych biologicznie peptydów odgrywa rolę w modulacji wzajemnych reakcji między komórkami oraz między komórkami a mikrośrodowiskiem [27, 31]. U osób zdrowych CD 13 występuje na powierzchni monocytów, granulocytów, niektórych makrofagów i komórek tkanki łącznej [11]. Ekspresję CD 33 wykryto na komórkach prekursorowych linii granulocytów (na dojrzających granulocytach ekspresja CD 33 występuje tylko sporadycznie i jest słabego stopnia) oraz na monocytach [11]. A zatem PBL-B z ekspresją CD 13 i/lub CD 33 można zaliczyć do białaczek bifenotypowych wychodzących z komórki macierzystej wspólnej dla linii limfocytów B i linii mielo-monocytów. Z badanych przez Pinto i wsp. [45] 25 przypadków PBL-B CD 13⁺ aż w 9 przypadkach nie stwierdzono ekspresji antygeny CD 5 (wariant PBL-B CD 5⁻ jest wariantem rzadkim), co potwierdza założenie, że przypadki te pochodzą z macierzystych komórek szpiku.

Na podstawie badań własnych i przeglądu piśmiennictwa, możemy zatem sugerować, że PBL-B w różnych przypadkach wychodzi z różnych komórek linii B, a mianowicie z:

- macierzystych komórek wspólnych dla linii mieloidalnej i limfocytów B,
- macierzystych komórek wspólnych dla linii limfocytów B i T,
- otrzewnowych komórek B CD 5⁺ (ta postać stanowiłaby niejako nawrót do limfopozy płodowej),
- grasiczych komórek B CD 5⁺,
- szpikowych komórek B CD 5⁻.

Wydaje się więc, że choroba określana jako PBL-B jest w istocie grupą różnych chorób wychodzących z różnych komórek linii B, różniących się obrazem klinicznym, przebiegiem i reakcją na leki. Ostateczne udowodnienie powyższej hipotezy wymaga dalszych badań.

LITERATURA

- [1] ANDREU JL, FARO J, ALONSO JM, PAIGE CJ, MARTINEZ AC, MARCOS MAR. Ontogenic characterization of thymic B lymphocytes. Analysis in different mouse strains. *Eur J Immunol* 1990; **20**: 1767–1773.
- [2] ANTIN JH, EMERSON SG, MARTIN P, GADOL N, AULT KA. Leu-1⁺ (CD 5⁺) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functional studies. *J Immunol* 1986; **136**: 505–510.
- [3] BANIYASH M, GRACIA-MORALES P, BONIFACINO JS, SAMELSON LE, KLAUSNER RD. Disulfide linkage of the zeta and eta chains of T cell receptor: Possible identification of two structural classes of receptors. *J Biol Chem* 1988; **263**: 9874–9878.
- [4] BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DAG, GRALNICK HR, SULTAN C. The French-American-British (FAB) Cooperative group: Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. *J Clin Pathol* 1989; **42**: 567–584.
- [5] BOFILL M, JANOSSY G, JANOSSA M, BURFORD GD, SEYMOUR GJ, WERNET P, KELEMAN E. Human B cell development. II Subpopulations in the human fetus. *J Immunol* 1985; **134**: 1531–1538.
- [6] CALIGARIS-CAPPIO F. B-lymphoproliferations and normal B-cell differentiation. [w] B Lymphocytes in Human Disease. G Bird, JE Calvert [red] Oxford-New York-Tokyo, Oxford University Press 1988: 321–353.
- [7] CALIGARIS-CAPPIO F, GOBBI M, BOFILL M, JANOSSY G. Infrequent normal B lymphocytes express features of B chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 1982; **155**: 623–627.
- [8] CASALI P, BURASTERO SE, NAKAMURA M, INGHIRAMI G, NOTKINS AL. Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1⁺ B-cell subset. *Science* 1987; **236**: 77–81.
- [9] CASALI P, PRABHAKAR BS, NOTKINS AL. Characterization of multireactive autoantibodies and identification of Leu-1⁺ B lymphocytes as cells making antibodies binding multiple self and exogenous molecules. *Int Rev Immunol* 1988; **3**: 17–45.
- [10] CLEVERS H, ALARCON B, WISEMAN T, TERHORST CA. The T cell receptor/CD 3 complex: A dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 1988; **6**: 629–662 (108 ref).
- [11] DAKOPATS - Katalog. The CD System Classification of Human Leucocyte Antigens. 1991.
- [12] DELIA D, CATTORETTI G, POLLI N, FONTANELLA E, AIELLO A, GIARDINI R, RILKE F, PORTA GD. CD 1 c but neither CD 1 a nor CD 1 b molecules are expressed on normal, activated, and malignant human B cells: Identification of a new B-cell subset. *Blood* 1988; **72**: 241–247.
- [13] DIGHIERO G, TRAVADE P, CHEVRET S, FENAUX P, CHASTANG C, BINET J-L, French Cooperative group on CLL: B-cell chronic lymphocytic leukemia: Present status and future directions. *Blood* 1991; **78**: 1901–1914.
- [14] FAGUET GB, AGEE JF, MARTI GE. CD 5 and cLLa expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL): Demonstration of their relative prevalence and that of other common B-CLL markers. *LeucLymph* 1992; **6**: 335–344.
- [15] FAGUET GB, AGEE JF, MARTI GE. Clone emergence and evolution in chronic lymphocytic leukemia: Characterization of clinical, laboratory and immunophenotypic profiles of 25 patients. *Leuc-Lymph* 1992; **6**: 345–356.
- [16] FREEDMAN AS, BOYD AW, BIEBER F, DALEY J, ROSEN K, HOROWITZ J, LEVY D, NADLER LM. Normal cellular counterparts of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1987; **70**: 418–427.
- [17] GALE RP, BEN-BASSAT J. Annotation: Hybrid acute leukemia. *Br J Haematol* 1987; **65**: 261–264.
- [18] GALE PR, RAI KR. New insights into a chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1987; **1**: 677–679.
- [19] GREAVES MF, MIZUTANI S, FURLEY AJW, SUTHERLAND DR, CHAN LC, FORD AM, MOLGAARD HV. Differentiation-linked gene rearrangement and expression in acute lymphoblastic leukaemia. *Clinics Haemat* 1986; **15**: 621–639.
- [20] HARDY RR, HAYAKAWA K. Development and physiology of Ly-1 B and its human homolog Leu-1 B. *Immunol Rev* 1986; **93**: 53–79.
- [21] HARDY RR, HAYAKAWA K, SHIMIZU M, YAMASAKI K, KISHIMOTO T. Rheumatoid factor secretion from human Leu-1⁺ B cells. *Science* 1987; **236**: 81–83.

- [22] HAYAKAWA K, HARDY RR. Normal, autoimmune, and malignant CD 5⁺ B cells: the Ly-1 B lineage? *Annu Rev Immunol* 1988; **6**: 197–218.
- [23] HAYAKAWA K, HARDY RR, PARKS DR, HERZENBERG LA. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodefective and autoimmune mice. *J Exp Med* 1983; **157**: 202–218.
- [24] HOFFBRAND AV, LEBER BF, BROWETT PJ, NORTON JD. Mixed acute leukaemias. *Blood Rev* 1988; **2**: 9–15.
- [25] JANEWAY ChA Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992; **13**: 11–16.
- [26] JONES RA, MASTER PS, CHILD JA, ROBERTS BE, SCOTT CS. Diagnostic differentiation of chronic B-cell malignancies using monoclonal antibody L 161 (CD1c). *Br J Haematol* 1989; **71**: 43–46.
- [27] KENNY AJ, O'HAREMJ, GUSTERSON BA. Cell surface peptidase as modulators of growth and differentiation. *Lancet* 1989; **2**: 785–787.
- [28] KIPPS TJ. The CD 5 B-cells. *Adv Immunol* 1989; **47**: 17.
- [29] KOWAL M, RUPNIEWSKA ZM. Heterogenność przypadków przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej, a także heterogenność w obrębie populacji białaczkowych komórek. *Acta Haematol Pol* 1990; **21**: 32–45.
- [30] KROESE FGM, BUTCHER EC, STALL AM, LALOR PA, ADAMS S, HERZENBERG LA. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int Immunol* 1989; **1**: 75–84.
- [31] LOOK AT, ASHMUR RA, SHAPIRO LH, PEIPER SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD 13 (gp 150) is identical to aminopeptidase *N*. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1299–1307.
- [32] MARCOS MAR, HUETZ F, PEREIRA P, ANDREU JL, MARTINEZ AC, COUNTINHO A. Further evidence for coelomic-associated B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 2031–2035.
- [33] MARCOS MAR, GUTIERREZ JC, HUETZ F, MARTINEZ AC, DIETERLEN-LIÈVRE F. Waves of B-lymphopoiesis in the establishment of the mouse B-cell compartment. (Editorial). *Scand J Immunol* 1991; **34**: 129–139.
- [34] MERLE-BERAL H, BOUMSELL L, MICHEL A, DEBRÉ P. CD 1 expression of B-CLL lymphocytes. *Br J Haematol* 1989; **71**: 209–212.
- [35] MINDEN MD, MAK TW. Review: The structure of the T cell antigen receptor genes in normal and malignant T cells. *Blood* 1986; **68**: 327–336.
- [36] MIYABA-TNABA M, KUMA SI, INABA K, OGATA H, IWAI H, YASUMIZU R, MURAMATSU S, STEINMAN RM, IKEHARA S. Unusual phenotype of B cells in the thymus of normal mice. *J Exp Med* 1988; **168**: 811–816.
- [36a] MOINGEON P, CHANG H-Ch, WALLNER BP, STEBBINS Ch, FREY AZ, REINHERZ EL. CD 2 - mediated adhesion facilitates T lymphocyte antigen recognition function. *Nature* 1989; **339**: 312–314.
- [37] MORABITO F, PRASTHOFER EF, DUNLAPNE, GROSSICE, TIELDEN AB. Expression of myelomonocytic antigens on chronic lymphocytic leukemia B cells correlates with their ability to produce Interleukin 1. *Blood* 1987; **70**: 1750–1757.
- [38] MÖLLER G. [red]: B-cell lineages. *Immunol Rev* 1986; **93**: 5–164.
- [39] NANGO K, INABA M, INABA K, ADACHI Y, THANS, ISHIDA T, KUMAMOTOT, UYAMAM, IKEHARA S. Ontogeny of thymic B cells in normal mice. *Cell Immunol* 1991; **133**: 109–115.
- [40] NORTON JD, PATTINSON J, HOFFBRAND AV, JANI H, YAXLEY JC, LEBER BF. Rearrangement and expression of T cell antigen receptor genes in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1988; **71**: 178–185.
- [41] PACHMANN K, RAGHAVACHAR A, BARTRAM C, EMMERICH B, THIEL E, ZIEGLER-HEITBROCK HWL. T cell receptor alpha expression in B-type chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1989; **3**: 497–500.
- [42] PERL A, DiVINCENZO JP, RYANDH, GERGELY P, SZIGETI A, FEHER J, ABRAHAM GN. Rearrangement of the T-cell receptor alpha, beta and gamma chain genes in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 1990; **14**: 131–137.
- [43] PINTO A, COLLETA G, Del VECCHIO A, ROSATI R, ATTADIA V, CIMINO R, COLOMBATTI A. C-fos expression in human hemopoietic malignancies is restricted to acute leukemias with monocytic phenotype and to subsets of B-cell leukemias. *Blood* 1987; **70**: 1450–1457.
- [44] PINTO A, ZAGONEL V, CARBONE A, MAROTTA G, De ROSA L, GLOGHINI A, BULLIAN PL, ATTADIA V, MAIO M, Del VECCHIO L, COLOMBATTI A. The expression of myelomonocytic antigens on chronic lymphocytic leukaemia B-cells identifies a subset of patients with a "variant" CLL phenotype and different biological and clinicopathological features. [w]:Leucocyte typing IV. W Knapp [red] Oxford, Oxford University Press 1989; 929–930.

- [45] PINTO A, ZAGONEL V, CARBONE A, SERRAINO D, MAROTTA G, VOLPE R, COLOMBATTI A, Del VECCHIO A. CD 13 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with the pattern of bone marrow infiltration. *Leuc-Lymph* 1992; **6**: 209–218.
- [46] ROSENTHAL P, RIMM IJ, UMIEL T, GRIFFIN JD, OSATHANONDH R, SCHLOSSMAN SF, NADLER LM. Ontogeny of human hematopoietic cells: Analysis utilizing monoclonal antibodies. *J Immunol* 1983; **31**: 232–237.
- [47] ROŻYŃKOWA D, ANTOSZ H, RUPNIEWSKA ZM, KUROWSKA M, KULIG A, WELCZ B, GÓRSKI G, WOJCIEROWSKI J. Interindividual phenotypic variations in CLL lymphocytes: Indication of different maturation blocks. *Acta Antropogenetica* 1985; **9**: 48–62.
- [48] ROŻYŃKOWA D, ANTOSZ H, RUPNIEWSKA ZM. Experimentelle Versuche zur Differenzierung der B Lymphozyten: Unterschiede in der Antwort auf zwischen CLL-Kranken *Verh. Tsch Ges Path* 1988; **72**: 441.
- [49] ROŻYŃKOWA DM, ANTOSZ H, RUPNIEWSKA ZM, FILIPOWSKA A. Maturation of human B cells "in vitro" under the influence of MLC and *Staphylococcus aureus* conditioned medium. Preliminary report. *Acta Antropogenetica* 1989 (zeszyt "polski").
- [50] ROŻYŃKOWA D, RUPNIEWSKA ZM, ANTOSZ H. Different maturation capabilities of chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes "in vitro". *Cytobios* 1986; **48**: 31–37.
- [51] RUPNIEWSKA ZM, DMOŚZYŃSKA A. Antygen CD 5 i jego rola w stanie fizjologicznym i w patologii. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 45–59.
- [52] RUPNIEWSKA ZM, ROŻYŃKOWA D. Z której linii różnicowania pochodzi przewlekła białaczka limfatyczna B-komórkowa (część II). *Post Hig Med Dośw* 1988; **42**: 315–338.
- [53] RUPNIEWSKA ZM, ROŻYŃKOWA DM, ANTOSZ H, KOWAL M, ROLIŃSKI J, MRUGAŁA H. Dalsze obserwacje przewlekłych białaczek B-komórkowych z proliferacją komórek T (opis dwu przypadków). *Immunologia Polska* 1988; **13**: 49–57.
- [54] RUPNIEWSKA ZM, ROŻYŃKOWA D, ANTOSZ H, KOWAL M, WACH M, ROLIŃSKI J, DMOŚZYŃSKA A. Comparison of lymphocytic phenotypes in the blood and lymph nodes of patients with CLL and the leukaemic type of lymphoplasmacytoid lymphoma (Abstract) Xth Congress of the International Society of Haematology (European and African Division). Jerusalem, Israel, September 3–8 1989: 72.
- [55] RUPNIEWSKA ZM, WACH M. Charakterystyka immunologiczna przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 271–286.
- [56] RUPNIEWSKA ZM, WACH M, KOWAL M, ROLIŃSKI J, ANTOSZ H. Fenotyp immunologiczny limfocytów przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej. Część I: Limfocyty B i T w przewlekłej białaczce limfatycznej. *Acta Haematol Pol* 1992; **23**: 21–27.
- [57] RUPNIEWSKA ZM, ROŻYŃKOWA D, ANTOSZ H, KOWAL M, WACH M, ROLIŃSKI J. Fenotyp immunologiczny limfocytów przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej. Część II: Badania własne fenotypu immunologicznego limfocytów krwi obwodowej i węzła chłonnego u chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną, lub białaczkową postać chłoniaka limfoplazmocytoidalnego. *Acta Haematol Pol* 1992; **23**: 29–41.
- [58] SHINOHARA T, MIWA S, HASEGAWA S, YAMAMOTO K, TONOMURA A. Cytogenetic study of chronic lymphocytic leukemia in ten japanese patients with a case of the same chromosome abnormality both in T and B cells. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; **34**: 295–303.
- [59] THAN S, INABA M, INABA K, FUKUBA Y, ADACHI Y, IKEHARA S. Origin of thymic and peritoneal Ly-1 B cells. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 1299–1303.
- [60] TIEFENTHALER G, DUSTIN ML, SPRINGER TA, HUNIG T. Serologic cross reactivity of T11 target structure and LFA-3. Evidence for structural homology of the sheep and human ligands of CD 2. *J Immunol* 1987; **139**: 2696–2701.
- [61] TKACHUK DC, GRIESSER H, TAKIHARA E, CHAMPAGNE E, MINDEN M, FELLER AC, LENNERT K, MAK TW. Rearrangement of T-cell delta locus in lymphoproliferative disorders. *Blood* 1988; **72**: 353–357.
- [62] TOOZE JA, BEVAN DH, LEVER AML. CD 5⁺ B-cells in chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) have discordant expression of CD 5 and its ligand CD 72 compared to CD 5⁺ B-cells in cord blood. (Abstract no 861). 24-th Congress of the International Society of Haematology. 23–27 August 1992: 227.
- [63] Van de VELDE H, von HOEGEN I, LUO W, PARNES JR, THIELEMANS K. The B-cell surface protein CD 72/Lyb-2 is the ligand for CD 5. *Nature* 1991; **351**: 662–665.

Otrzymano: 24.07.1992 r.

Przyjęto: 07.10.1992 r.

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

SFINGOMIELINA – METABOLIZM, ROLA I ZNACZENIE W BŁONACH BIOLOGICZNYCH

SPHINGOMYELIN – METABOLISM, ROLE AND SIGNIFICANCE IN BIOLOGICAL MEMBRANES

Mariola RAKOWSKA, Józef ZBOROWSKI

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

Streszczenie. Sfingomielina (SPM) jest lipidem występującym powszechnie w tkankach zwierzęcych. Jest składnikiem błon komórkowych oraz lipoprotein surowicy krwi. Pełni istotną rolę w tworzeniu i utrzymywaniu dwuwarstwowej struktury lipidowej błony, rozmieszczeniu cholesterolu, a także wywiera istotny wpływ na właściwości fizyko-chemiczne błon oraz ich przepuszczalność względem jonów. Metabolizm SPM ma zasadnicze znaczenie dla zapewnienia prawidłowego funkcjonowania błon biologicznych i utrzymania homeostazy organizmu. Zaburzenia katabolizmu SPM są przyczyną niektórych chorób, takich jak choroba Niemann-Picka i miażdżyca. Sfingosyna, produkt degradacji SPM, hamując kinazę białkową C, uczestniczy w regulacji przekazu informacji w komórce.

Słowa kluczowe: sfingomielina – metabolizm, właściwości fizyko-chemiczne, przekaznictwo sygnałowe

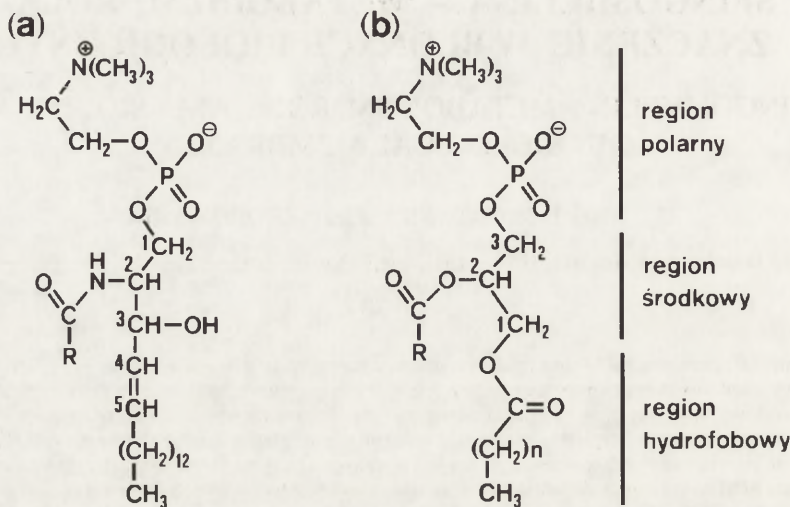
Summary: Sphingomyelin is a lipid generally distributed in animal tissues. It is an essential component of cellular membranes and serum lipoproteins. Sphingomyelin plays an important role in formation and maintenance of bilayer structure of the membrane, as well as in cholesterol binding and distribution. Sphingomyelin modifies also physico-chemical properties of the membrane and its permeability for the ions. The metabolism of this lipid is fundamental for the proper function of the biological membranes and the organism homeostasis. Such diseases, as Niemann-Pick disease and atherosclerosis, are due to some disorders in sphingomyelin catabolism. Moreover, sphingosine, the product of sphingomyelin degradation, being a strong inhibitor of protein kinase C, influences the cellular signal transduction.

Key words: sphingomyelin – metabolism, physico-chemical properties, signal transduction.

Wykaz używanych skrótów: SPM – sfingomielina, PC – fosfatydylocholina, PS – fosfatydyloseryna, PE – fosfatydyloetanolamina, PI – fosfatydyloinozytol, HDL, LDL i VLDL – lipoproteiny odpowiednio o wysokiej, niskiej i bardzo niskiej gęstości.

BUDOWA SFINGOMIELINY

Sfingomielin (SPM, 2-N-acetylo-sfingomielin, ceramido-1-fosforylocholina) jest obok fosfatydylocholina jednym z głównych lipidów tkanek zwierzęcych tworzących dwuwarstwę lipidową błon. Cząsteczka sfingomieliny zbudowana jest z łatwo ulegającego hydrolizie alkalicznej ceramidu i fosforylocholina (rys. 1).



Rys. 1. Porównanie struktury SPM (a) i PC (b); wiązanie podwójne występujące w cząsteczce SPM pomiędzy C₄ i C₅ jest wiązaniem "trans"; R – w cząsteczce SPM to długołańcuchowy kwas tłuszczowy nasycony bądź mononienasycony, podczas gdy w cząsteczce PC – to kwas nienasycony zawierający od 1 do 6 wiązań podwójnych

Ceramid (N-acylosfingozyna) jest zbudowany ze sfingozyny i kwasu tłuszczowego, połączonych wiązaniem amidowym. Oprócz sfingozyny (trans-4-sfinganiny) w SPM tkanek zwierzęcych występować mogą i inne zasady, takie jak: sfinganina (dihydrosfingozyna) i fitosfingozyna (4-D-hydroksysfinganina).

Cząsteczki SPM charakteryzują się obecnością długołańcuchowych kwasów tłuszczowych nasyconych lub mononienasyconych, o długości łańcucha 16–24 atomów węgla. Kwasy tłuszczowe wielonienasycone stanowią niewielki procent wszystkich kwasów. W tkance nerwowej ssaków głównymi kwasami tłuszczowymi są kwas stearynowy (C18:0) i lignocerynowy (C24:0), a wśród nienasyconych – kwas nerwonowy (C24:1) [1].

W porównaniu z PC, cząsteczka SPM jest bardziej asymetryczna. Obecność w cząsteczce SPM wolnej grupy hydroksylowej przy węglu trzecim, a także wiązania amidowego stwarza możliwość utworzenia wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego, co w znacznym stopniu usztywnia jej cząsteczkę. W efekcie, cząsteczka SPM z bardziej stabilną strukturą i

przewagą nasyconych kwasów tłuszczowych wykazuje wyższą temperaturę przejścia fazowego w porównaniu z PC [76]. Ponadto, obecność w cząsteczce SPM wolnych grup hydroksylowych (w łańcuchu sfingozyny i ewentualnie w łańcuchu kwasu tłuszczowego) oraz obecność grupy amidowej powoduje, że może być ona zarówno donorem, jak i akceptorem protonu [76], podczas gdy PC może być jedynie jego akceptorem.

BIOSYNTeza SFINGOMIELINY

Pierwszym etapem biosyntezy SPM (rys. 2) jest reakcja kondensacji L-seryny z palmitoilo-CoA [17,71], w wyniku której powstaje 3-ketodihydrosfingozyna. Enzymem katalizującym tę reakcję jest wymagająca obecności fosforanu pirydoksalu i jonów Mn^{+2} palmitoilotransferaza serynowa (EC 2.3.1.50). Aktywność enzymu jest najwyższa względem palmitoilo-CoA, ale może on wykorzystywać także inne tioestry kwasów tłuszczowych. Według Merrilla [69] palmitoilotransferaza serynowa jest enzymem regulującym długość podstawowego łańcucha sfingozyny, jest więc pierwszym regulatorowym enzymem szlaku biosyntezy sfingolipidów. W następnym etapie, 3-ketodihydrosfingozyna ulega redukcji przy udziale reduktazy 3-ketosfingozynowej do dihydrosfingozyny, a ta z kolei przy udziale monooksygenazy związanej z flawoproteiną ulega oksydoredukcji do sfingozyny. Reakcja kondensacji sfingozyny z acylo-CoA [72] przy udziale acylotransferazy sfingozynowej (EC 2.3.1.24) prowadzi do wytworzenia ceramidu.

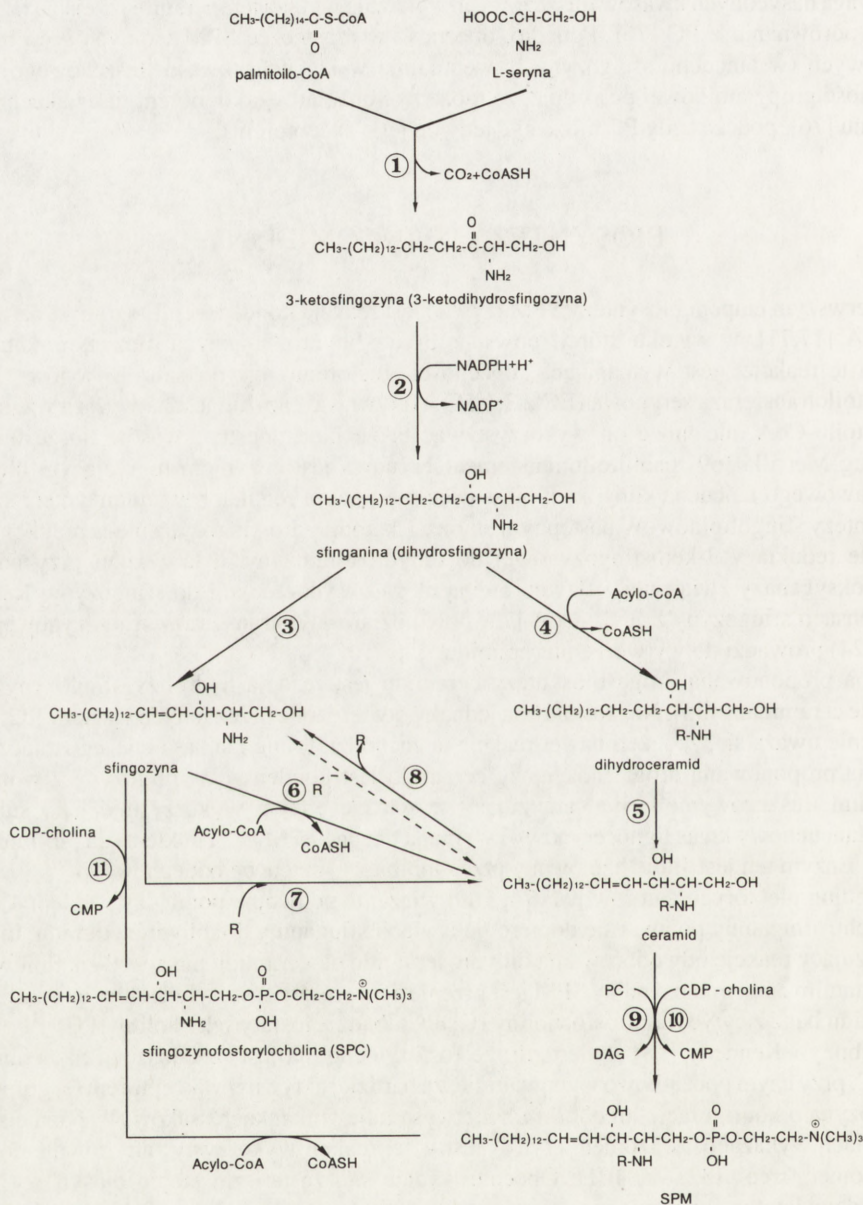
Inną proponowaną drogą biosyntezy ceramidu jest reakcja hydrolizy sfingozyny przy udziale ceramidazy [35]. Nie została ona jednak potwierdzona przez innych badaczy [72, 101] i obecnie uważa się, że jeżeli nawet reakcja ta zachodzi, to nie ma zasadniczego znaczenia. Trzecią proponowaną drogą biosyntezy ceramidu jest kondensacja sfingozyny z wolnymi kwasami tłuszczowymi [90]. Katalizujący tę reakcję enzym wykorzystuje jako substrat długołańcuchowy kwas lignocerynowy i wymaga obecności Mg^{+2} i nukleotydu pirymidynowego. Enzym ten jest silnie hamowany przez inhibitory łańcucha oddechowego.

Według niektórych autorów [71, 74, 100] wiązanie podwójne pomiędzy węglem 4 i 5 w łańcuchu sfinganiny pojawia się dopiero po acylacji sfinganiny do dihydroceramidu. Enzym katalizujący reakcję odwodorowania dihydroceramidu do ceramidu nie został zdefiniowany.

Ostatnim etapem biosyntezy SPM jest przeniesienie reszty fosforylocholinu na cząsteczkę ceramidu bądź z cytydynodifosfocholiny (CDPC), bądź z fosfatylocholinu (PC).

Sribney i Kennedy [98] stwierdzili, że fosforylocholina jest przenoszona na ceramid z CDPC, przy czym początkowo wydawało się, że bardziej aktywnym akceptorem tej grupy jest sfingozyna o konfiguracji "treo"¹, która nie występuje w tkankach ssaków. W późniejszych badaniach wykazano, że izomer "erytro" jest w tej reakcji wykorzystywany równie dobrze, jak izomer "treo" [32, 97, 101]. Obecnie wydaje się, że na tym etapie biosyntezy SPM najbardziej istotne znaczenie ma przeniesienie reszty fosforylocholinu z PC na ceramid przy udziale PC:ceramid transferazy fosforylocholinowej [61, 67, 104]. Synteza SPM z ceramidu

¹Sfingozyna występuje w postaci czterech izomerów optycznych różniących się położeniem podstawników przy węglu 2 i 3. Konfiguracja tych izomerów jest następująca: D-erytro-(2S, 3R), L-erytro-(2R,3S), D-treo-(2R,3R) i L-treo-(2S,3S). Izomery typu DL-erytro i DL-treo to mieszaniny racemiczne. W sfingomielinie tkanek zwierzęcych występuje forma D-erytro.



Rys. 2. Drogi biosyntezy SPM; numerami oznaczono enzymy szlaku biosyntezy: 1 – palmitoilo-transferaza L-seryny (EC 2.3.1.50), 2 – reduktaza 3-keto-sfingozynowa, 3 – monoooksygenaza związana z flawoproteiną (EC 1.14.14.1), 4 – syntaza ceramidowa, 5 – dehydrogenaza (oksydaza) dihydroceramidowa, 6 – acylotransferaza sfingozynowa (EC 2.3.1.24), 7 – enzym przyłączający kwas tłuszczowy niezależnie od ATP i CoA, 8 – ceramidaza, 9 – PC:ceramid transferaza fosforylocholinowa, 10 – CDP-cholina:ceramid transferaza fosforylocholinowa (EC 2.7.8.3), 11 – CDP-cholina:sfingozyna transferaza fosforylocholinowa (EC 2.7.8.10)

może zachodzić przy udziale fosfolipazy C, wykorzystującej endogenną PC jako źródło fosforylocholiny [48]. Wpływ ceramidu na syntezę SPM nie jest jednoznaczny. Marggraf i Kanfer [66] wykazali 9,5-krotną stymulację syntezy SPM po dodaniu ceramidu, podczas gdy np. Voelker i Kennedy [104] nie obserwowali żadnego efektu stymulującego. Na biosyntezę SPM istotny wpływ wywierają ester forbolowy (TPA) oraz hormon tyreotropowy, które poprzez receptory powierzchniowe aktywują kinazę białkową C, a ta z kolei aktywuje ostatni enzym szlaku, tj. PC:ceramid transferazę fosforylocholinową [51, 55]. Podobny efekt wywierają one na syntezę PC [54]. Opisano również stymulację syntezy SPM przez hormony kortykosterydowe [73], ale wydaje się, że mechanizm ich działania jest odmienny. Hormony te pozostają bez wpływu na syntezę PC, a wzmożonej syntezy SPM towarzyszy wzmożona jej degradacja. Końcowym efektem działania hormonów kortykosterydowych jest więc podwyższenie poziomu wolnej sfingozyny w komórce.

Alternatywną drogę biosyntezy SPM zaproponowali Brady i wsp. [15] oraz Fujino i wsp. [32]. Według nich sfingozyna ulega kondensacji z CDPC z wytworzeniem sfingozynofosforylocholiny (SPC), a następnie zachodzi acylacja grupy aminowej przez długołańcuchowy kwas tłuszczowy (rys.2).

Biosynteza SPM zachodzi w błonach plazmatycznych [66, 67, 104]. Mitochondria i mikrosony nie są zdolne do jej syntezy. W tkance płucnej wg badań Lecerfa i wsp. [61] najwyższą aktywność biosyntezy SPM obserwowano w ciałkach lamelarnych i frakcji błon plazmatycznych, natomiast niewielką we frakcjach gładkiego retikulum endoplazmatycznego i w otrzymanej z płukania pęcherzyków płucnych frakcji bogatej w surfaktant. Wielu autorów wskazuje na aparat Gołgiego jako główne miejsce biosyntezy SPM [58]. W tkance wątrobowej wykazano, że jest to wewnętrzna błona pęcherzyków *cis* i *medial* [33].

DEGRADACJA SPM

SPM jest enzymatycznie degradowana przez sfingomielinazę do ceramidu i fosforylocholiny. Dalsza degradacja polega na hydrolizie ceramidu do sfingozyny i kwasu tłuszczowego [35] za pośrednictwem ceramidazy.

W tkankach zwierzęcych, w tym ludzkich, występują dwa rodzaje sfingomielinazy: kwaśna i obojętna. Sfungomielinazy są enzymami związanymi z błonami, ale opisano również rozpuszczalne formy tego enzymu [80, 106]. Sfungomielinaza kwaśna jest enzymem lizosomalnym [30], aczkolwiek obecność jej stwierdzono również w innych frakcjach subkomórkowych [86]. Wykazuje ona najwyższą aktywność w pH 4,0–4,5 [78] lub 5,3–5,5 [79]. Nie wymaga ona kationów ani innych kofaktorów. Jony dwuwartościowe (Ca^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2}) nie mają wpływu na jej aktywność [81, 109]. Hamująco natomiast wpływają niektóre nukleotydy np. AMP [31, 80, 81] oraz fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan [80]. Enzym oprócz SPM może hydrolizować także inne fosfolipidy [31, 80]. Sfungomielinaza obojętna wykazuje optymalną aktywność w pH 7,4 i wymaga obecności jonów Mg^{+2} lub Mn^{+2} jako aktywatora. Aktywność tego enzymu jest najwyższa w mózgu, gdzie występuje głównie w obszarach bogatych w neurony [34, 41, 81, 94]. W badaniach na komórkach neuroblastoma wykazano, że enzym ten jest zlokalizowany przede wszystkim w błonie plazmatycznej i w mniejszych ilościach w endoplazmatycznym retikulum [96]. Das i wsp. [27] porównując wrażliwość sfingomielinazy kwaśnej, obojętnej i innych enzymów na działanie proteaz udowodnili, że

sfingomielinaza kwaśna znajduje się bez wątpienia wewnątrz komórki, natomiast sfingomielinaza obojętna znajduje się po zewnętrznej stronie błony plazmatycznej. Ponieważ SPM występuje również głównie w zewnętrznym listku dwuwarstwy lipidowej błony plazmatycznej [75], sądzi się [27], że sfingomielinaza obojętna odgrywa specyficzną rolę i może mieć istotne znaczenie w regulacji przekazywania informacji przez błonę. Ceramid powstały w wyniku działania enzymu jest bowiem prekursorem sfingozyny, a ta z kolei jest silnym regulatorem kinazy białkowej C [40,71].

Oprócz tych dwu podstawowych rodzajów sfingomielinaz wykazano również istnienie w mielinie sfingomielinazy obojętnej niezależnej od jonów Mg^{+2} [108] oraz występującej w surowicy płodowej, nowej formy sfingomielinazy zależnej od jonów Zn^{+2} [95]. Ten ostatni enzym wykazuje najwyższą aktywność w pH 5,5. Jego rola biologiczna nie została jeszcze poznana, ale jest niewykluczone, że bierze on udział w hydrolizie SPM znajdującej się w lipoproteinach surowicy krwi oraz w błonie plazmatycznej krwinek i komórek śródbłona naczyń krwionośnych. Spence i wsp. [95] sugerują, że niska aktywność sfingomielinazy zależnej od jonów Zn^{+2} w surowicy dorosłego człowieka może mieć wpływ na postępującą z wiekiem akumulację SPM w ścianie naczyń krwionośnych i w płytkach miażdżycowych.

Prawidłowa degradacja SPM przy udziale sfingomielinaz ma więc istotne znaczenie ze względów zdrowotnych. Typowym przykładem zaburzeń degradacji tego lipidu, wynikających z niedoboru sfingomielinazy kwaśnej, jest choroba Niemanna-Picka (N-P) [16, 86].

Choroba N-P należy do grupy chorób genetycznych i przebiega z nagromadzeniem się SPM w lizosomach niektórych tkanek. Wyróżniono pięć typów tej choroby [26]:

- Typ A przebiega z masywnym nagromadzeniem SPM w wątrobie, śledzionie i mózgu oraz z ciężkim upośledzeniem umysłowym. Choroba jest śmiertelna we wczesnym okresie życia.

- Typ B przebiega również z nagromadzeniem dużych ilości SPM w wątrobie i śledzionie, ale nie w mózgu. Objawy neurologiczne, jeżeli są, to niewielkie.

- Typy C, D i E charakteryzują się niewielkim nagromadzeniem SPM w narządach trzewnych. W typie C i D pojawiają się objawy neurologiczne pod koniec pierwszej dekady życia, podczas gdy w typie E nie obserwuje się żadnych klinicznych objawów.

W typie A i B zaobserwowano obniżenie aktywności sfingomielinazy lizosomalnej (0–5% prawidłowej aktywności) [16, 59, 62, 71, 86] i fosfolipazy C. Jednocześnie wykazano, że aktywność sfingomielinazy obojętnej zależnej od jonów Mg^{+2} nie odbiega od normy [34]. Zaobserwowano ponadto, że zaburzenie w aktywności sfingomielinazy lizosomalnej nie ma wpływu na wychwytywanie SPM przez komórki [18, 59, 62]. Większość SPM jest wychwytywana za pośrednictwem receptora dla LDL znajdującego się na powierzchni komórki i dostarczana potem do lizosomów [36, 59].

W typach C–E, aktywność sfingomielinazy kwaśnej jest prawidłowa [18] lub nieznacznie obniżona (typ C) [68]. Niektórzy autorzy na podstawie wyników ogniskowania izoelektrycznego sugerują, że w przypadku tych typów choroby brakuje niektórych izoenzymów sfingomielinazy lizosomalnej [7]. Sugeruje się, że geny odpowiedzialne za występowanie choroby N-P typu A i C są zlokalizowane w oddzielnych chromosomach [8]. Według Christomanou [23] przyczyną występowania typu C choroby N-P jest niedobór aktywatorów stymulujących degradację SPM i glukocerebrozydu.

LOKALIZACJA SPM W TKANKACH I BŁONACH SUBKOMÓRKOWYCH

SPM jako składnik błon komórkowych występuje we wszystkich tkankach. Błony izolowane z różnych narządów jednego gatunku ssaków różnią się zawartością SPM oraz stosunkiem molarnym SPM/PC, natomiast błony izolowane z tych samych narządów różnych gatunków ssaków wykazują podobny stosunek SPM/PC. Wyjątek stanowią błony erytrocytów, w których stosunek SPM/PC jest charakterystyczny dla gatunku (ssaków) i wynosi od 0,25 u szczura do ok. 12 u przeżuwaczy. W obrębie struktur mózgu i oka występują znaczne różnice. Obszary mózgu bogate w lipidy wykazują wyższy stosunek SPM/PC niż obszary ubogie w lipidy, natomiast w oku we wszystkich tkankach twardych, tj. naczyniówce, rogówce, tęczęwce, twardówce i ciała szklistym, obserwuje się wysoką zawartość SPM, podczas gdy w tkankach miękkich, tj. siatkówce i neuronach, SPM stanowi zaledwie ok. 5% wszystkich fosfolipidów [1].

W komórce SPM jest zlokalizowana przede wszystkim w błonie plazmatycznej [75,104], natomiast w mniejszych ilościach w błonach retikulum endoplazmatycznego, aparatu Golgiego i mikrosomów. Błony jądrowa i mitochondrialna charakteryzują się najniższą zawartością SPM. Procentowy skład lipidów w błonach subkomórkowych jest różny dla różnych narządów, np. w mitochondriach nerki, serca i wątroby wołu SPM stanowi odpowiednio 4, 2 i 1% wszystkich fosfolipidów, natomiast w mikrosomach tych samych narządów 20, 13 i 1–5% [83]. Znaczny wzrost zawartości SPM obserwuje się w mikrosomach (o ok. 77%) i w mitochondriach (o ok. 290%) izolowanych z komórek wątrobiaka *Morrisa 7777* w porównaniu z komórkami wątroby [42]. Fakt ten tłumaczy się 3-krotnie wyższą aktywnością palmitoilotransferazy serynowej (katalizującej pierwszy etap biosyntezy ceramidu) w mikrosomach wątrobiaka *Morrisa 7777* niż w mikrosomach komórek gospodarza [107] oraz obecnością białka bardzo aktywnie transportującego SPM z błony plazmatycznej do struktur subkomórkowych [29], które nie występuje w komórkach dojrzałej wątroby.

W błonie plazmatycznej wszystkie lipidy, w tym także SPM, są rozmieszczone niesymetrycznie w płaszczyźnie poprzecznej. W badaniach na erytrocytach ludzkich i ssaków wykazano, że w zewnętrznej warstwie błony plazmatycznej znajduje się 80–85% całkowitej ilości SPM oraz ok. 75% PC, podczas gdy w warstwie cytoplazmatycznej jest obecna PE (80%) i PS (100%) [75, 111]. Asymetria ta nie ulega zmianie ani w chemicznie zmodyfikowanych erytrocytach [38], ani w erytrocytach sierpowatych [65]. Częsteczki SPM wchodzące w skład zewnętrznej warstwy błony zawierają kwasy tłuszczowe 20-węglowe i dłuższe, podczas gdy ok. 73% cząsteczek SPM w cytoplazmatycznej warstwie błony plazmatycznej zawiera kwasy tłuszczowe krótsze niż 20-węglowe. Całkowita ilość kwasów tłuszczowych nasyconych i nienasyconych w obydwu warstwach jest identyczna [10]. Ruch cząsteczek SPM w płaszczyźnie poprzecznej błony, jeżeli występuje, jest niezwykle powolny i w czasie 120 dni życia erytrocytu nie następują zauważalne zmiany w asymetrycznym rozmieszczeniu różnych rodzajów molekularnych SPM [10]. Przypuszczenia te zostały potwierdzone wynikami badań znakowanych spinowo analogów fosfolipidowych [110]. Wykazano, że w błonie plazmatycznej erytrocytów i cieni erytrocytów pozbawionych ATP, SPM nie jest transportowana z zewnętrznego do wewnętrznego listka dwuwarstwy.

Odmienne rozmieszczenie SPM zaobserwowano w błonie plazmatycznej komórek rąbka szczoteczki pochodzących ze środkowego i końcowego odcinka jelita cienkiego pstrąga

[77]. W błonie komórek pochodzących ze środkowego odcinka jelita 60% SPM znajduje się w warstwie zewnętrznej błony, natomiast w błonie komórek z końcowego odcinka jelita rozmieszczenie SPM jest prawie symetryczne między zewnętrzną a wewnętrzną warstwą. W komórkach rąbka szczoteczki zaobserwowano ponadto, podobnie jak w erytrocytach, różnice w rozmieszczeniu rodzajów molekularnych SPM między zewnętrzną i wewnętrzną warstwą błony. Istotne znaczenie dla organizacji dwuwarstwy lipidowej tych komórek wydaje się mieć fakt, że SPM o krótkim, 14-węglowym łańcuchu kwasu tłuszczowego znajduje się w przeważającej ilości w warstwie zewnętrznej. Obecnie trudno jest jednak ustalić zależność między asymetrycznym rozmieszczeniem rodzajów molekularnych SPM czy innych fosfolipidów a funkcją mikrokosmków jelitowych.

SPM jest obok PC istotnym składnikiem lipoprotein surowicy, zwłaszcza frakcji HDL i LDL [5]. We frakcji HDL SPM najsilniej wiąże się z apolipoproteiną A-II, podczas gdy PC z apolipoproteiną A-I [102]. Dla lipoprotein ludzkich stosunek PC/SPM mierzony we wszystkich frakcjach wynosi średnio 3:1. Egzogenna SPM inkubowana z ludzką surowicą jest spontanicznie przenoszona do frakcji HDL i LDL [5, 62] oraz z HDL do LDL [45]. SPM jest transportowana i wbudowywana do erytrocytów i struktur komórkowych komórek wątroby i śledziony bez uprzedniej hydrolizy [5, 93, 99]. Komórki mięśni gładkich aorty pobierają SPM i cholesterol jako produkty lipolizy VLDL i LDL zachodzącej pod wpływem lipazy lipoproteinowej [9]. Komórki śródbłonna aorty i innych tętnic wykazują wraz z wiekiem oraz postępem miażdżycy znaczne zmiany w proporcjach pomiędzy poszczególnymi klasami fosfolipidów. Znacznie wzrasta w ich błonach zawartość SPM i cholesterolu [9, 12], a także zwiększa się procent nasyconych kwasów tłuszczowych [13]. Prawdopodobnie komórki śródbłonna naczyń krwionośnych pełnią funkcję bariery przed nadmiernym dopływem cholesterolu do ściany naczyń [12].

Komórki mózgu pobierają głównie produkty hydrolizy SPM pochodzącej z lipoprotein surowicy. Włączenie cholin najprawdopodobniej w postaci fosforylocholiny wielokrotnie przewyższa włączenie kwasu tłuszczowego i jest szczególnie intensywne w okresie mielinizacji [4]. Fosforylocholina, zanim zostanie przetransportowana przez barierę krew-mózg, uwalniana jest z lipidów ją zawierających w naczyniach włosowatych mózgu przez sfingomielinazę bądź fosfolipazę C [22]. Zaskakującym jest fakt, że nieznaczna część lipoproteinowej SPM jest transportowana do mózgu w postaci niezmienionej [4]. Bentejac i wsp. [4] sugerują, że SPM jest dla mózgu jedynym źródłem długołańcuchowych, nasyconych kwasów tłuszczowych (niezbędnych szczególnie podczas procesu mielinizacji), zdolnym uzupełniać wewnątrzkomórkową pulę długołańcuchowych, nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Ostatnie badania transportu D-erytro i L-treo stereoisomerów – fluorescencyjnych analogów SPM [57] w fibroblastach jajnika chińskiego chomika wykazały, że egzogenna SPM (podawana w postaci małych, jednowarstwowych pęcherzyków) jest włączana w błonę plazmatyczną w temperaturze 7°C w niezmienionej postaci oraz że w temperaturze 37°C może być transportowana drogą endocytozy do wnętrza komórki. Podczas 10 min inkubacji w temperaturze 37°C pęcherzyki zbudowane ze znakowanej fluorescencyjnie SPM są transportowane do centralnej części komórki w okolicy jądra, gdzie są gromadzone w sąsiedztwie centriol. Dłuższa inkubacja powoduje powrót SPM do błony plazmatycznej. Połowiczny czas obrotu SPM nie ulegającej metabolizmowi wynosi w tych warunkach ok. 40 min. Transport obu analogów SPM nie jest specyficzny i zachodzi z jednakową wydajnością. W temperaturze 37°C część włączonej do błony plazmatycznej egzogennej SPM ulega hydrolizie, co jest zgodne z doniesieniami na temat obecności sfingomielinazy obojętnej w błonach plazmaty-

cznych komórek [27, 41]. Powstające w wyniku hydrolizy SPM analogi fluorescencyjne ceramidu ulegają spontanicznej dyfuzji przez błonę i są dalej transportowane do aparatu Golgiego, gdzie następuje resynteza SPM [58]. Transport zsintetyzowanej w komórce SPM do błony plazmatycznej odbywa się, podobnie jak egzogennej, za pośrednictwem pęcherzyków. Nie jest on spontaniczny, gdyż wymaga obecności ATP i cytosolu [53].

FIZYKO-CHEMICZNE WŁAŚCIWOŚCI SPM W BŁONACH BIOLOGICZNYCH I SZTUCZNYCH

SPM bierze udział w tworzeniu jedynie dwuwarstwowej struktury lipidowej błony. Ma ona zdolność usztywniania błony, w której skład wchodzi. Błona plazmatyczna wzbogacona w SPM (stosunek SPM/PC = 1,56) charakteryzuje się zwiększoną mikrolepkością. Jest to związane z możliwością powstawania wiązania wodorowego pomiędzy sąsiadującymi cząsteczkami SPM [11, 103]. Jak wykazały badania za pomocą techniki rezonansu paramagnetycznego, wytworzenie wiązania wodorowego powoduje znaczne ograniczenie ruchliwości główki polarnej lipidu [3]. SPM wprowadzona do błony zbudowanej z dipalmito-PC (DPPC) ogranicza również ruchliwość łańcuchów PC. Między cząsteczkami SPM i PC powstają bowiem podobne wiązania wodorowe, ponieważ PC ma grupy akceptorowe dla protonu pochodzącego z grupy donorowej SPM [103]. Według ostatnich badań wiązanie wodorowe między cząsteczkami SPM powstaje poprzez grupę fosforanową z jednej strony i grupę hydroksylową z drugiej. W układzie SPM-PC grupa fosforanowa PC służy jako akceptor protonu pochodzącego od grupy donorowej SPM, którą w tym przypadku jest grupa hydroksylowa reszty sfingozyny [19, 103]. Ponadto uważa się, że w cząsteczce SPM o konfiguracji D-erytro akceptorem wodoru w grupie fosforanowej jest najprawdopodobniej atom tlenu wchodzący w skład wiązania estrowego [19].

SPM bardzo silnie wiąże cholesterol i determinuje jego rozmieszczenie w błonach. W komórkach pozbawionych SPM (poprzez traktowanie ich sfingomielinazą) następuje szybkie wychodzenie cholesterolu z błony plazmatycznej do wewnątrzkomórkowej puli wolnego cholesterolu [91, 92]. Ponadto, w komórkach pozbawionych SPM obserwuje się zwiększoną estryfikację błonowego cholesterolu, wzmożoną aktywność acylotransferazy cholesterolowej (ACAT), obniżoną syntezę cholesterolu "de novo", a także zredukowaną zdolność błony do wbudowywania egzogenego cholesterolu [91]. Spośród różnych rodzajów molekularnych SPM silniej wiążą cholesterol pochodne zawierające nasycony kwas tłuszczowy [99].

Cząsteczka SPM z mózgu wołu zajmuje powierzchnię ograniczoną do $42-45 \text{ \AA}^2$, podobnie jak dipalmito-PC - 43 \AA^2 [1]. Dla porównania przeciętna cząsteczka PC z żółtka jaja kurzego (są różne rodzaje molekularne) zajmuje przestrzeń 56 \AA^2 . Badania na monomolekularnych błonach wykazały, że znaczący wpływ na przestrzeń, zajmowaną przez cząsteczkę SPM w błonie, ma obecność podwójnego wiązania "cis" między 15 a 16 węglem łańcucha kwasu tłuszczowego. Wiązanie nienasycone "trans" między węglem 4 i 5 w łańcuchu kwasu tłuszczowego pozostaje bez wpływu na ten parametr [87]. Przestrzeń powierzchniowa przypadająca na cząsteczkę oraz przestrzeń międzywarstwowa zależą również od stopnia uwodnienia dwuwarstwy i wzrastają systematycznie wraz ze wzrostem stopnia uwodnienia. Przy maksymalnym 40-procentowym uwodnieniu błony zbudowanej ze SPM z mózgu wołu, które zachodzi w temp. 40°C , przestrzeń cząsteczkowa SPM wynosi aż 54 \AA^2 [3], a grubość

lipidowej dwuwarstwy oraz fazy wodnej wynoszą odpowiednio 48 i 30 Å. Inni autorzy podają nieco odmienne wartości. Według Shipleya i wsp. [89] maksymalne wiązanie wody przez błonę zbudowaną ze SPM zachodzi w temp. 47°C i wynosi 35%. W warunkach maksymalnego uwodnienia przestrzeń przypadająca na cząsteczkę wynosi 60 Å², grubość dwuwarstwy lipidowej 38 Å, a grubość warstwy wodnej pomiędzy listkami błony 22 Å. Rozbieżności te wynikają z różnic w składzie kwasów tłuszczowych badanej SPM oraz w sposobach pomiaru temperatury. Frakcje SPM o wysokiej zawartości kwasu stearynowego lub palmitynowego charakteryzują się stosunkowo wysoką temperaturą przejścia fazowego (T_m ok. 50°C), podczas gdy dla frakcji SPM bogatych w kwas nerwonowy (C24:1) temperatura przejścia fazowego wynosi ok. 30°C. Nie zaobserwowano różnic w zachowaniu termotropowym pomiędzy SPM o konfiguracji D-erytro a mieszaniną racemiczną D-erytro- i L-erytro-SPM [2, 20]. Na zależne od temperatury zachowanie SPM ma także wpływ stopień uwodnienia błony [89]. Zwiększenie uwodnienia błony do ok. 10% powoduje postępujące obniżanie T_m ze stanu żelu do stanu ciekłokrystalicznego z 87°C do 40°C. Uwodnienie dwuwarstwy zbudowanej z SPM powyżej 10% nie powoduje dalszego obniżania temperatury przejścia fazowego lipidu. T_m ze stanu żelu do stanu ciekłokrystalicznego większości rodzajów molekularnych SPM jest zbliżona do temperatury fizjologicznej ssaków, podczas gdy większość naturalnie występujących rodzajów molekularnych PC ma T_m znacznie niższą niż 37°C. Przeprowadzenie nieuwodnionej SPM ze stanu ciekłokrystalicznego do stanu jednorodnego można uzyskać przez podwyższenie temperatury do 144°C. W temperaturze 170°C SPM jest w stanie utworzyć strukturę heksagonalną. Wraz ze zmianą temperatury zasadniczej zmianie ulega mikrolepkość hydrofobowej części dwuwarstwy. I tak, poniżej T_m mikrolepkość błon, zbudowanych ze SPM z mózgu wołu, jest ok. 10-krotnie wyższa niż błon zbudowanych z PC z żółtka jaja kurzego, podczas gdy powyżej T_m różnica w mikrolepkości między tymi błonami jest tylko 3-krotna [2, 3, 88]. Barenholz i wsp. [2] badając zależne od temperatury zachowanie wielowarstwowych liposomów zbudowanych z mieszaniny N-palmitoilo-, N-stearoilo- i N-lignoceroilo-SPM (1:1:1) stwierdzili, że mieszanina ta ma jedną temperaturę przejścia fazowego niższą od T_m charakterystycznych dla poszczególnych składników. Nie zachodzi więc zjawisko rozdzielania faz w takiej mieszaninie. Zupełnie inaczej zachowywały się liposomy zbudowane z mieszaniny N-stearoilo-SPM i 1-palmitoilo-2-oleilo-PC. W liposomach, w których stosunek SPM do PC wynosił 2:1, obserwowano dwie temperatury przejścia fazowego charakterystyczne dla tych lipidów, natomiast w przypadku gdy stosunek SPM:PC wynosił 1:1, T_m była sumarycznym efektem T_m poszczególnych składników. Barenholz i wsp. sugerują, że zachodzące z wiekiem lub w przebiegu choroby miażdżycowej zmiany w składzie naturalnych błon biologicznych zaburzają w znacznym stopniu równowagę fazową i mają ogromny wpływ na funkcjonowanie błon biologicznych [2].

Ze względu na fakt, że błony zbudowane ze SPM są bardziej uporządkowane, charakteryzują się one znacznie bardziej ograniczoną przepuszczalnością jonów w porównaniu do innych błon. Transport fosforanów i chlorków przez błonę erytrocytów pochodzących od różnych gatunków ssaków (różniących się zawartością SPM) ulega stopniowemu hamowaniu wraz ze wzrostem stosunku SPM/PC [37,64]. Wraz ze wzrostem zawartości SPM w błonie prawie całkowicie zanika funkcja białka odpowiedzialnego za transport siarczanów [52]. Przypuszczano, że efekt hamowania transportu anionów przez błonę jest spowodowany wysokim stopniem nasycenia łańcuchów kwasów tłuszczowych w cząsteczce SPM, ale okazało się, że w błonach plazmatycznych o wysokiej zawartości kwasów tłuszczowych nienasyconych w cząsteczce SPM transport anionów jest również hamowany. Wzajemna

korelacja między zawartością SPM w błonie a transportem anionów nadal pozostaje niewyjaśniona, tym bardziej że według ostatnich doniesień białko transportujące siarczany (pasma 3) działa tak samo dobrze w liposomach zbudowanych ze SPM, jak i z PC z żółtka jaja. Ponadto transport w takich liposomach jest 6-krotnie wyższy niż obserwowany w naturalnych błonach ludzkich erytrocytów [84]. Prawdopodobnie w błonach wzbogaconych w SPM hamowaniu ulega jedynie bierny transport anionów.

Również aktywny transport jonów K^+ w erytrocytach maleje ze wzrostem stosunku SPM/PC [50]. Sugeruje się, że na procesy aktywnego transportu jonów Na^+ i K^+ przez błony wpływa nie sama SPM, ale jej kompleks z cholesterolem [47]. Według badań Slottego i wsp. [92] w komórkach traktowanych sfingomielinazą, na skutek degradacji SPM i wywołanej tym translokacji cholesterolu, następuje całkowite zahamowanie aktywności Na^+/K^+ -ATP-azy. Nie jest jednak wykluczony w tym przypadku wpływ sfingozyny jako potencjalnego inhibitora tego enzymu. Po odbudowie SPM przez komórkę aktywność Na^+/K^+ -ATP-azy wraca do normy.

Obecność SPM w błonie okazuje się mieć także istotny wpływ na jej właściwości mechaniczne m.in. na odporność błony na szok osmotyczny. W warunkach izosmotycznych erytrocyty o wysokiej zawartości SPM wykazują wyższą odporność, co jest związane z ich zwiększoną mikrolepkością [14]. Natomiast odporność tych erytrocytów jest mniejsza w warunkach zmniejszonego lub zwiększonego ciśnienia osmotycznego [28]. Ta właściwość błon erytrocytów bogatych w SPM wynika z faktu, że integralność ich błony plazmatycznej w warunkach izosmotycznych jest zachowana nawet w sytuacji, gdy 80% SPM ulegnie hydrolizie pod wpływem sfingomielinazy [24, 111]. Komórka, w której na miejscu SPM znajduje się ceramid, ulega łatwo hydrolizie w warunkach zmienionego ciśnienia osmotycznego [82, 111]. Ponadto, przekształcenie SPM w ceramid powoduje, że błonowa PC jest bardziej podatna na działanie fosfolipazy C z *Bacillus cereus* [111]. W efekcie, skojarzone działanie sfingomielinazy i fosfolipazy C prowadzi do lizy komórki nawet w warunkach izosmotycznych.

PODSUMOWANIE

Początkowo SPM ze względu na występowanie oraz budowę cząsteczki przypisywano przede wszystkim funkcję strukturalną. Wyniki badań ostatnich lat sugerują, że SPM podobnie jak PI i PC stanowi istotny element komórkowego przekazywania sygnałowego. Sugeruje się, że produkty degradacji SPM, tj. sfingozyna i ceramid, które są spontanicznie transportowane przez błonę, pełnią rolę wtórnych przekaźników przenoszących informację z receptora [39, 56, 70]. Wiadomo bowiem, że czynniki indukujące różnicowanie komórek, tj. witamina D_3 , TNF- α (nowotworowy czynnik nekrotyczny), interferon i hormony kortykosterydowe stymulują aktywność sfingomielinazy [49, 73], a co za tym idzie powstawanie ceramidu i sfingozyny. Przeniesienie sygnału za pośrednictwem ceramidu i sfingozyny odbywa się różnymi drogami. Wydaje się, że w przypadku interakcji TNF- α z jego receptorem sygnał przenoszony jest przez ceramid na kinazę białkową zależną od ceramidu [49]. Pośrednictwo "cyklu sfingomielinowego" w indukowaniu odpowiedzi komórek na hormony kortykosterydowe odbywa się z kolei poprzez sfingozynę, która, jak już wspomniano wyżej, jest inhibitorem kinazy białkowej C [40, 71]. Wpływ sfingozyny na ten enzym wydaje się mieć istotne znaczenie, ponieważ

kinaza białkowa C jest receptorem estrów forbolu i innych czynników onkogennych [39]. Sfingozyna hamuje kompetytywnie wiązanie estrów forbolu do N-końcowego wiążącego PS, fragmentu kinazy białkowej C. Ponadto, poprzez zahamowanie aktywności fosfatazy kwasu fosfatydowego i jednoczesną aktywację kinazy diacyloglicerolowej, zmniejsza pulę diacyloglicerolu będącego pozytywnym efektem kinazy białkowej C [60]. W efekcie kinaza białkowa C nie jest zdolna ani do autofosforylacji, ani do fosforylacji innych białek, a co za tym idzie zahamowaniu ulegają m.in. procesy różnicowania i wzrostu komórek, funkcje komórek neutrofilnych i agregacja płytek krwi [39,70]. Niektóre efekty działania sfingozyny, takie jak: hamowanie wiązania hormonu tyreotropowego do komórek GH₃, hamowanie aktywności Na⁺/K⁺-ATP-azy i szeregu enzymów zależnych od kalmoduliny oraz aktywacja kinazy tyrozynowej receptora EGF (*epidermal growth factor*) są niezależne od kinazy białkowej C [39,46,70]. Obecnie uważa się także, że N,N-dimetylowe pochodne sfingozyny wywołują podobne, ale znacznie silniejsze efekty niż sama sfingozyna [44]. Znaczną aktywność enzymu metylującego sfingozynę znaleziono w tkance mózgowej [43]. Należy jednak pamiętać, że sfingozyna w stężeniach niewiele wyższych niż potrzebne do zahamowania aktywności kinazy białkowej C jest cytotoksyczna, a proces metylacji może ten efekt potęgować [39]. Tym niemniej wydaje się, że sfingozyna ze względu na swoje właściwości oraz analogię strukturalną i funkcjonalną z lekami z grupy kationów amfifilowych reprezentuje endogenny czynnik antyarytmiczny, antydepresyjny, neuroleptyczny i przeciwnowotworowy [39, 63].

LITERATURA

- [1] BARENHOLZ Y, GATT S. Sphingomyelin: metabolism, chemical synthesis and physical properties. [w] *New Comprehensive Biochemistry* (Neuberger A, Van Deenen LLM. eds.) Vol. 4, Phospholipids (Hawthorne JN, Ansell GB. eds.), Elsevier, Amsterdam. pp. 129–177, 1982.
- [2] BARENHOLZ Y, SUURKUUSK J, MOUNTCASTLE D, THOMPSON TE, BILTONEN RL. A calorimetric study of the thermotropic behaviour of aqueous dispersions of natural and synthetic sphingomyelins. *Biochemistry* 1976; **15**: 2441–2447.
- [3] BARENHOLZ Y, THOMPSON TE. Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 1980; **604**: 129–158.
- [4] BENTEJAC M, BUGAUT M, DELACHAMBRE MC, LECERF J. Utilization of high-density lipoprotein sphingomyelin by the developing and mature brain in the rat. *J Neurochem* 1989; **52**: 1495–1500.
- [5] BENTEJAC M, LECERF J, BUGAUT M, DELACHAMBRE C. Turnover and uptake of double-labelled high-density lipoprotein sphingomyelin in the adult rat. *Biochim Biophys Acta* 1988; **959**: 349–360.
- [6] BERNERT JT jr, ULLMAN MD. Biosynthesis of sphingomyelin from erythro-ceramides and phosphatidylcholine by a microsomal cholinephosphotransferase. *Biochim Biophys Acta* 1981; **666**: 99–109.
- [7] BESLEY GTN. Sphingomyelinase defect in Niemann-Pick disease, type C, fibroblasts. *FEBS Lett* 1977; **80**: 71–74.
- [8] BESLEY GTN, HOOGEBOOM AJM, HOOGEVEEN A, KLEIJER WJ, GALJAARD H. Somatic cell hybridisation studies showing different gene mutations in Niemann-Pick variants. *Hum Genet* 1980; **54**: 409–412.
- [9] BIERMAN EL, ALBERS JJ. Lipoprotein uptake by cultured human arterial smooth muscles cells. *Biochim Biophys Acta* 1975; **388**: 198–202.
- [10] BOEGHEIM JPJ jr, van LINDE M, OP den KAMP JAF, ROELOFSEN B. The sphingomyelin pools in the outer and inner layer of the human erythrocyte membrane are composed of different molecular species. *Biochim Biophys Acta* 1983; **735**: 438–442.
- [11] BOGGS JM. Intermolecular hydrogen bonding between lipids: influence on organization and function of lipids in membranes. *Can J Biochem* 1980; **58**: 755–770.
- [12] BONDJERS G, BJÖRKERUD S. Cholesterol accumulation and content in regions with defined endothelial integrity in the normal rabbit aorta. *Atherosclerosis* 1973; **17**: 71–83.

- [13] BOTTCHER CJF, van GENT J. Changes in the composition of phospholipids and phospholipid fatty acids associated with atherosclerosis in the human aortic wall. *J Atheroscler Res* 1961; **1**: 36–46.
- [14] BOROCHOV H, ZAHLER P, WILBRANDT W, SHINITZKY M. The effect of phosphatidylcholine to sphingomyelin mole ratio on the dynamic properties of sheep erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 1977; **470**: 382–388.
- [15] BRADY RO, BRADLEY RM, YOUNG OM, KALLER H. An alternative pathway for the enzymatic synthesis of sphingomyelin. *J Biol Chem* 1965; **240**: PC 3693–PC 3694.
- [16] BRADY RO, KANFER JN, MOCK MB, FREDRICKSON DS. The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966; **55**: 366–369.
- [17] BRADY RO, KOVAL GJ. The enzymatic synthesis of sphingosine. *J Biol Chem* 1958; **233**: 26–31.
- [18] BRAUDET AL, MANSCHRECK AA. Metabolism of sphingomyelin by intact cultured fibroblasts: differentiation of Niemann-Pick disease types A and B. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; **105**: 14–19.
- [19] BRUZIK KS. Conformation of the polar headgroup of sphingomyelin and its analogues. *Biochim Biophys Acta* 1988; **939**: 315–326.
- [20] CALHOUN WI, SHIPLEY GG. Sphingomyelin-lecithin bilayers and their interaction with cholesterol. *Biochemistry* 1979; **18**: 1717–1722.
- [21] CALLAHAN JW, KHALIL M. Sphingomyelinases in human tissues. III. Expression of Niemann-Pick diseases in cultured skin fibroblasts. *Pediat Res* 1975; **9**: 914–918.
- [22] CARRE JB, MORAND O, HOMOYOUN P, ROUX F, BAUMANN N, BOURRE JM. Occurrence of sphingomyelinase activity at pH 7.4 and pH 5.0 in purified rat brain capillaries. *J Neurochem* 1985; **44** (Suppl.): S46B.
- [23] CHRISTOMANOU N. Niemann-Pick disease, Type C: evidence for the deficiency of an activating factor stimulating sphingomyelin and glucocerebroside degradation. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* 1980; **361**: 1489–1502.
- [24] COLLEY CM, ZWAAL RFA, ROELOFSEN B, van DEENEN LLM. Lytic and non-lytic degradation of phospholipids in mammalian erythrocytes by pure phospholipases. *Biochim Biophys Acta* 1973; **307**: 74–82.
- [25] COOPER RA, DUROCHER JR, LESLIE MH. Decreased fluidity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1977; **60**: 115–121.
- [26] CROCKER AC. The cerebral defect in Tay-Sachs disease and Niemann-Pick disease. *J Neurochem* 1961; **7**: 69–80.
- [27] DAS DVM, COOK HW, SPENCE MW. Evidence that neutral sphingomyelinase of cultured murine neuroblastoma cells is oriented externally on the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1984; **777**: 339–342.
- [28] DEUTICKE B. Properties and structural basis of simple diffusion pathways in the erythrocyte membrane. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1977; **78**: 1–97.
- [29] DYATLOVITSKAYA EV, TIMOFEEVA NG, YAKIMEMKO EF, BARSUKOV LI, MUZYA GI, BERGELSON LD. A sphingomyelin transfer protein in rat tumors and fetal liver. *Eur J Biochem* 1982; **123**: 311–315.
- [30] FOWLER S. Lysosomal localization of sphingomyelinase in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1969; **191**: 481–484.
- [31] FREEMAN SJ, SHANKARAN P, WOLFE SL, CALLAHAN JW. Phosphatidylcholine and 4-methylumbelliferyl phosphorylcholine hydrolysis by purified placental sphingomyelinase. *Can J Biochem Cell Biol* 1985; **63**: 272–277.
- [32] FUJINO Y, NAKANO M, NEGISHI T, ITO S. Substrate specificity for ceramide in the enzymatic formation of sphingomyelin. *J Biol Chem* 1968; **243**: 4650–4651.
- [33] FUTERMAN AH, STIEGER B, HUBBARD AL, PAGANO RE. Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the *cis* and *medial* cisternae of the Golgi Apparatus. *J Biol Chem* 1990; **265**: 8650–8657.
- [34] GATT S, DINUR T, KOPOLOVIC J. Niemann-Pick disease: presence of the magnesium-dependent sphingomyelinase in brain of the infantile form of the disease. *J Neurochem* 1978; **31**: 547–550.
- [35] GATT S. Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. I. Hydrolysis and synthesis of ceramides by an enzyme from rat brain. *J Biol Chem* 1966; **241**: 3724–3730.
- [36] GOLDSTEIN JL, BROWN MS. The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1977; **46**: 897–930.
- [37] GRUBER W, DEUTICKE B. Comparative aspects of phosphate transfer across mammalian erythrocyte membranes. *J Membr Biol* 1973; **13**: 19–37.
- [38] HAEST CWM, PLASA G, KAMP D, DEUTICKE B. Spectrin as a stabilizer of the phospholipid asymmetry in the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 1978; **509**: 21–32.
- [39] HANNUN YA, BELL RM. Function of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science* 1989; **234**: 500–507.

- [40] HANNUN H, LOOMIS CR, MERRILL AH jr, BELL RM. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding *in vitro* and in human platelets. *J Biol Chem* 1986; **261**: 12604–12609.
- [41] HOSTETLER KY, YAZAKI PJ. The subcellular localization of neutral sphingomyelinase in rat liver. *J Lipid Res* 1979; **20**: 456–463.
- [42] HOSTETLER KY, ZENNER BD, MORRIS HP. Abnormal membrane phospholipid content in subcellular fractions from the Morris 7777 hepatoma. *Biochim Biophys Acta* 1988; **441**: 231–238.
- [43] IGARASHI Y, HAKOMORI S. Enzymatic synthesis of N,N-dimethyl-sphingosine: demonstration of the sphingosine: N-methyltransferase in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **164**: 1411–1416.
- [44] IGARASHI Y, KITAMURA K, TOYOKUNI T, DEAN B, FENDERSON B, OGAWA T, HAKOMORI S. A specific enhancing effect of N,N-dimethylsphingosine on epidermal growth factor autophosphorylation. *J Biol Chem* 1990; **265**: 5385–5389.
- [45] ILLINGWORTH DR, PORTMAN OW. Exchange of phospholipids between low and high density lipoproteins of Squirrel monkeys. *J Lipid Res* 1972; **13**: 220–227.
- [46] JEFFERSON AB, SCHULMAN H. Sphingosine inhibits calmodulin-dependent enzymes. *J Biol Chem* 1988; **263**: 15241–15244.
- [47] JOINER CH, LAUF PK. Temperature dependence of active K⁺ transport in cation dimorphic sheep erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1979; **552**: 540–545.
- [48] KANFER JN, SPIELVOGEL CH. Phospholipase C catalyzed formation of sphingomyelin-¹⁴C from lecithin and N-(¹⁴C)-oleoyl-sphingosine. *Lipids* 1975; **10**: 391–394.
- [49] KIM M-Y, LINARDIC C, OBEID L, HANNUN Y. Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of Tumor Necrosis Factor α and Interferon. Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem* 1991; **266**: 484–489.
- [50] KIRK RG. Potassium transport and lipid composition in mammalian red blood cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1977; **464**: 157–164.
- [51] KISS Z, DELI E, KUO JF. Phorbol ester stimulation of sphingomyelin synthesis in human leukemic HL60 cells. *Arch Biochem Biophys* 1988; **265**: 38–42.
- [52] KÖHNE W, DEUTICKE B, HAEST CWM. Phospholipid dependence of the anion transport system of the human erythrocyte membrane. Studies on reconstituted band 3/lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1983; **730**: 139–150.
- [53] KOBAYASHI T, PIMPLIKAR SW, PARTON RG, BHAKDI S, SIMONS K. Sphingolipid transport from the trans-Golgi network to the apical surface in permeabilized MDCK cells. *FEBS Lett* 1992; **300**: 227–231.
- [54] KOLESNICK RN. Thyreotropin-releasing hormone and phorbol esters induce phosphatidylcholine synthesis in GH3 pituitary cells. Evidence for stimulation via protein kinase C. *J Biol Chem* 1987; **262**: 14525–14530.
- [55] KOLESNICK RN. Thyreotropin-releasing hormone and phorbol esters stimulate sphingomyelin synthesis in GH3 pituitary cells. *J Biol Chem* 1989; **264**: 11688–11692.
- [56] KOLESNICK R. Ceramide: a novel second messenger. *Trends in Cell Biol* 1992; **2**: 232–236.
- [57] KOVAL M, PAGANO RE. Lipid recycling between the plasma membrane and intracellular compartments: transport and metabolism of fluorescent sphingomyelin analogues in cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1989; **108**: 2169–2181.
- [58] KOVAL M, PAGANO RE. Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1082**: 113–125.
- [59] KUDOH T, VELKOFF MA, WENGER DA. Uptake and metabolism of radioactively labeled sphingomyelin in cultured skin fibroblasts from controls and patients with Niemann-Pick disease and other lysosomal storage diseases. *Biochim Biophys Acta* 1983; **754**: 82–92.
- [60] LAVIE Y, PITERMAN O, LISCOVITCH M. Inhibition of phosphatidic acid phosphohydrolase activity by sphingosine. Dual action of sphingosine in diacylglycerol signal termination. *FEBS Lett* 1990; **277**: 7–10.
- [61] LECERF J, FOUILLAND L, GAGNIARRE J. Evidence for a high activity of sphingomyelin biosynthesis by phosphocholine transfer from phosphatidylcholine to ceramides in lung lamellar bodies. *Biochim Biophys Acta* 1987; **918**: 48–59.
- [62] LEVADE T, GATT S. Uptake and intracellular degradation of fluorescent sphingomyelin by fibroblasts from normal individuals and a patient with Niemann-Pick disease. *Biochim Biophys Acta* 1987; **918**: 250–259.
- [63] LISCOVITCH M, LAVIE Y. Sphingoid bases as endogenous cationic amphiphilic "drugs". *Biochem Pharmacol* 1991; **42**: 2071–2075.
- [64] LU YB, CHOW EIH. Bicarbonate/chloride transport kinetics at 37°C and its relationship to membrane lipids in mammalian erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1982; **689**: 485–489.
- [65] LUBIN B, CHIU D, BASTACKY J, ROELOFSEN B, van DEENEN LLM. Abnormalities in membrane phospholipid organization in sickled erythrocytes. *J Clin Invest* 1981; **67**: 1643–1649.

- [66] MARGGRAF WD, KANFER JN. The phosphorylcholine acceptor in the phosphatidylcholine:ceramide cholinephospho-transferase reaction. Is the enzyme a transferase or hydrolase? *Biochim Biophys Acta* 1984; **793**: 346–353.
- [67] MARGGRAF WD, ZERTANI R, ANDERER FA, KANFER JN. The role of endogenous phosphatidylcholine and ceramide in the biosynthesis of sphingomyelin in mouse fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1982; **710**: 314–323.
- [68] MAZIERE JC, MAZIERE C, MORA L, ROUTIER JC, POLONOVSKI J. *In situ* degradation of sphingomyelin by cultured normal fibroblasts and fibroblasts from patients with Niemann-Pick disease type A and C. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; **108**: 1101–1106.
- [69] MERRILL AH jr. Characterization of serine palmitoyltransferase activity in chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* 1983; **754**: 284–291.
- [70] MERRILL AH jr. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. *J Bioenerg Biomembr* 1991; **23**: 83–104.
- [71] MERRILL AH jr, JONES DD. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1044**: 1–12.
- [72] MORELL P, RADIN NS. Specificity in ceramide biosynthesis from long chain bases and various fatty acyl coenzyme A's by brain microsomes. *J Biol Chem* 1970; **245**: 342–350.
- [73] NELSON DH, MURRAY DK, BRADY RO. Dexamethasone - induced changes in the sphingomyelin content of human polymorphonuclear leucocytes *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; **54**: 292–295.
- [74] ONG DE, BRADY RN. *In vivo* studies on the introduction of the 4-t-double bond of the sphingenine moiety of rat brain ceramides. *J Biol Chem* 1973; **248**: 3884–3888.
- [75] OP den KAMP JAF. Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem* 1979; **48**: 47–71.
- [76] PASCHER I. Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim Biophys Acta* 1976; **455**: 433–451.
- [77] PELLETIER X, FREYSZ L, LERAY C. Topological distribution of choline phospholipid fatty acids in trout intestinal brush-border membrane. *Biochim Biophys Acta* 1988; **942**: 125–130.
- [78] POULOS A, RANIERI E, SHANKARAN P, CALLAHAN JW. Studies on the activation of the enzymatic hydrolysis of sphingomyelin liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1984; **793**: 141–148.
- [79] POULOS A, SHANKARAN P, JONES CS, CALLAHAN JW. Enzymatic hydrolysis of sphingomyelin liposomes by normal tissues and tissues from patients with Niemann-Pick disease. *Biochim Biophys Acta* 1983; **751**: 428–431.
- [80] QUINTERN LE, WEITZ G, NEHRKORN H, TAGER JM, SCHRAM AW, SANDHOFF K. Acid sphingomyelinase from human urine: purification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1987; **922**: 323–336.
- [81] RAO BG, SPENCE MW. Sphingomyelinase activity at pH 7.4 in human brain and a comparison to activity at pH 5.0. *J Lipid Res* 1976; **17**: 506–615.
- [82] ROTHMAN JE, TSAI DK, DAWIDOWICZ EA, LENARD J. Transbilayer phospholipid asymmetry and its maintenance in the membrane of Influenza virus. *Biochemistry* 1976; **15**: 2361–2370.
- [83] ROUSER G, KRITCHEVSKY G, YAMAMOTO A. Lipids in nervous system of different species as a function of age: brain, spinal cord, peripheral nerve, purified whole cell preparation, and subcellular particulates: Regulatory mechanism and membrane structure. *Adv Lipid Res* 1972; **10**: 261–360.
- [84] SCHEURING U, HAASE W, SCHUBERT D. Does sphingomyelin inhibit the erythrocyte anion transport system? *FEBS Lett* 1988; **231**: 232–236.
- [85] SCHMIDT CF, BARENHOLZ Y, THOMPSON TE. A nuclear magnetic resonance study of sphingomyelin in bilayer system. *Biochemistry* 1977; **16**: 2649–2656.
- [86] SCHNEIDER PB, KENNEDY EP. Sphingomyelinase in normal human spleens and in spleens from subjects with Niemann-Pick disease. *J Lipid Res* 1967; **8**: 202–209.
- [87] SHAH DO, SCHULMAN JH. Interaction of calcium ions with lecithin and sphingomyelin monolayers. *Lipids* 1967; **2**: 21–27.
- [88] SHINITZKY M, BARENHOLZ Y. Dynamics of the hydrocarbon layer in liposomes of lecithin and sphingomyelin containing dicytlylphosphate. *J Biol Chem* 1974; **249**: 2652–2657.
- [89] SHIPLEY GG, AVECILLA LS, SMALL DM. Phase behavior and structure of aqueous dispersions of sphingomyelin. *J Lipid Res* 1974; **15**: 124–131.
- [90] SINGH I, KISHIMOTO Y. Ceramide synthesis in rat brain: characterization of the synthesis requiring pyridine nucleotide. *Archiv Biochim Biophys* 1980; **202**: 93–100.
- [91] SLOTTE JP, BIERMAN EL. Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts. *Biochem J* 1988; **250**: 653–658.

- [92] SLOTTE JP, HÄRMÄLÄ AS, JANSSON C, PÖRN I. Rapid turn-over of plasma membrane sphingomyelin and cholesterol in baby hamster kidney cells after exposure to sphingomyelinase. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1030**: 251–257.
- [93] SPANJER HH, van GALEN M, ROERDINK FH, REGTS J, SCHERPHOF GL. Intrahepatic distribution of small unilamellar liposomes as a function of liposomal lipid composition. *Biochim Biophys Acta* 1986; **863**: 224–230.
- [94] SPENCE MW, BURGESS JK, SPERKER ER. Neutral and acid sphingomyelinases: somatotropical distribution in human brain and distribution in rat organs. A possible relationship with the dopamine system. *Brain Res* 1979; **168**: 543–551.
- [95] SPENCE MW, BYERS DM, PALMER FBStC, COOK HW. A new Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum. *J Biol Chem* 1989; **264**: 5358–5363.
- [96] SPENCE MW, WAKKARY J, CLARKE JTR, COOK HW. Localization of neutral, magnesium-stimulated sphingomyelinase in plasma membrane of cultured neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1982; **719**: 162–164.
- [97] SRIBNEY M. Stimulation and inhibition of sphingomyelin synthetase. *Arch Biochem Biophys* 1968; **126**: 954–965.
- [98] SRIBNEY M, KENNEDY EP. The enzymatic synthesis of sphingomyelin. *J Biol Chem* 1958; **233**: 1315–1321.
- [99] STEIN O, OETTE K, HARATZ D, HALPERIN G, STEIN Y. Sphingomyelin liposomes with defined fatty acids: metabolism and effects on reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* 1988; **960**: 322–333.
- [100] STOFFEL W, BISTER K. Studies on the desaturation of sphinganine. Ceramide and sphingomyelin metabolism in the rat and in the BHK 21 cells in tissue culture. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1974; **355**: 911–923.
- [101] STOFFEL W, MELZNER I. Studies *in vitro* on the biosynthesis of ceramide and sphingomyelin. A reevaluation of proposed pathways. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1980; **361**: 755–771.
- [102] STOFFEL W, ZIERENBERG O, TUNGGAL BD, SCHREIBER E. ¹³C Nuclear magnetic resonance spectroscopic studies on lipid-protein interactions in human high-density lipoprotein (HDL). A model of the HDL particle. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1974; **355**: 1381–1390.
- [103] VILLALAIN J, ORTIZ A, GOMEZ-FERNANDEZ JC. Molecular interactions between sphingomyelin and phosphatidylcholine in phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1988; **941**: 55–62.
- [104] VOELKER DR, KENNEDY EP. Cellular and enzymic synthesis of sphingomyelin. *Biochemistry* 1982; **21**: 2753–2759.
- [105] WEINREB NJ, BRADY RO, TAPPEL AL. The lysosomal localization of sphingolipid hydrolases. *Biochim Biophys Acta* 1968; **159**: 141–146.
- [106] WEITZ G, LINDL T, HINRICHS U, SANDHOFF K. Release of sphingomyelin phosphodiesterase (acid sphingomyelinase) by ammonium chloride from CL 1D mouse L-cells and human fibroblasts. Partial purification and characterization of the exported enzymes. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1983; **364**: 863–871.
- [107] WILLIAMS RD, NIXON DW, MERRILL AH jr. Comparison of serine palmitoyltransferase in Morris hepatoma 7777 and rat liver. *Cancer Res* 1984; **44**: 1918–1923.
- [108] YAMAGUCHI S, SUZUKI K. A novel magnesium-independent neutral sphingomyelinase associated with rat central nervous system myelin. *J Biol Chem* 1978; **253**: 4090–4092.
- [109] YAMANAKA T, SUZUKI K. Acid sphingomyelinase of human brain: purification to homogeneity. *J Neurochem* 1982; **38**: 1753–1764.
- [110] ZACHOWSKI A, FELLMAN P, DEVAUX PF. Absence of transbilayer diffusion of spin-labeled sphingomyelin on human erythrocytes. Comparison with the diffusion of several spin-labeled glycerophospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1985; **815**: 510–514.
- [111] ZWAAL RFA, ROELOFSEN B, COMFURIUS P, van DEENEN LLM. Organization of phospholipids in human red cell membranes as detected by the action of various purified phospholipases. *Biochim Biophys Acta* 1975; **406**: 83–96.

Otrzymano: 12.06.1992 r.

Przyjęto: 08.10.1992 r.

Adres autorów: 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

TREŚĆ

No. 1

W tym Zeszytcie Postępów Biologii Komórki	1
HORST A. – Geny przeciwnowotworowe jako czynniki regulatorowe wzrostu i różnicowania komórek	3
BILIŃSKI S. – Powstawanie i depozycja matczynych czynników rozwojowych w oocytach bezkręgowców	23
KONONOWICZ H. – Somatyczna embriogeneza roślin in vitro. II. Charakterystyka cytologiczna i problem stabilności genetycznej	35
RUPNIEWSKA Z.M. i DMOSZYŃSKA A. – Antygen CD 5 i jego rola w stanie fizjologicznym i w patologii	45
RYDZYŃSKI K. – Heterogenność komórek tucznych: Fakt czy artefakt?	61
KOPEĆ-SZLEZAK J. – Rola komórek gwiaździstych w metabolizmie witaminy A	77
KLAG J. – Komórki linii płciowej – nośniki nieśmiertelności	87
TARNECKI R. i WERKA T. – Autorzy techniki <i>patch clamp</i> wyróżnieni nagrodą Nobla w medycynie	97
Z kroniki	103

No. 2

W tym Zeszytcie Postępów Biologii Komórki	105
ROGAŁSKA S. – Charakterystyka molekularna i cytogenetyczna heterochromatyny w chromosomach żyta (<i>Secale cereale</i> L.)	107
WITKOWSKI J. M. – Udział kationów w transdukcji sygnału w stymulowanych limfocytach. T. I. Kationy metali i zmiany potencjału błonowego	117
WITKOWSKI J. M. – Udział kationów w transdukcji sygnału w stymulowanych limfocytach. T.II. H ⁺ i zmiana pH cytoplazmy	139
GŁAŻEWSKI S. i DANYSZ W. – Receptory dla aminokwasów pobudzających w ośrodkowym układzie nerwowym i ich rola w procesach plastyczności oraz toksyczności dla komórek	145
KAPUSTA P. i KORDOWIAK A. M. – Rola biologiczna i wasności wybranych receptorów komórkowych ze szczególnym uwzględnieniem receptorów na powierzchni hepatocytów	163
KORDOWIAK A. M. i KAPUSTA P. – Prostaglandyny (PGs) jako przykład niepeptydowego ligandu wiązanego przez swoiste receptory na powierzchni komórki	179

No. 3

W tym Zeszycie Postępów Biologii Komórki	185
RATAJCZAK M. Z., LUGER S. M. i GERWITZ A. M. – Rola receptora c-kit i jego ligandu w regulacji procesów krwiotworzenia u człowieka	187
BILIŃSKA B. – Współczesne poglądy na interakcje międzykomórkowe w gonadzie męskiej ssaków	205
SZOŁTYŚ M. – Struktura i funkcja pęcherzyków jajnikowych ssaków	221
KAWIAK J. i SKIERSKI J. S. – Cytometria przepływową w badaniach komórek i niektóre jej zastosowania lekarskie	239
DOWJAT K. – Molekularne podstawy etapu promocji nowotworów. Badania na komórkowych modelach in vitro	255
SKIBIŃSKA A. i WITT M. – Molekularne podstawy mukowiscydozy	263

No. 4

W tym zeszycie Postępów Biologii Komórki	277
Z kroniki	278
JAKUBOWICZ M., AUGUSTYNIAK J.: Homologie między genomem jądrowym i genomami organellowymi roślin	279
BEDNARSKA E.: Interakcje międzykomórkowe podczas płciowego rozmnażania roślin kwiatowych	293
BARTSCH O., HÜBNER H., MORDALSKA A.: Powstawanie i znaczenie uniparentalnej disomii	311
FILIP A., ROŻYŃKOWA D.: Hybrydyzacja in situ – Rozwój nowej techniki badawczej dla przestrzennego uwidocznienia genów i transkryptów genowych	323
HORST A.: Przepływ substancji pomiędzy cytoplazmą a jądrem komórkowym	335
RUPNIEWSKA Z. M., ROLIŃSKI J., WĄSIK E.: Hipoteza o różnorodności komórek, z których może pochodzić przewlekła białaczka limfatyczna B-komórkowa	357
RAKOWSKA M., ZBOROWSKI J.: Sfingomielina – Metabolizm, rola i znaczenie w błonach biologicznych	369

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 wystąpienia do redakcji).

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

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie 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 nadbitki, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona 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 zamieszcza tabel, schematów lub rysunków, a 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 zwrotienia 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

W tym zeszycie Postępów Biologii Komórki . . .	277
Z kroniki	278
JAKUBOWICZ M., AUGUSTYNIAK J.: Homologie między genomem jądrowym i genomami organellowymi roślin	279
BEDNARSKA E.: Interakcje międzykomórkowe podczas płciowego rozmnażania roślin kwiatowych	293
BARTSCH O., HÜBNER H., MORDALSKA A.: Powstawanie i znaczenie uniparentalnej disomii	311
FILIP A., ROŻYNKOWA D.: Hybrydyzacja in situ – Rozwój nowej techniki badawczej dla przestrzennego uwidocznienia genów i transkryptów genowych	323
HORST A.: Przepływ substancji pomiędzy cytoplazmą a jądrem komórkowym	335
RUPNIEWSKA Z. M., ROLIŃSKI J., WĄSIK E.: Hipoteza o różnorodności komórek, z których może pochodzić przewlekła białaczka limfatyczna B-komórkowa	357
RAKOWSKA M., ZBOROWSKI J.: Sfingomielina – Metabolizm, rola i znaczenie w błonach biologicznych	369

**Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Prenumerata na rok 19923

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1993 na konto:
 FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;
 Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.
 Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty) dla instytucji (bibliotek) wynosi 190 000 zł, a dla odbiorców indywidualnych 40 000 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 501132-40006576-2701-3-1110.
Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705