

PL ISSN 0324-833X

P211
POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 23 NR-3'96
(317-502)

6.9.96

Postępy Biologii Komórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILINSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),
Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),
Maciej KAWALEC (biologia, immunologia i immunoterapia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),
Wincenty KILARSKI (mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),
Jan MICHEJDA (szlaki informacyjne, błony komórek, energetyka komórki – *Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),
Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),
Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chatubińskiego 6a*)

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, tel. 340 344, fax 340470.

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 14,0 Ark. druk. 11,75 Oddano do składu w maju 1996 r. Podpisano do druku w lipcu 1996 r. Druk ukończono w sierpniu 1996 r.

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- Niedawno odkryto hemopoetyczny czynnik wzrostowy trombopoetynę (opis na s. 319), której istnienie podejrzewano od dawna. Czynnik ten może mieć ważne znaczenie kliniczne, ponieważ doraźne uzupełnianie niedoborów krwinek płytkowych przez przetaczanie tzw. masy płytkowej wiąże się z możliwością alloimmunizacji, jak i narażeniem chorego na zakażenie patogenami przenoszonymi przez preparaty krwi. Odkrycie to wiąże się również z lepszym zrozumieniem mechanizmów regulujących megakariopoezę i odkryciem protoonkogenu *c-mpl* kodującego receptor trombopoetyny.
- Cystatyny są endogennymi inhibitorami peptydaz cysteinowych, takich jak: papaina, katepsyny B, H i L. W artykule na stronie 385 usystematyzowano informacje na temat właściwości fizykochemicznych, struktury pierwszorzędowej, właściwości inhibitorowych i roli fizjologicznej mało poznanych cystatyn pochodzenia roślinnego.
- Strukturę i funkcję systeminy, peptydu o charakterze hormonu roślinnego omówiono na stronie 477. Peptyd ten w wyniku ataku owadów, patogenów czy uszkodzenia rośliny jest syntetyzowany i uwalniany uodparniając roślinę.
- Niedawno opublikowane artykuły na temat apoptozy ukazały się w "Postępach Biologii Komórki" w 1995 i 1996 r. (22:247 i 23:299). W nawiązaniu do wcześniejszych własnych artykułów w "Postępach" (18:169, 1991; 21:303, 1994) prof. dr D. Rożynkowa omawia modele doświadczalnej indukcji apoptozy komórek (s. 421). Czynniki regulacyjne apoptozy są omówione na stronie 445.
- Elektroforeza pojedynczych komórek znana również pod angielską nazwą *comet assay* jest szybką i czułą techniką ilościowej analizy uszkodzeń DNA w pojedynczych komórkach. Możliwość wykorzystania metody do różnych celów czynią tę metodę użytecznym narzędziem w badaniach komórkowych procesów naprawczych genotoksyczności i innych. Informację o metodzie znajdzie Czytelnik na stronie 339. Omówienie zastosowania technik cytogenetycznych do monitorowania narażenia na czynniki mutagenne jest opisana na stronie 373.
- Białka wiążące GTP były w zeszłym roku omawiane w związku z nagrodą Nobla 1994 dla Alfreda Gilmana i Martina Rodbella (22:103, 1995) oraz wcześniej w tomie 21:479, 1994. W tym zeszycie znajdziemy na stronie 399 dalsze informacje z tego zakresu.
- Warto zajrzeć na stronę 457, gdzie opisano podstawy oraz zastosowania cytometrii obrazowej.

TROMBOPOETYNA – ODKRYCIE, WŁAŚCIWOŚCI I POTENCJALNE ZASTOSOWANIE KLINICZNE

THROMBOPOIETIN – CLONING, BIOLOGY AND POTENTIAL THERAPEUTIC APPLICATION

Wojciech MARLICZ

Zakład Patologii Komórki PAM w Szczecinie*

Streszczenie: W pracy przedstawiono obecny stan wiedzy dotyczący nowoodkrytego hemopoetycznego czynnika wzrostowego – trombopoetyny oraz jego swoistego receptora (c-mpl). Omówiono zarówno aspekty związane z odkryciem i sklonowaniem genów kodujących powyższy receptor i ligand, jak i przedstawiono budowę molekularną obydwu protein. Opisano również biologiczną funkcję osi trombopoetyna - c-mpl receptor w proliferacji komórek hemopoetycznych. Uwzględniono także, rolę, jaką pełnią powyższe białka w patologii oraz pokrótce przedstawiono perspektywy potencjalnego wykorzystania rekombinowanej trombopoetyny w klinice.

Słowa kluczowe: hematopoeza, megakariopoeza, trombopoetyna.

Summary: In this paper a novel member of the hematopoietin receptor family - c-mpl receptor and its cognate ligand – thrombopoietin are described. The aspects concerning isolation and cloning of genes encoding this ligand – receptor pair, molecular structure of its proteins and role of c-mpl - TPO axis in the regulation of the proliferation of hematopoietic cells as well as role in human pathology are reviewed. The potential therapeutic use of TPO is discussed.

Key words: haematopoiesis, megacaryocytopoiesis, thrombopoietin.

Wykaz skrótów stosowanych w pracy: **Arg** – arginina; **BaF3** – mysia limfocytarna linia komórkowa której wzrost zależy od obecności IL-3 w środowisku hodowlanym; **BFU-E** (ang. *Burst Forming Units of Erythrocytes*) – wczesna komórka układu czerwonokrwinkowego, tworząca *in vitro* 14 dnia hodowli duże kolonie erytroidalne; **BHK** (ang. *Baby Hamster Kidney Cells*) – linia komórkowa pochodząca z nerki płodowej chomika; **cDNA** – DNA komplementarny do mRNA, uzyskiwany w wyniku przepisania cząsteczek mRNA na komplementarne cząsteczki DNA; **CD33** – antygen występujący na

*Obecnie Pracownia Hematologii Molekularnej Zakładu Patologii Uniwersytetu Pensylwania, Filadelfia, USA, Kierownik Zakładu: prof. med. Alan M. Gewirtz.

powierzchni wczesnych komórek hemopoetycznych; **CD34** – antygen występujący na powierzchni wczesnych komórek hemopoetycznych; **CD 41a** – glikoproteina GpIIb występująca na powierzchni komórek układu megakariopoetycznego; **CD 61** – glikoproteina GpIIIa występująca na powierzchni komórek układu megakariopoetycznego; **CFU-GM** (ang. *Colony Forming Units of Granulocytes and Macrophages*) – wczesna komórka układu granulocytowo-makrofagowego tworząca *in vitro* 11 dnia hodowli kolonie granulocytowo-makrofagowe; **CFU-Meg** (ang. *Colony Forming Units of Megacaryocytes*) – wczesna komórka układu megakariocytowego tworząca *in vitro* 11 dnia hodowli kolonie megakariocytowe; **CFU - Mix** (ang. *Colony Forming Units of Mixed Lineages*) – jedna z najwcześniejszych komórek układu krwiotwórczego tworząca 15 dnia hodowli *in vitro* kolonie składające się z krwinek czerwonych, granulocytów, makrofagów i megakariocytów; **c-mpl** – protoonkogen komórkowy kodujący receptor dla trombopoetyny; **DAMI** (ang. *human megakaryoblastic cell line*) – ludzka komórkowa linia megakarioblastyczna; **ets** – rodzina białek o charakterze czynników transkrypcyjnych; **GATA** – czynnik transkrypcyjny; **GM-CSF** (ang. *Granulocyto-Monocyto Colony Stimulating Factor*) – czynnik wzrostowy stymulujący wzrost kolonii granulocytowo-makrofagowych; **HEL** (ang. *Human Erythroleukemia Cell Line*) – linia komórek erytrolekemicznych; **HMC-1** (ang. *human mast cell line*) – ludzka linia komórek monocytowych; **IL-3** – interleukina-3; **IL-6** – interleukina-6; **IL-11** – interleukina-11; **RT-PCR** (ang. *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) – czuła technika badania ekspresji mRNA w komórce polegająca na przepisanie odpowiedniej sekwencji mRNA za pomocą enzymu odwrotnej transkryptazy na komplementarny odcinek cDNA, który następnie jest amplifikowany za pomocą termocyklicznej reakcji PCR; **INF** – interferon; **JAK** (ang. *Janus Kinase*) – rodzina wewnątrzcytoplazmatycznych białek o aktywności kinazy tyrozynowej, do której należą Jak1, Jak2, Jak3 i Tyk2; **KL** (ang. *Kit Ligand*) – ligand receptora c-KIT; **KU 812** (ang. *Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line*) – ludzka linia komórkowa pochodząca od pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową; **K513 MO7E** (ang. *factor-dependent pluripotent cell line*) – czynniko-zależna wielopotencjalna linia komórkowa; **LIF** (ang. *Leukemia Inhibitory Factor*) – czynnik hamujący wzrost komórek niektórych linii białaczkowych; **Meg-CSF** (ang. *Colony Stimulating Factor of Megacaryocytes*) – megakariocytopoetyna – hipotetyczny czynnik stymulujący wzrost klonalny megakariocytów, synonim trombopoetyny; **MPLV** (ang. *Myeloproliferative Leukemia Virus*) – wirus indukujący zespoły mieloproliferacyjne i białaczki u myszy; **PIXY 321** – białko łączone (ang. *fusion protein*) zbudowane z połączonych ze sobą cząsteczek; **shc** – wewnątrzcytoplazmatyczne białko o aktywności kinazy tyrozynowej; **STAT** (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription*) – rodzina białek regulujących proces transkrypcji, aktywowanych przez JAK kinazy; **TF-1** (ang. *factor-dependent pluripotent cell line*) czynniko-zależna wielopotencjalna linia komórkowa; **THP-1 U 937** (ang. *Human Monocytic Leukemia Cell Line*) – ludzkie linie monocytowych komórek leukemicznych; **TPO** – trombopoetyna; **TYK-2** – białko o aktywności kinazy tyrozynowej należące do rodziny wewnątrzcytoplazmatycznych białek JAK.; **U 937** (ang. *Human Monocytic Leukemia Cell Line*) – ludzkie linie monocytowych komórek leukemicznych; **UT-7** (ang. *factor-dependent pluripotent cell line*) czynniko-zależna wielopotencjalna linia komórkowa; **v-mpl** – onkogen wirusowy kodujący receptor mpl, onkogen ten wchodzi w skład genomu wirusa MPLV; **WSXWS boxes** – motywy tryptofano-serynowe zawarte w zewnętrznej części receptora charakterystyczne dla receptorów z tzw. rodziny receptorów dla hemopoetycznych czynników wzrostowych;

WSTĘP

Małopłytkowość stanowi jeden z poważniejszych problemów klinicznych. Niedobór płytek krwi niesie bowiem ze sobą ryzyko wystąpienia powikłań krwotocznych bezpośrednio zagrażających życiu pacjenta. Ponieważ doraźne uzupełnianie niedobo-

rów krwinek płytkowych poprzez przetoczenie tzw. masy płytkowej wiąże się zarówno z ryzykiem alloimmunizacji, jak i naraża pacjenta na zakażenie patogenami, przenoszonymi przez preparaty krwi – od dawna poszukiwano innych skutecznych sposobów leczenia powyższego schorzenia [54].

Od kilku lat próbuje się m.in. zastosować w leczeniu małopłytkowości amegakariocytozy różne hemopoetyczne czynniki wzrostowe ogólnie stymulujące układ krwiotwórczy w tym również linię megakariopetyczną [50,51,54]. Zgodnie z powyższym podjęto próby stymulowania ludzkiej megakariopoezy *in vivo* za pomocą: IL3, IL6, IL11, SCF oraz tzw. białka łączonego (ang. *fusion protein*) PIXY 321 – będącego rekombinowanym dimerem: IL-3 + GM-CSF [67]. Czynniki te stymulując wczesne komórki układu krwiotwórczego prowadzą m.in. do zwiększenia liczby megakariocytów w szpiku kostnym oraz powstawania w wyniku fragmentacji ich cytoplazmy tzw. krwinek płytkowych, które następnie krążą we krwi obwodowej.

Wiele nagromadzonych w poprzednich latach obserwacji wskazywało na to, że w organizmie występuje swoisty czynnik wzrostowy stymulujący megakariopoezę oraz wytwarzanie płytek krwi [40]. Czynniki te nazywano w literaturze megakariocytopoetyną lub trombopoetyną. Dzięki postępom biologii molekularnej czynnik ten został faktycznie niedawno zidentyfikowany, sklonowany i otrzymany w postaci tzw. białka rekombinowanego [3,9,24,32,36,56].

Odkrycie to otwiera nowe perspektywy zarówno w badaniach nad poznaniem wytwarzania krwinek płytkowych w organizmie jak również niesie ze sobą nowe możliwości potencjalnego wykorzystania trombopoetyny w klinice jako leku stymulującego megakariopoezę u pacjentów cierpiących na małopłytkowość.

HISTORIA BADAŃ NAD MECHANIZMAMI REGULUJĄCYMI MEGAKARIOPOEZĘ

Pierwszą rozróżnialną morfologicznie komórką układu płytkotwórczego jest megakariocyt. W formie w pełni dojrzałej jest to stosunkowo duża komórka o polipoidalnym jądrze. Jak wiadomo, megakariocyt w wyniku fragmentacji cytoplazmy uwalnia do krwi obwodowej tzw. płytki krwi, które pełnią podstawową rolę w procesach krzepnięcia.

Badając mechanizmy powstawania krwinek płytkowych w organizmie, już w 1957 roku postawiono hipotezę, że produkcja ich kontrolowana jest przez swoisty czynnik wzrostowy, który nazwano trombopoetyną [29]. Przypuszczano że, stężenie tego czynnika wzrasta we krwi oraz moczu ludzi i zwierząt cierpiących na małopłytkowość np. w przebiegu aplazji szpiku kostnego. Potwierdzeniem powyższej hipotezy był fakt, że wstrzyknięcie zwierzętom doświadczalnym gatunkowo swoistej surowicy uzyskanej od zwierząt cierpiących na aplazję stymulowało *in vivo* produkcję płytek krwi [30,31,47]. Zawarty w surowicy aplastycznej czynnik stymulował:

- 1) zwiększenie liczby megakariocytów w szpiku kostnym,
- 2) stopień ich poliploidyzacji,

3) wzrost ekspresji specyficznych białek na powierzchni płytek krwi oraz

4) szybsze wbudowywanie radioaktywnie znakowanych związków siarki do nowo powstających płytek [25,38,49].

Przez szereg lat wiele zespołów badawczych usiłowało zcharakteryzować i wyizolować powyższy czynnik wzrostowy. Opisano nawet różne frakcje białek oraz częściowe sekwencje protein o właściwościach indukujących megakariopoezę [22,60,63].

Badanie mechanizmów regulujących megakariopoezę posunęło się naprzód z chwilą opracowania modeli klonogennych *in vitro* komórek ukierunkowanych tego układu, czyli tzw. CFU-Meg. Opierając się na wynikach tych badań wysunięto hipotezę tzw. dwustopniowej stymulacji megakariopoezy [17]. Megakariopoeza na wczesnych jej etapach miała podlegać wpływowi megakariocytopoetyny (Meg-CSF) – będącej czynnikiem stymulującym wzrost klonalny megakariocytów, a na późniejszych etapach miała być regulowana przez domniemaną trombopoetynę wpływającą głównie na dojrzewanie megakariocytów, ich poliploidyzację oraz fragmentację cytoplazmy i uwalnianie płytek do krwi. Posługując się powyższym modelem rolę megakariocytopoetyny przypisywano niektórym poznanym już czynnikom wzrostowym, np. IL-3, IL-6 czy IL-11 [10,68].

Przełom w zrozumieniu mechanizmów regulujących megakariopoezę nastąpił na początku lat dziewięćdziesiątych wraz z odkryciem protoonkogenu *c-mpl* – kodującego receptor dla niezidentyfikowanego jeszcze wtedy hemopoetycznego czynnika wzrostowego [57]. Szybko okazało się, że zablokowanie za pomocą strategii oligomerów antysensowych ekspresji tego receptora we wczesnych komórkach szpiku kostnego prowadziło do wybiórczego zahamowania ich różnicowania w kierunku megakariopoetycznym. Wysunięto wówczas przypuszczenie, że *c-mpl* jest receptorem dla swoistego czynnika wzrostowego stymulującego megakariopoezę.

Jak się okazało kilka lat później, przypuszczenie to było słuszne.

ODKRYCIE PROTOONKOGENU *c-mpl* I ZIDENTYFIKOWANIE JEGO ROLI BIOLOGICZNEJ

W 1990 roku Souri i wsp. [57] analizując strukturę genomu wirusa MPLV, który indukuje zespoły mieloproliferacyjne i białaczki u myszy wykryli, że w genie kodującym otoczkę wirusa występuje nie opisana do tej pory sekwencja nukleotydoma przypominająca strukturalnie gen kodujący receptor dla niezidentyfikowanego jeszcze hemopoetycznego czynnika wzrostowego. Nowo odkrytemu genowi nadano nazwę *v-mpl*.

Dwa lata później Vigon i wsp. [65] wykorzystując jako swoistą sondę sekwencję wirusową *v-mpl* podczas przeszukiwania ludzkiej biblioteki cDNA otrzymanej z komórek linii HEL, zidentyfikowali i sklonowali odpowiednik powyższego genu u człowieka. Otrzymano łącznie dwa klony cDNA zbliżone strukturalnie do *v-mpl*.

Obydwa klony kodowały homologiczne białka różniące się głównie długością części wewnątrzkomórkowej receptora.

Wkrótce potwierdzono, że sklonowany protoonkogen *c-mpl* rzeczywiście koduje receptor z rodziny tzw. receptorów hemopoetycznych czynników wzrostowych. Analizując jego budowę molekularną stwierdzono, że ma on podobnie jak inne receptory tej grupy następujące cechy:

1) Część zewnątrzcytoplazmatyczna białka receptorowego jest bogato glikozylowana.

2) W części zewnątrzłonowej receptora znajdują się miejsca bogate w cysteinę oraz motywy tryptofano/serynowe (tzw. *WSXWS boxes*).

3) Fragment wewnątrzkomórkowy jest bogaty w prolinę i serynę.

4) Część wewnątrzłonowa receptora pozbawiona jest wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej.

5) Receptor ten po pobudzeniu i aktywowaniu swoistym ligandem może przyłączać inne białka wewnątrzcytoplazmatyczne mające aktywność kinazy tyrozynowej.

U człowieka sekwencja genomowa kodująca protoonkogen *c-mpl* znajduje się na długim ramieniu 1 chromosomu w locus 34 (1 q 34) [55]. Opisano sekwencje mRNA kodującą długie i krótkie białko receptorowe. Ludzkie sekwencje mRNA kodujące dłuższe oraz krótsze białko receptora *c-mpl* wynoszą odpowiednio: 3700 i 2800 nukleotydów. W wyniku rybosomalnej translacji mRNA kodującego *c-mpl*, powstają łańcuchy peptydowe mające odpowiednio długość: 635 i 572 aminokwasów. Łańcuch peptydowy białka kodującego receptor *c-mpl* rozpoczyna się hydrofobowym fragmentem sygnałowym. Część zewnątrzkomórkowa receptora składa się z 463 aminokwasów i przechodzi w 22-aminokwasowy przezłonowy odcinek hydrofobowy. Region wewnątrzcytoplazmatyczny na poziomie pierwszych dziewięciu aminokwasów jest wspólny dla dwóch podtypów receptora. Różnice pomiędzy dłuższą i krótszą formą receptora dotyczą odpowiednio kolejnych 122 i 66 aminokwasów.

Część zewnątrzłonowa receptora *c-mpl* podobnie jak receptorów dla IL3 i GM-CSF składa się z dwóch podjednostek zawierających cztery potencjalne miejsca dla glikozylacji. Receptor *c-mpl* zawiera także dodatkową domenę pomiędzy 191 a 241 aminokwasem – charakterystyczną dla receptorów dla innych czynników hemopoetycznych. Masa cząsteczkowa dłuższej formy receptora *c-mpl* wynosi 71 kDa, krótszej z kolei 65 kDa [65]. Ostatnio zidentyfikowano również tzw. rozpuszczalną formę receptora *c-mpl*, która nie jest związana z powierzchnią błony komórkowej [64]. Jej fizjologiczna rola polega prawdopodobnie na wiązaniu występującej w płynach ustrojowych trombopoetyny i tym samym regulowaniu jej dostępności biologicznej dla białka receptorowego związanego z powierzchnią błony komórkowej [34].

W okresie gdy nie sklonowano jeszcze swoistego ligandu, wykazano za pomocą technik rekombinowanego DNA, że chimeryczny receptor *c-mpl*, w którym część zewnątrzkomórkową zastąpiono fragmentem receptora IL-4 lub G-CSF po pobudzeniu IL-4 lub G-CSF-em miał zdolność stymulacji wzrostu komórek hemopoetycznych [55,64].

Badając ekspresję genu receptora *c-mpl* za pomocą techniki *Northern blot*, w różnych liniach hemopoetycznych, wykryto swoiste mRNA jedynie w komórkach

linii HEL. Wykorzystując natomiast czulszą metodę detekcji jaką jest technika RT-PCR, ekspresję mRNA kodującego receptor *c-mpl* stwierdzono również w następujących ludzkich liniach komórkowych: UT-7, M07E, TF-1, HEL, DAMI, KU 812, HMC -1, AP 217 [11,37,41]. Warto nadmienić, że powyższe linie obok innych liniowo specyficznych antygenów, wykazują m.in. ekspresję antygenów specyficznych dla komórek ukierunkowanych linii megakariopoetycznej, np. mają na powierzchni błony komórkowej glikoproteinę IIb/IIIa. Obecność mRNA kodującego powyższy receptor stwierdzono ponadto: w ludzkim łożysku, szpiku kostnym, wątrobie płodowej, komórkach krwi pępowinowej, komórkach krwi obwodowej, komórkach śródbłona oraz w limfocytach stymulowanych fitohemaglutyniną [65]. Wykorzystując technikę RT-PCR badano również ekspresję mRNA receptora *c-mpl* na wczesnych komórkach hemopoetycznych. W opublikowanej niedawno pracy Scadden i wsp. [5] podali, że nie udało się im wykryć ekspresji receptora *c-mpl* na ludzkich komórkach CD34+, C-Kit+, szpiku kostnego znajdujących się w fazie Go, czyli komórkach zbliżonych do frakcji komórek macierzystych. Receptor ten pojawia się u człowieka dopiero na komórkach bardziej zróżnicowanych, np. CD34+, CD 33+, CD 34+ CD 41a+ lub CD34+ CD61+ [11].

Do tej pory nie rozstrzygnięto, czy receptor *c-mpl* występuje na powierzchni ludzkich tzw. wielopotencjalnych komórek hemopoetycznych (jakimi są -CFU-Mix). Receptor *c-mpl* ulega za to ekspresji na powierzchni megakariopoetycznych komórek ukierunkowanych (CFU-Meg). Nie występuje natomiast na komórkach ukierunkowanych linii erytroblastycznej (BFU-E), granulocytowo-makrofagowej (CFU-GM) oraz komórkach limfopoetycznych [11,41].

W zidentyfikowaniu fizjologicznej roli receptora *c-mpl* pomocne okazały się techniki zarówno przejściowego zablokowania ekspresji genu za pomocą strategii oligomerów antysensowych, jak i otrzymanie dzięki tzw. homologicznej rekombinacji trwałych mutantów mysich mających wrodzony defekt receptora *c-mpl*.

W badaniach tych stwierdzono bowiem, że:

1) zaburzenie ekspresji receptora *c-mpl* w komórkach CD 34+ za pomocą specyficznych oligomerów antysensowych powodowało wybiórcze zahamowanie proliferacji komórek tworzących kolonie megakariocytowe szpiku [41],

2) otrzymane w wyniku homologicznej rekombinacji myszy mające wrodzoną mutację genu receptora *c-mpl* wykazywały 85% spadek liczby dojrzałych płytek krwi. Obecnie wiadomo, że u zwierząt tych stwierdza się ponadto podwyższony poziom krążącej we krwi trombopoetyny [19].

SKLONOWANIE PEŁNEJ SEKWENCJI MYSIEGO RECEPTORA *c-mpl*

Pomimo że fragment cDNA mysiego genu receptora *c-mpl* występujący w genomie wirusa MPLV pozwolił na wyizolowanie i sklonowanie odpowiednich ludzkich sekwencji cDNA, to pełna mysia sekwencja kodująca białko *c-mpl* została odkryta

znacznie później. cDNA kodujące mysiego receptor c-mpl zostało sklonowane przez dwie niezależne grupy badawcze [55,64].

Protoonkogen *c-mpl* u myszy znajduje się na chromosomie 4 w prążku D. Okazało się, że receptor c-mpl wykazuje znaczny stopień homologii międzygatunkowej [64]. Ludzka i mysia sekwencja nukleotydowa cDNA receptora mpl w odcinku ulegającym translacji wynosi 83%. Z kolei podobieństwo sekwencji aminokwasowej pomiędzy mysim a ludzkim receptorem mpl sięga 81%. Największe jest w części wewnątrz błonowej receptora (91%), w miejscu, które zawiera motyw odgrywający ważną rolę w transdukcji sygnału z pobudzonego receptora. Warto nadmienić, że delecja tego odcinka w występującym w genomie wirusa MPLV onkogenie *v-mpl* powoduje zniesienie jego patogenności [4,45]. Najmniejszą z kolei homologię znajduje się w hydrofilowym odcinku tworzącym pierwszą domenę części zewnątrz błonowej (50%) [64].

Mysiego receptor kodowany przez c-mpl podobnie jak jego ludzki odpowiednik wykazuje również cechy charakterystyczne dla innych receptorów z tzw. "rodziny receptorów" dla hemopoetycznych czynników wzrostowych.

Seqwencję cDNA kodującą mysiego receptor c-mpl sklonowano wykorzystując jako sondę molekularną sekwencję *v-mpl*. Za pomocą powyższej sondy, przeszukiwano myszą bibliotekę uzyskaną z komórek wątroby płodowej. W trakcie przeszukiwania zidentyfikowano szereg klonów kodujących mysiego receptor c-mpl. Uzyskane klony podzielono na trzy grupy [55].

Grupa pierwsza reprezentowała klony cDNA kodujące fragmenty receptora związanego z błoną komórkową. Długość cDNA kodującego mysiego receptor c-mpl związany z błoną komórkową wynosi 2930 nukleotydów. Część cDNA ulegająca translacji koduje białko receptorowe składające się z 625 aminokwasów. Aminokwasy następujące po inicjującym translację kodonie metioninowym są hydrofobowe i mają charakterystyczną sekwencję peptydu sygnałowego o długości 25 aminokwasów. Peptyd sygnałowy rozpoczyna zawierającą 483 aminokwasy część zewnątrz błonową receptora, która następnie przechodzi w 22-aminokwasowy hydrofobowy odcinek w części przez błonowej. Część wewnątrzcytoplazmatyczna składa się natomiast z 120 aminokwasów. Część zewnątrz błonowa receptora składa się z dwóch domen, z których każda zawiera po cztery konserwowane miejsca cysteinowe oraz charakterystyczne motywy tryptofano-serynowe (WGXWS i WSXWS *boxes*). Łańcuch polipeptydowy receptora c-mpl ma pięć potencjalnych miejsc N-glikozylacji. Część wewnątrzkomórkowa receptora zawiera miejsca bogate w prolinę i serynę. Nie ma ona natomiast sekwencji o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej.

Grupa druga reprezentowała klony kodujące skróconą formę receptora mpl (ang. *truncated form*). cDNA skróconej formy receptora mpl koduje białko o długości 457 aminokwasów, którego masa cząsteczkowa wynosi 51 kD. Krótsza forma mpl ma identyczną sekwencję cDNA w porównaniu z formą dłuższą za wyjątkiem 257 pozycji ulegających delekcji w części zewnątrzcytoplazmatycznej oraz przez błonowej receptora. Opisane cDNA powstaje w wyniku alternatywnego składowania cząsteczek mRNA i koduje prawdopodobnie rozpuszczalną formę receptora, niezwiązanego z powierzchnią błony komórkowej.

W trzeciej grupie wyizolowanych klonów cDNA znajdowały się sekwencje pre-mRNA.

Podobnie jak u człowieka, ekspresja receptora c-mpl jest u myszy ograniczona do komórek linii megakariopoetycznej. Przy użyciu techniki *Northern blot* nie stwierdzono jego obecności w mysich liniach komórkowych: limfoidalnych, plazmocytowych, tucznych, erytroidalnych oraz granulocytowo-makrofagowych [64].

ODKRYCIE I SKLONOWANIE LIGANDU RECEPTORA c-mpl (TROMBOPOETYNY)

Uprzednie odkrycie i sklonowanie receptora c-mpl, oraz następnie zidentyfikowanie niekorzystnego wpływu, jaki wywiera na megakariopoezę zablokowanie jego funkcji biologicznej stało się wyzwaniem do sklonowania genu kodującego swoisty ligand. Rozpoczęto intensywnie poszukiwania, które zakończyły się pełnym sukcesem i wkrótce kilka niezależnych grup badawczych ogłosiło niemal równocześnie sklonowanie ligandu mającego własności charakterystyczne dla trombopoetyny [3,9,32,36,44]. Poszczególne zespoły badawcze dokonały tego w odmienny sposób, posługując się różnymi strategiami.

Pierwszy z nich prowadzony przez Kaushanskyego postanowił otrzymać rosnący autokrynnie na skutek interakcji receptora c-mpl z trombopoetyną – klon komórek hemopoetycznych [36]. Zgodnie z powyższym gen kodujący myszy receptor c-mpl transfekowano do komórek zależnej od IL-3 linii komórkowej limfocytów pre-B (BaF3). Komórki BaF3 po transfekcji wykazywały na swej powierzchni ekspresję obu receptorów: receptora dla IL-3 oraz receptora c-mpl. Komórki takie podobnie jak komórki wyjściowe wymagały nadal do wzrostu obecności IL-3 w środowisku hodowlanym. Następnie, w celu uzyskania linii komórkowej rosnącej autokrynnie w obecności samej tylko trombopoetyny, komórki BaF3, które nabyły w wyniku transfekcji ekspresję receptora c-mpl (BaF3 c-mpl +), poddano działaniu czynnika mutagennego. Liczono na to, że pod wpływem dokonanej w ten sposób zmiany ekspresji materiału genetycznego, w którejś z komórek pojawi się mutacja uaktywniająca ekspresję genu kodującego trombopoetynę. Zgodnie z powyższą strategią komórki BaF3 (c-mpl+) po zadziałaniu czynnika mutagennego, zaczęto hodować w środowisku pozbawionym IL-3. W warunkach takich rosnąć mogły jedynie te komórki (BaF-3 mpl+), które zaczęły autokrynnie produkować trombopoetynę. Klon taki faktycznie udało się zidentyfikować. Stwierdzono równocześnie, że nadsącz komórek tego klonu stymuluje megakariopoezę. W następnym etapie z komórek tych utworzono tzw. bibliotekę ekspresyjną cDNA, którą transfekowano komórki nerki płodowej chomika (BHK). Badano następnie, czy nadsącz powyższych komórek ma zdolność stymulowania megakariopoezy. Komórki te hodowano stosując metodę kolejnych rozcieńczeń. Postępując w ten sposób znaleziono w końcu klon transfekowany fragmentem mysiego cDNA, który kodował trombopoetynę. Sekwencja mysiego cDNA posłużyła w dalszym etapie badań do znalezienia odpowiedniej sekwencji ludzkiej.

Inną strategię otrzymania trombopoetyny przyjęły z kolei grupy: de Savauge i Bartley [3,9,24]. Badacze ci postanowili uzyskać ligand receptora c-mpl z osocza aplastycznego pochodzącego od napromieniowanych zwierząt. Uzyskane osocze przepuszczano przez odpowiednie kolumny zawierające jako adsorbent unieruchomione białko receptorowe c-mpl. Posługując się taką strategią wyizolowano dwa białka o masie 25 i 31 kDa. Miały one identyczną N-końcową sekwencję aminokwasową. Sekwencja ta posłużyła do zsyntetyzowania tzw. zdegenerowanych sekwencji primerów, za pomocą których zamplifikowano odpowiedni region genomowego DNA. Powielony w wyniku reakcji PCR fragment cDNA użyto następnie jako swoistej sondy molekularnej podczas przeszukiwania ludzkiej biblioteki cDNA. Z biblioteki tej wyizolowano homologiczny klon cDNA o długości 1800 par zasad.

Po ogłoszeniu faktu sklonowania i podaniu sekwencji cDNA dla trombopoetyny przez wyżej wymienione zespoły dwie następne grupy badawcze Miyazaki i Rosenberga również ogłosiły, że sklonowały powyższy czynnik wzrostowy. Grupa Miyazaki [44] przeszukiwała ludzką genomową bibliotekę używając jako sondy ludzką sekwencję cDNA dla TPO. Z wyizolowanych 13 klonów jeden poddano dalszej analizie i za pomocą techniki *Southern blot* zidentyfikowano odpowiednią sekwencję DNA zawierającą region kodujący trombopoetynę. Drugi z zespołów prowadzony z kolei przez Rosenberga [32] wyizolował z osocza trombocytopenicznych owiec białko o masie ok. 31 kDa, tzw. megapoetynę i wykazał, że jej sekwencja jest identyczna z sekwencją trombopoetyny, którą sklonowały wymienione grupy badawcze.

GEN KODUJĄCY TROMBOPOETYNĘ I JEGO PRODUKT BIAŁKOWY

Gen kodujący ludzką trombopoetynę mieści się na długim ramieniu 3 chromosomu w prążku 27 (3q 27) [15]. Jego długość wynosi 6,2 kbp. Składa się on z 6 eksonów i 5 intronów. Promotor genu c-mpl przypomina strukturalnie promotory dla innych genów biorących udział w procesie megakariopoezy, takich jak: promotor genu GpIIb i ma m.in. miejsca wiążące białka GATA oraz ets [42].

Pierwszy i drugi ekson genu trombopoetynowego zawiera sekwencje nie ulegające translacji, oraz kodujące cztery pierwsze aminokwasy peptydu sygnałowego.

Pozostała część kodująca peptyd sygnałowy znajduje się w 3 eksonie. Homologiczny do sekwencji EPO tzw. fragment aminowy oraz część karboksylowa ligandu zakodowane są w eksonie 6 [20].

Gen kodujący TPO przypomina strukturą gen erytropoetynowy i uważa się, że obydwa geny powstały podczas ewolucji w wyniku duplikacji.

Budowa zarówno genu, jak i struktura molekularna ligandu dla c-mpl jest wysoce zachowana pomiędzy poszczególnymi gatunkami ssaków.

Stwierdzono, że struktura ludzkiego, psiego oraz mysiego ligandu c-mpl jest identyczna w 77–83% [3,20].

Sklonowane cDNA kodujące trombopoetynę ma długość 1774 par zasad. Kodon zawierający zapis genetyczny dla 353 aminokwasów ograniczony jest odpowiednio od końca 5' przez 215 a od końca 3' przez 498 nukleotydy nie ulegające translacji. Ciężar cząsteczkowy łańcucha polipeptydowego trombopoetyny wynosi ok 35.000 i jest np. dwukrotnie większy od masy cząsteczkowej GM-CSFu czy erytropoetyny [9].

Okazało się, że trombopoetyna u wszystkich przeanalizowanych do tej pory gatunków ssaków składa się z dwóch domen:

- 1) końca aminowego o homologii zbliżonej do erytropoetyny oraz
- 2) końca karboksylowego, którego nie zawierają żadne inne do tej pory poznane czynniki wzrostowe.

Wspomniana część aminowa trombopoetyny jest w 23% podobna do ludzkiej erytropoetyny, a w miejscach wysoce konserwatywnych podobieństwo to sięga nawet 50%. Warto nadmienić, że domena aminowa trombopoetyny wykazuje także niskiego stopnia podobieństwo do cząsteczek interferonu alfa i beta [27,36].

Wspomniany koniec aminowy cząsteczki trombopoetyny, podobnie jak erytropoetyna ma cztery reszty cysteinowe, z których trzy są konserwatywne. Część aminowa trombopoetyny zawiera 152 aminokwasy, które oddzielone są od 177 aminokwasowego końca karboksylowego miejscem proteolitycznym utworzonym przez parę aminokwasów: Arg-Arg [15]. Wykazano, że sam tylko koniec aminowy jest wystarczający do aktywacji białka receptora [9]. Koniec karboksylowy ligandu jest z kolei bogaty w miejsca serynowe, treoninowe i prolinowe. Zawiera on odpowiednio sześć potencjalnych miejsc dla N-glikozytacji u człowieka i siedem u myszy [35]. Funkcja końca karboksylowego nie jest do tej pory poznana. Przypuszcza się, że być może pełni ważną rolę w procesie łączenia się ligandu z błoną komórkową [21] lub w formie glikolizowanej może stabilizować cząsteczkę trombopoetyny, prowadząc tym samym do zwiększenia półokresu jej trwania w płynach ustrojowych [46,59].

Gurney i wsp. [20] zidentyfikowali dwie formy ludzkiego ligandu c-mpl: TPO i TPO2. TPO-2 różni się od TPO delecją czterech aminokwasów w pozycji 112 - 115 części aminowej łańcucha peptydowego. Krótsza forma ligandu nie ma właściwości aktywujących receptor i prawdopodobnie powstaje w wyniku alternatywnego składowania pre-mRNA. Rola biologiczna tej formy TPO jest jeszcze nie poznana.

U człowieka i myszy trombopoetyna ulega wysokiej ekspresji w wątrobie, nerce, mięśniach poprzecznie prążkowanych, a w mniejszym stopniu w mózgu, śledzionie oraz szpiku kostnym, a także w komórkach śródbłonna oraz fibroblastach [2,3,36].

BIAŁKA BIORĄCE UDZIAŁ W TRANSDUKCJI SYGNAŁU Z POBUDZONEGO RECEPTORA c-mpl

Jak wspomniano powyżej, receptor c-mpl – podobnie jak inne receptory z tzw. "rodziny receptorów" dla hemopoetycznych czynników wzrostowych – nie ma w swojej części wewnątrzcytoplazmatycznej regionów o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej. Niemniej jednak podobnie jak w przypadku innych receptorów tej

grupy pobudzenie jego swoistym ligandem prowadzi do aktywacji wielu białek wewnątrzcytoplazmatycznych. W przypadku receptora c-mpl białka te ulegają fosforylacji już w pierwszej minucie po związaniu swoistego ligandu, osiągając wartość szczytową pomiędzy 10 a 20 minutą, ulegają zaś defosforylacji w 60 minucie. Białka biorące udział w transdukcji sygnału są powoli identyfikowane. Wiadomo również, że sam receptor c-mpl w wyniku aktywacji przez swoisty ligand ulega fosforylacji jakkolwiek jego ufosforylowanie nie jest konieczne do transdukcji sygnału do komórki. Po interakcji receptora ze swoistym ligandem następuje pobudzenie białek shc, cbl, vav, PI3-K, MAP-K oraz kinaz JAK-2 i TYK-2 [12,43,53,61].

Rola biologiczna kinaz JAK-2 i TYK-2 została zbadana głównie w transdukcji sygnału z pobudzonego receptora dla interferonu alfa i beta [8]. Wiadomo, że ich pobudzenie pociąga za sobą fosforylację tzw. białek grupy STAT, które po ufosforylowaniu ulegają przemieszczeniu do jądra aktywując transkrypcję niektórych genów. Uważa się, że w transdukcji sygnału z pobudzonego receptora c-mpl ważną rolę odgrywają białka STAT1, STAT3 oraz STAT 5 [12,43,45].

Nie wiadomo natomiast w chwili obecnej, które fosfatazy są odpowiedzialne za defosforylację białek, biorących udział w transdukcji sygnału, w wyniku aktywacji przez TPO swoistego receptora.

ROLA TROMBOPOETYNY W REGULACJI MEGAKARIOPOEZY

Wszystko wskazuje na to, że trombopoetyna jest tak długo poszukiwanym czynnikiem wzrostowym występującym w osoczu, regulującym namnażanie megakariocytów oraz powstawanie dojrzałych morfologicznie płytek krwi [7,26]. Poziom trombopoetyny w płynach ustrojowych jest odwrotnie proporcjonalny do zawartości krwinek płytkowych w osoczu i podlega mechanizmom o charakterze sprzężeń zwrotnych. Wiadomo bowiem, że spadek liczby płytek krwi u zwierząt doświadczalnych powoduje wzrost jej stężenia w surowicy. Odwrotny wpływ z kolei wywiera trombocytoza, która prowadzi do zmniejszenia jej poziomu [33]. U myszy z wywołaną doświadczalnie małopłytkowością, trombopoetyna jest wykrywalna w osoczu już w osiem godzin po obniżeniu wartości płytek, osiągając wartość szczytową w 24 godzinie, a podwyższony jej poziom utrzymuje się jeszcze przez kolejne 4 doby [66].

Trombopoetyna podawana codziennie dootrzewnowo myszom w dawce 50 ng powodowała po siedmiu dniach czterokrotny wzrost liczby krążących płytek krwi [36] oraz zwiększała wbudowywanie radioaktywnie znakowanych związków siarki do nowopowstających krwinek płytkowych [9]. Wzrostowi płytek krwi w osoczu po stymulacji TPO odpowiadał 9-krotny wzrost liczby megakariocytów oraz 20-krotny wzrost wczesnych komórek ukierunkowanych układu megakariopoetycznego (CFU-Meg) w szpiku kostnym i śledzionie. Efektu tego nie wywołano podawaniem innych cytokin, takich jak IL-11, IL-6 lub KL [27,36].

Trombopoetyna oddziałuje wybiórczo na proces megakariopoezy nie wywierając jednocześnie wpływu na inne linie układu krwiotwórczego [3]. Potwierdzają to wyniki badań własnych przeprowadzanych w medium bezsurowiczym *in vitro*. Jak wynika z przeprowadzonych doświadczeń TPO nie kostymulowała wzrostu ludzkich kolonii granulocytowo-makrofagowych ani kolonii erytroidalnych [tab. 1].

Warto nadmienić, że u zwierząt doświadczalnych w przebiegu ostrej trombocytopenii indukowanej podaniem surowicy antyplatekowej obserwowano wzrost liczby śledzionowych CFU-E oraz śledzionowych i szpikowych BFU-E i CFU-GM [28,36]. Podobnie zaobserwowano wzrost liczby CFU-Mix i BFU-E, a także szybszą odnowę układu czerwonekrwinkowego u zwierząt poddawanych przeszczepieniom szpiku od dawców, które wcześniej otrzymywały trombopoetynę [14]. Wpływ TPO na wzrost komórek linii erytroidalnej i granulocytowo-makrofagowej wymaga więc dalszych badań i weryfikacji doświadczalnej. Niewykluczone jest występowanie różnic międzygatunkowych w opowiedzi na ten czynnik wzrostowy.

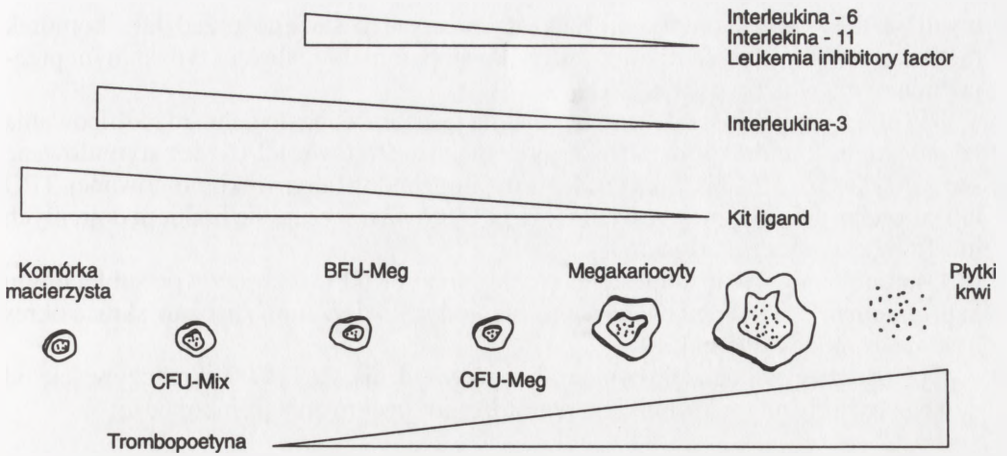
W badaniach doświadczalnych wykazano również, że tzw. rozpuszczalna forma receptora c-mpl całkowicie neutralizuje działanie trombopoetyny i wybiórczo hamuje dojrzewanie megakariocytów [9,26,66]. Stymulując trombopoetyną hodowane w zawiesinie wczesne komórki hemopoetyczne mające antygen CD 34 obserwowano ich różnicowanie w kierunku linii megakariopoetycznej [69]. Z komórek CD34+ powstawały komórki mające ekspresję płytkowych glikoprotein Gp Ib oraz Gp IIb/IIIa, a także, dojrzałe już megakariocyty uwalniające aktywne biologicznie płytki [6,7]. Wykazano również, że trombopoetyna zwiększa ekspresję wymienionych glikoprotein na powierzchni wczesnych komórek linii megakariocytowej [9,27].

Trombopoetyna dodana do hodowli komórek szpiku kostnego stymuluje powstawanie *in vitro* kolonii megakariocytowych [6]. Świadczy to o jej działaniu stymulującym bezpośrednio CFU-Meg (rys. 2).

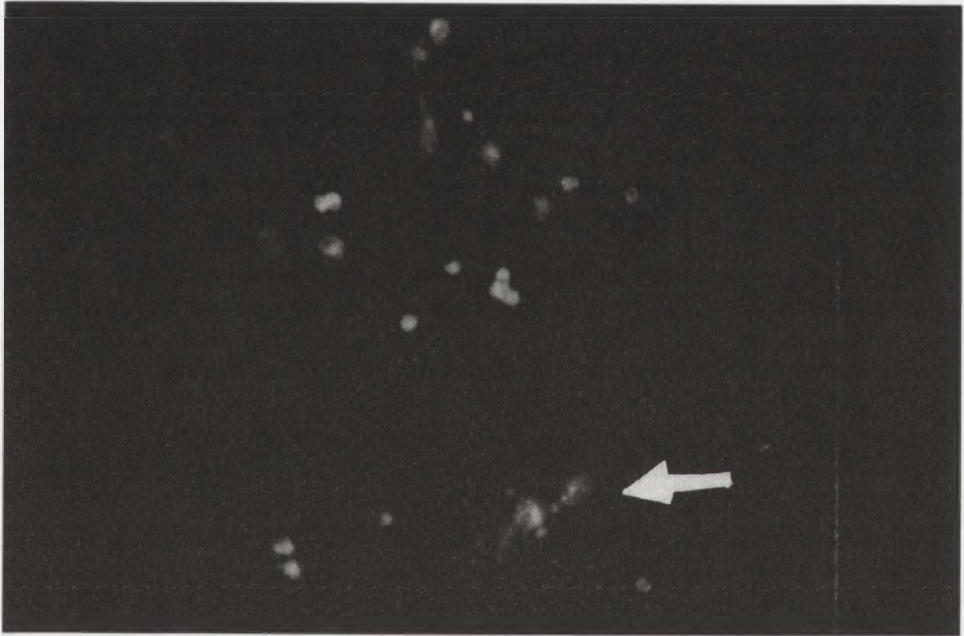
Najwcześniejsze etapy megakariopoezy regulowane są prawdopodobnie oprócz samej TPO również przez inne cytokiny, takie jak: KL, IL-3, GM-CSF, IL-11, LIF i IL-6 [10,11,28,52]. Zgodnie z przedstawionym schematem (rys. 1) trombopoetyna oddziałuje jednak głównie na późniejsze procesy megakariopoezy – przyspieszając przede wszystkim proliferację bezpośrednich prekursorów megakariocytowych oraz powstawanie i dojrzewanie płytek krwi. Jak wspomniano, że TPO przyspiesza fragmentację cytoplazmy megakariocytów i dojrzewanie trombocytów [28]. Istnieją również dane, że trombopoetyna aktywuje szereg białek biorących udział w transdukcji sygnału bezpośrednio w dojrzałych, uwolnionych do krwioobiegu krwinkach płytkowych [43].

Udział TPO w megakariopoezie przypomina w pewnym sensie sytuację spotykaną w linii czerwonekrwinkowej, gdzie erytropoetyna aktywuje głównie proliferację i dojrzewanie bardziej już dojrzałych komórek linii erytropoetycznej.

Oceniając wpływ TPO na megakariopoezę wysunięto hipotezę, że istnieją dwie populacje wczesnych progenitorów megakariocytowych [26]. Jedna z nich miała się charakteryzować większym potencjałem proliferacyjnym i być bardziej wrażliwa na stymulację IL3, druga zaś potencjałem mniejszym i być bardziej zależna od działania trombopoetyny. Wydaje się jednak, że te opisane populacje komórek progenitoro-



Rys. 1. Uproszczony schemat regulacji ludzkiej megakariopoezy – biologiczna aktywność TPO zwiększa się wraz z dojrzewaniem komórek linii megakariocytowej



Rys. 2. Ludzka kolonia megakariocytowa rosnąca w skrzepie osoczowym po stymulacji samą ludzką rekombinowaną trombopoetyną (rhTpo) w dawce 50 ng/ml; strzałką zaznaczono megakariocyt uwalniający w wyniku fragmentacji cytoplazmy krwinki płytkowe

wych są faktycznie komórkami należącymi do tego samego przedziału komórek megakariopoetycznych a różniące się tylko stopniem dojrzałości i tym samym przejawiają różną wrażliwość na TPO.

Nie ulega wątpliwości, że trombopoetyna jest niezbędna do pełnego różnicowania i dojrzewania komórek linii megakariopoetycznej. Hodowle CFU-Meg stymulowane samym tylko KL i IL-3 bez obecności w medium hodowlanym rekombinowanej TPO lub surowicy aplastycznej (zawierającej TPO) charakteryzują się brakiem dojrzałych morfologicznie megakariocytów [26,69].

Ostatnio pojawiły się doniesienia o ochronnej roli TPO u zwierząt po subletalnym napromienieniu. TPO podawana napromienionym zwierzętom znacznie skraca okres trwania trombocytopenii [58].

Opisane powyżej dane doświadczalne potwierdzają, że TPO jest rzeczywiście od dawna poszukiwanym czynnikiem regulującym specyficznie trombopoezę.

ROLA OSI *c-mpl* - TPO W FIZJOLOGII I PATOLOGII CZŁOWIEKA

Implikacje kliniczne

Jak już wspomniano za pomocą techniki hybrydyzacji *in situ* wykazano, że ludzki gen kodujący ligand dla *c-mpl* znajduje się na długim ramieniu chromosomu trzeciego w locus 27 (3q27) [15]. Mechanizmy regulujące ekspresję genu kodującego trombopoetynę nie są jeszcze dokładnie poznane. Sugeruje się, że jego ekspresja, zależy od tempa wiązania i degradacji powyższej cytokiny w ustroju [33].

Opisano, że w przebiegu niektórych białaczek dochodzi do zaburzeń strukturalnych ramienia długiego chromosomu 3. Przypadki te mogą się przejawiać zaburzeniami trombopojezy [16,39,62]. U osób tych stwierdza się niewielką trombocytopenię oraz podwyższony poziom krążącej trombopoetyny we krwi. Warto nadmienić, że w pobliżu genu kodującego TPO znajdują się niektóre onkogeny m.in: gen BCL6 kodujący czynnik transkrypcyjny o budowie "palca cynkowego" [23,48].

Udział osi *c-mpl* - TPO sugerowany jest w patogenezie niektórych typów białaczek (np. podtyp M 6 ostrej białaczki szpikowej w klasyfikacji FAB). Wykazano ponadto, że TPO stymuluje wzrost niektórych białaczkowych linii komórkowych mających ekspresję receptora *c-mpl* [37].

Nie ulega wątpliwości, że możliwości klinicznego zastosowania TPO w leczeniu różnych form małopłytkowości budzą zrozumiałe nadzieje. Przeprowadzono już pierwsze skuteczne próby doświadczalne podawania TPO zwierzętom z uszkodzonym szpikiem kostnym. Napromienione zwierzęta wykazywały skrócony okres trwania trombocytopenii oraz mniejszy spadek liczby płytek krwi w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi [13]. Warto nadmienić, że z drugiej strony brak jest jeszcze wyczerpujących danych doświadczalnych dotyczących toksyczności oraz skutków ubocznych podawania *in vivo* rekombinowanej TPO.

TABELA 1. Wpływ TPO na wzrost klonogeny ludzkich CFU-GM stymulowanych IL-3 (20 j/ml)+GM-CSF (5 ng/ml) oraz BFU-E stymulowanych EpO (5 j/ml + KL 100 ng/ml); komórki CD34+ (10^4 /ml) hodowano w pożywce bezsurowiczej zawierającej metylocelulozę (n = 8)

Dawka TPO (ng/ml)	CFU-GM ($\Sigma \pm$ SD)	BFU-E ($\Sigma \pm$ SD)
0	216 \pm 62	164 \pm 32
10	234 \pm 75	156 \pm 38
50	202 \pm 89	172 \pm 28

Opracowania wymagają ponadto odpowiednie protokoły stosowania klinicznego trombopoetyny. Może ona być stosowana sama lub w połączeniu z innymi cytokinami szczególnie tymi, które stymulują wczesne etapy megakariopoezy (KL, IL-3, IL-6). Ciekawą alternatywą może być również wyprodukowanie za pomocą technik biologii molekularnej tzw. białka łączonego (*ang. fusion protein*) będącego dimerem TPO, np. z IL-3 lub IL-6. Może się bowiem okazać, że TPO w takiej postaci będzie miała większą aktywność biologiczną na komórki układu megakariopoetycznego.

Trombopoetyna może być również wykorzystana w próbach namnażania komórek ukierunkowanych układu megakariocytowego, czyli CFU-Meg *in vitro* poza ustrojem. Nad zagadnieniem tym pracuje obecnie nasz zespół. Uważamy, że poddanie, pobranych do przeszczepu, komórek szpiku kostnego, krótkotrwałej ekspansji w kierunku megakariopoetycznym, może skrócić okres trwania małopłytkowości po zabiegu. Wierzmy, że postępując w ten sposób będzie można wzbogacić przeszczepiony szpik w funkcjonalnie aktywne komórki klonogenne układu płytkotwórczego, co pozwoli w końcowym etapie ograniczyć liczbę przetaczanych porcji masy płytkowej po przeszczepie.

Podsumowując, TPO na pewno znajdzie szerokie zastosowanie w klinice w leczeniu małopłytkowości, minimalizując liczne efekty uboczne związane z dotychczasowymi formami terapii jak np. podawanie masy płytkowej. Cytokina ta stosowana również w odpowiednich modelach doświadczalnych przybliży nas do poznania mechanizmów regulujących powstawanie megakariocytów i płytek krwi.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AVRAHAM H, ELLIS HM, JHUN SH, RAJA S, CHALASANI D, AVRAHAM S. Tyrosine kinases in megakaryocytopoiesis. *Stem cells* 1995; 13: 380–392.
- [2] BALLMAIER M, BOGENBERGER J, SHUTTER J, WELCHER A, TIDOW N, KONIG A, WILKEN A, SCHWEINITZ DV, HADAM M, WELTE K. Analysis of expression of megacaryocyte growth and development factor mRNA in various human normal and malignant tissues. *Blood* 1994;84, abstr, Suppl 1: 241a.
- [3] BARTLEY TD, BOGENBERGER J, HUNT P, LI Y-S, LU HS, CHANG M-S, SAMAL B, NICHOL L, SWIFT S, JOHNSON MJ, HSU R-Y, PARKER VP, SUGGS S, SKRINE JD, MEREWETHER LA, CLOGSTON C, HSU E, HOKOM MM, HORNKOHL A, CHOI E, PANGELINAN M, SUN Y, MAR V, McNINCH J, SIMONET L, JACOBSEN F, XIE

- C, SHUTTER J, CHUTE H, BASU R, SELANDER L, TROLLINGER D, SIEU L, PADILLA D, TRAIL G, ELLIOTT G, IZUMI R, OVEY T, CROUSE J, GARCIA A, XU W, DEL CASTILLO JD, BIRON J, COLE S, HU C-T, PACIFICI R, PONTING I, SARIS C, WEN D, YUNG YP, LIN H, BOSSELMAN RA. Identification and cloning of a megacaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994; **77**:117–1124.
- [4] BENIT L, COURTOIS G, CHARON M, VARLET P, DUSANTER-FOURT I, GISSEL-BRECHT S. Characterization of Mpl cytoplasmic domain sequences required for myeloproductive leukemia virus pathogenicity. *J Virology* 1994; **68**: 5270–5276.
- [5] BERARDI AC, WANG A, LEVINE JD, LOPEZ P, SCADDEN DT. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* 1995; **267**: 104–108.
- [6] CHOI ES, HOKOM M, BARTLEY T, LI Y-S, OHASHI H, KATO T, NICHOL JL, SKRINE J, KNUDTEN A, CHEN J, HORNKOHL A, GRAMPP G, LEEMAN L, COLE S, TRAIL G, HUNT P. Recombinant human megacaryocyte growth and development factor (rHu MGDF), a ligand for c-Mpl, produces functional human platelets *in vitro*. *Stem Cells* 1995; **13**: 317–322.
- [7] CHOI ES, NICHOL JL, HOKOM MM. Platelets generated *in vitro* from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 1995; **85**: 402–413.
- [8] DE MAEYER E, DE MAEYER-GUIGNARD J. Interferons. The Cytokine Handbook 1994; **2nd ed.** 265–288.
- [9] DE SAVAUGE FJ, HASS PE, SPENCER SD, MALLOY BE, GURNEY AL, SPENCER SA, DARBONNE WC, HENZEL WJ, WONG SC, KUANG W-J, OLE KJ, HULTGREN B, SOLBERG JR LA, GOEDDEL DV, EATON DL. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994; **369**: 533–538.
- [10] DEBILIN, MASSE J-M, KATZ A, GUICHARD J, BRETON-GORIOUS J, VAINCHENKER W. Effects of the recombinant hematopoietic growth factors interleukin-3, interleukin-6, stem cell factor, and leukemia inhibitory factor on the megakaryocytic differentiation of CD34+ cells. *Blood* 1993; **82**, No 1: 84–95.
- [11] DEBILI N, WENDLING F, COSMAN D, TITEUX M, FLORINDO CH, FOURT ID, SCHOOLEY K, METHIA N, CHARON M, NADOR R, BETTAIEB A, VAINCHENKER W. The Mpl Receptor Is Expressed in the Megakaryocytic Lineage From Late Progenitors to Platelets. *Blood* 1995; **85**, No 2: 391–401.
- [12] DRACHMAN JG, GRIFFIN JD, KAUSHANSKY K. The c-Mpl Ligand (Thrombopoietin) Stimulates Tyrosine Phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. *J Biol Chem* 1995; **270**, No 10: 4979–4982.
- [13] FARESE AM, HUNT P, GRAB LB, MALTIC DR, MACVITTIE TJ. Modulation of megakaryocytopoiesis in normal and sublethally irradiated nonhuman primates by recombinant human megacaryocyte growth and development factor (r-HuMGDF). American Society for Transplantation Annual Meeting, Keystone, January 26–28 1995.
- [14] FIBBE WE, HEEMSKERK DPM, LATERVEER L, PRUIJT JFM, FOSTER D, KAUSHANSKY K, WILLEMZER R. Accelerated reconstitution of platelets and erythrocytes following syngeneic transplantation of bone marrow cells derived from thrombopoietin pretreated donor mice. *Exp Hematol* 1995; **23**, No 8: 823.
- [15] FOSTER DC, SPRECHER CA, GRANT FJ, KRAMER JM, KUIJPER JL, HOLLY RD, WHITMORE TE, HEIPEL MD, BELL LA, CHING AFT, McGRANE V, HARTCH, O*HARA P, LOK S. Human thrombopoietin: Gene structure, cDNA sequence, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**, 13023–13027.
- [16] GASCOYNE RD, NOBLE MC, KLOUSEK DK. Translocation t(3;3) (q21;q26) and thrombocytosis [letter]. *Canc Gen Cytogen* 1986; **22** (4): 365.
- [17] GEWIRTZ AM. Human megakaryocytopoiesis. *Semin Hematol* 1986; **23**: 27–42.
- [18] GROOPMAN JE. Capturing the unicorn. *Current Biology* 1994; **4**, No 19: 1016–1018.

- [19] GURNEY AL, CARVER-MOORE K, DE SAVAUGE FJ, MOORE MW. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science* 1994; **265**: 1445–1447.
- [20] GURNEY AL, KUANG W-J, XIE M-H, MALLOY BE, EATON DL, DE SAVAUGE FJ. Genomic structure, chromosomal localization, and conserved alternative splice forms of thrombopoietin. *Blood* 1995; **85**, No 4: 981–988.
- [21] HANNUN C, CULPEPPER J, CAMPBELL D, McCLANAHAN T, ZURAWSKI S, BAZAN JF, KASTELEIN K, HUDAK S, WAGNER J, MATTSON J, LUH J, DUDA G, MARTINA N, PETERSON D, MENON S, SHANAFELT A, MUENCH M, KELNER G, NAMIKAWA R, RENNICK D, RONCAROLO M-G, ZIOTNIK A, ROSNET O, DUBRELLI P, BIRNBAUM D, LEE F. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of hematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 1994; **368**: 643–648.
- [22] HILL R, LEVIN J. Partial purification of thrombopoietin using lectin chromatography. *Exp Hematol* 1986; **14**: 752–759.
- [23] HORSMAN DE, McNEIL BK, ANDERSON M, SHENKIER T, GASCOYNE RD. Frequent association of t(3;14) or variant with other lymphoma - specific translocations. *Brit J Haem* 1995; **89** (3): 569–575.
- [24] HUNT P, LI Y-S, NICHOL JL, HOKOM MM, BOGENBERGER JM, SWIFT SE, SKRINE JD, HORNKOHL AC, LU H, CLOGSTON CH, MEREWETHER LA, JOHNSON MJ, PARKER V, KNUDTEN A, FARESE A, HSU RY, GARCIA A, STEAD R, BOSSELMAN RA, BARTLEY TD. Purification and biologic characterization of plasma-derived megakaryocyte growth and development factor. *Blood* 1995; **86**, No 2: 540–547.
- [25] KALMAZ GD, McDONALD TP. Assay for thrombopoietin: a new, more sensitive method based on measurement of the small acetylcholinesterase-positive cell. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982; **170**: 213–219.
- [26] KAUSHANSKY K, BROUDY VC, LIN N, JORGENSEN MJ, McCARTY J, FOX N, ZUCKER-FRANKLIN D, LOFTON-DAY C. Thrombopoietin, the Mpl ligand, is essential for full megakaryocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 3234–3238.
- [27] KAUSHANSKY K, LOK S, HOLLY RD, BROUDY VC, LIN N, BAILEY MC, FORSTROM JW, BUDDLE MM, OORT PJ, HAGEN FS, ROTH GJ, PAPAYANNOPOULOU T, FOSTER DC. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994; **363**: 568–571.
- [28] KAUSHANSKY K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* 1995; **86**, No 2: 419–431.
- [29] KELEMAN E, CSERHATI I, TANOS B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythemic sera. *Acta Haematol* 1958; **20**: 350–355.
- [30] KELEMAN E. Specific thrombopoietin cloned and sequenced - with personal retrospect and clinical prospects. *Leukemia* 1995; **9**: 1–2.
- [31] KELEMAN E. Physiopathology and therapy of human blood diseases. Oxford: Pergamon 1969; **93-99**: 508, 568–581.
- [32] KUTER DJ, BEELER DL, ROSENBERG RD. The purification of megapoietin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91** (23): 11104–11108.
- [33] KUTER DJ, ROSENBERG RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* 1995; **85**, No 10: 2720–2730.
- [34] LAYTON MJ, CROSS BA, METCALF D, WARD LD, SIMPSON RJ, NICOLA NA. A major binding protein for leukemia inhibitory factor in normal mouse serum: identification as a soluble form of the cellular receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89** (18): 8616–8620.
- [35] LOK S, FOSTER DC. The structure, biology and potential therapeutic applications of recombinant thrombopoietin. *Stem Cells* 1994; **12**: 586–598.

- [36] LOK S, KAUSHANSKY K, HOLLY RD, KUIJPER JL, LOFTON-DAY CE, OORT PJ, GRANT FJ, HEIPEL MD, BURHEAD SK, KRAMER JM, BELL LA, SPRECHER CA, BLUMBERG H, JOHNSON R, PRUNKARD D, CHING AFT, MATHEWS SL, BAILEY MC, FORSTROM JW, BUDDLE MM, OSBORN SG, EVANS SJ, SHEPPARD PO, PRESNELL SR, O'HARA PJ, FREDRICK SH, ROTH GJ, FOSTER. DC. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production *in vivo*. *Nature* 1994; **363**: 565-568
- [37] MATSUMURA I, KANAKURA Y, KATO T, IKEDA H, ISHIKAWA J, HORIKAWA Y, HASHIMOTO K, MURIYAMA Y, TSUJIMURA T, NISHIURA T, MIYAZAKI H, MATSUZAWA Y. Growth response of acute myeloblastic leukemia cells to recombinant human thrombopoietin. *Blood* 1995; **86**, No 2: 703-709.
- [38] McDONALD TP. A comparison of platelet size, platelet count and platelet S35 incorporation as assays for thrombopoietin. *Br J Haematol* 1976; **34**: 257-267.
- [39] MECCUCI C, VAN DEN BERGHE H. Thrombocytosis and inv (3)(q21q26) [letter]. *Blood* 1983; **61**(5): 1027.
- [40] METCALF D. Thrombopoietin – at last. *Nature* 1994; **369**: 519-520.
- [41] METHIA N, LOUACHE F, VAINCHENKER W, WENDLING F. Oligodeoxynucleotides antisense to the proto-oncogene c-mpl specifically inhibit *in vitro* megakaryocytopoiesis. *Blood* 1993; **82**, No 5: 1395-1401.
- [42] MIGNOTTE V, VIGON I, BOUCHER DE CREVECOEUR E, ROMEO PH, LEMARCHANDEL V, CHRETIEN S. The structure and transcription of the human c-Mpl gene (MPL). *Genomics* 1994; **20**: 5-12.
- [43] MIYAKAWA Y, ODA A, DRUKER BJ, HANDA M, KATO T, MIYAZAKI H, SHIMOSAKA A, IKEDA Y. Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation of Jak2 and shc in human blood platelets. *Exp Hematol* 1995; **23**, No 8: 830.
- [44] MIYAZAKI H, KATO T, OGAMI K, IWAMATSU A, SHIMADA Y, SOUMA Y, AKAHORI H, HORIE K, KOKUBO A, KUDO Y, MAEDA E, KAWAMURA K, SUDO T. Isolation and cloning of a novel human thrombopoietic factor. *Exp Hematol* 1994; **22**: 838.
- [45] MORELLA KK, BRUNO E, KUMAKI S, LAI CH-F, FU J, WANG H-M, MURRAY L, HOFFMAN R, TIMOUR M, BENIT L, GISSELBRECHT S, ZHUANG H, WOJCHOWSKI DM, BAUMANN H, GEARING DP. Signal transduction by the receptors for thrombopoietin (c-mpl) and interleukin-3 in hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Blood* 1995; **86**, No 2: 557-571.
- [46] NARHI LO, ARAKAWA T, AOKI KH, ELMORE R, ROHDE MF, BOONE T, STRICKLAND TW. The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin. *J Biol Chem* 1991; **266**: 23022-23026.
- [47] ODELL TJ, McDONALD TP, DETWILER TC. Stimulation of platelet production by serum of platelet-depleted rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961; **108**: 428-431.
- [48] OTSUKI T, YANO T, CLARK HM, BASTARD C, KERCKAERAT JP, JAFFE ES, RAFFELD M. Analysis of laz3 (bcl-6) status in b-cell non-hodgkin's lymphomas: results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences. *Blood* 1995; **85**(10): 2877-2884.
- [49] PENINGTON DG. Isotope bioassay for "thrombopoietin". *Br Med J* 1970; **1**: 606-608.
- [50] PETERS WP. The myeloid colony-stimulating factors: Introduction and overview. *Semin Hematol* 1991; **28**: 1-5.
- [51] RATAJCZAK J, KUCZYŃSKI W, RATAJCZAK MZ. Stymulacja ludzkiej megakariopoezy *in vitro* za pomocą różnych czynników wzrostowych. Potencjalne wnioski kliniczne. *Pol Arch Med Wewn* 1994; **91**: 356-362.
- [52] ROBINSON BE, McGRAFT HE, QUESENBERY PJ. Recombinant murine granulocyte macrophage colony stimulating factor has megacaryocyte colony stimulating activity and

- augments megacaryocyte colony stimulation by interleukin-3. *J Clin Invest* 1987;**79**: 1648–1652.
- [53] SATTLER M, DURSTIN MA, FRANK DA, OKUDA K, KAUSHANSKY K, SALGIA R, GRIFFIN JD. The thrombopoietin receptor c-MPL activates JAK2 and TYK2 tyrosine kinases. *Exp Hematol* 1995; **23**:1040–1048.
- [54] SHICK BP. Clinical Implications of Basic Research (Hope for treatment of thrombocytopenia). *N Engl J Med* 1994;**331**,No 13:875–876.
- [55] SKODA RC, SELDIN DC, CHIANG M-K, PEICHEL CL, VOGT TF, LEDER P. Murine c-mpl: a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily that transduces a proliferative signal. *EMBO J* 1993; **12**: 2645–2653.
- [56] SOHMA Y, AKAHORI H, SEKI N, HORI T, OGAMI K, KATO T, SHIMADA Y, KAWAMURA K, MIYAZAKI H. Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Letters* 1994; **353**: 57–61.
- [57] SOUYRI M, VIGON I, PENCIOLEUI JF, HEARD JM, TAMBOURIN P, WENDLING F. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hemapoietic progenitors. *Cell* 1990; **63**(6): 1137–1147.
- [58] SPRUGEL KH, HUMES JM, GROSSMAN A, REN HP, KAUSHANSKY K. Recombinant thrombopoietin stimulates rapid platelet recovery in thrombocytopenic mice. *Blood* 1994; **84**: 242a.
- [59] TAKEUCHI M, TAKASAKI S, SHIMADA M, KOBATA A. Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese Hamster Ovary Cells. *J Biol Chem* 1990; **265** (21): 12127–12130.
- [60] TAYRIEN G, ROSENBERG RD. Purification and properties of a megacaryocyte stimulatory factor present both in the serum conditioned medium of human embryonic kidney cells and in thrombocytopenic plasma. *J Biol Chem* 1987; **262**: 3262–3268.
- [61] TORTOLANI PJ, JOHNSTON JA, BACON CHM, McVICAR DW, SHIMOSAKA A, LINNEKIN D, LONGO DL, O*SHEA JJ. Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of the janus kinase, JAK2. *Blood* 1995; **85**, No 12: 3444–3451.
- [62] TURCHINI MF, TRAVADE P, DE LAROCQUE A, GENEIX A, PERISSEL B, MALET P. Translocation t(3;20) associated with thrombocythemia in Ph-positive CML. *Can Gen Cytogen* 1986; **20** (1-2): 1–4.
- [63] VANNUCCHI AM, GROSSI A, RAFANELLI A, FERRINI PR, RAMPONI G. Partial purification and biochemical characterization of human plasma thrombopoietin. *Leukemia* 1988; **2**: 236–240.
- [64] VIGON I, FLORINDOCH, FICHELSON S, GUENET JL, MARIE-GENEVIVE M, SOUYRI M, COSMAN D, GISSELBRECHT S. Characterization of the murine Mpl proto-oncogene, a member of the hematopoietic cytokine receptor family: molecular cloning, chromosomal location and evidence for a function in cell growth. *Oncogene* 1993; **8**: 2607–2615.
- [65] VIGON I, MORNON J-P, COCAULT L, MITJAVILA M-T, TAMBOURIN P, GISSELBRECHT S, SOUYRI M. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: Identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1992; **89**: 5640–5644.
- [66] WENDLING F, MARASKOVSKY E, DEBILI N, FLORINDO CH, TEEPE M, TITEUX M, MATHLA N, BRETON-GORIOUS J, COSMAN D, VAINCHENKER W. c-Mpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* 1994; **363**: 571–574.
- [67] WILLIAMS DE, PARK CS. Hematopoietic effects of a granulocyte-macrophage colony stimulating factor interleukin-3 - fusion protein. *Cancer* 1991; **76**: 2705–2707.
- [68] YONEMURA Y, KAWAKITA M, MASUDA T, FUJIMOTO K, KATOK, TAKATSUKI K. Synergistic effects on interleukin-3 and interleukin-11 on murine megakaryopoiesis in serum-free culture. *Exp Hematol* 1992; **20**: 1011–1016.

- [69] ZEIGLER FC, DE SAVAUGE F, WIDMER R, KELLER GA, DONAHUE CH, SHREIBER RD, MALLOY B, HASS P, EATON D, MATTHEWS W. *In vitro* megakaryocytopoietic and thrombopoietic activity of c-mpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1994; **84**, No 12: 4045–4052.

Otrzymano: 05.10.1995 r.

Przyjęto: 12.03.1996 r.

*Adres autora: Zakład Patologii Komórki PAM
Szczecin, ul. Powstańców Wlkp. 72*

ELEKTROFOREZA POJEDYNCZYCH KOMÓREK (*COMET ASSAY*) – UŻYTECZNA TECHNIKA BADANIA USZKODZEŃ DNA

THE SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS – A USEFUL TECHNIQUE FOR DNA DAMAGE STUDIES

Paweł JAŁOSZYŃSKI, Maciej KUJAWSKI, Krzysztof SZYFTER

Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Streszczenie: Elektroforeza pojedynczych komórek (ang. *single cell gel electrophoresis* – SCGE), znana również pod nazwą *comet assay* została wprowadzona przez Östlinga i Johanssona [1984] i rozwinięta później przez Singha [1988] jako szybka i czuła technika ilościowej analizy uszkodzeń DNA i ich naprawy w indywidualnych komórkach eukariotycznych. Metoda ta pozwala na detekcję jedno- i dwuniciowych pęknięć cząsteczki DNA. W ostatnich latach obserwuje się wzrastające zainteresowanie tą techniką. Wszechstronność zastosowań i cechy praktyczne SCGE czynią tę metodę użytecznym narzędziem w badaniach procesów naprawczych, genotoksyczności i biomonitoringu populacyjnego.

Słowa kluczowe: *comet assay*, elektroforeza pojedynczych komórek, pęknięcia DNA, naprawa DNA, genotoksyczność

Summary: Single cell gel electrophoresis assay – SCGE, known also as *comet assay* was introduced by Östling and Johanson [1984] and later was developed by Singh [1988] for a rapid and sensitive quantitative analysis of DNA damage and repair in individual eukaryotic cells. The method is specific for detection of single and double DNA strand breaks. The interest in the assay has grown markedly in the last few years. The versatility of applications and the practical features of SCGE render it useful tool for DNA repair studies, genotoxicity testing and large-scale biomonitoring of human populations.

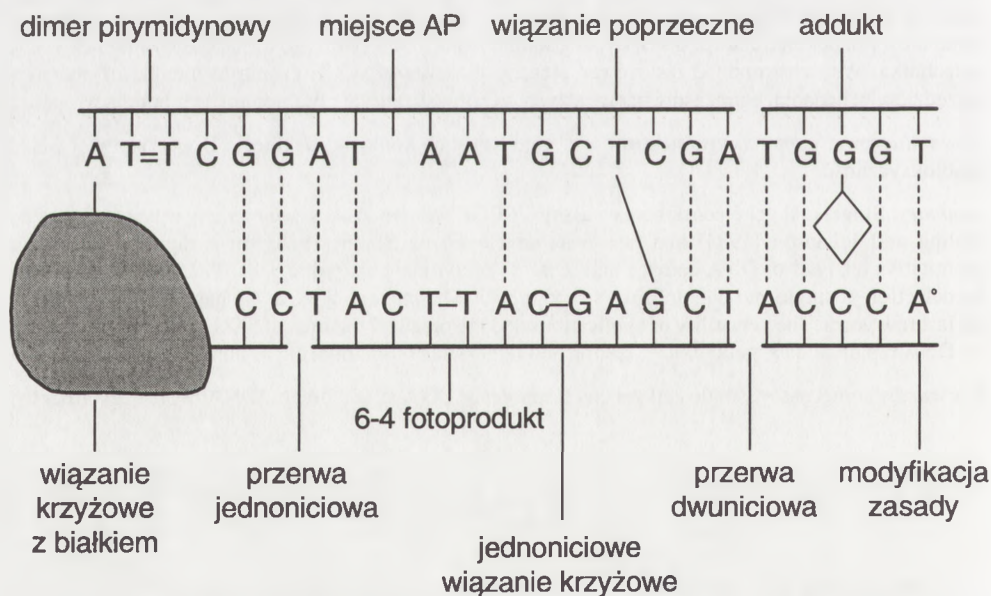
Key words: comet assay, single cell gel electrophoresis, DNA strand breaks, DNA repair, genotoxicity

1. WSTĘP

Uszkodzenia w cząsteczce DNA pojawiają się zarówno na skutek ekspozycji organizmu na zewnętrzne czynniki wchodzące w interakcje z materiałem genetycznym, jak i w wyniku naturalnych (fizjologicznych) procesów zachodzących

wewnątrz komórek. Wynikiem działania takich czynników mogą być jedno- i dwuniciowe pęknięcia, wiązania krzyżowe DNA-DNA i DNA-białko, dimery pirymidynowe i szerokie spektrum modyfikacji indywidualnych nukleotydów. Te ostatnie obejmują proste alkilacje, halogenacje, hydroksylacje, przyłączenie objętościowych adduktów, otwarcia pierścienia, utratę zasady (powstanie miejsc apurynowych i apirymidynowych) itp. (rys. 1). Większość uszkodzeń usuwana jest poprzez naprawę przez wycinanie. Ponieważ jednym z pierwszych etapów tego mechanizmu jest nacięcie nici DNA na obszarze objętym uszkodzeniem (w najprostszym przypadku wycięcie samej zasady), to efektem jego działania jest pojawianie się wtórnych przerw w niciach DNA lub miejsc potencjalnie mogących ulec przekształceniu w przerwy (miejsca AP). Stwierdzana w komórce liczba przerw jedno- i dwuniciowych jest więc wynikiem dynamicznej równowagi między mechanizmami uszkadzającymi a naprawczymi.

Pojawieniu się pęknięć w niciach kwasu nukleinowego towarzyszy fragmentacja jego cząsteczki. Różne metody mierzą stopień tej fragmentacji wykorzystując jej konsekwencje w postaci zmian właściwości fizykochemicznych DNA. Dla detekcji jednoniciowych pęknięć konieczna jest denaturacja i rozwinięcie łańcucha DNA, co realizuje się w warunkach wysokiego pH. Parametrami i procesami mierzonymi bezpośrednio mogą być: szybkość migracji DNA przez filtry, tempo rozwijania się dwuniciowego DNA w zasadowym roztworze, stopień koprecypitacji DNA z



Rys. 1. Podstawowe typy uszkodzeń DNA

białkami (DNA pofragmentowany pozostaje w supernatancie nad precypitatem), średnia masa cząsteczkowa fragmentów DNA czy fragmentacja DNA określana densytometrycznie po elektroforezie żelowej. Odpowiada to szeregowi technik, kolejno: alkalicznej elucji [17], alkalicznemu rozwijaniu [2,31] (z wariantem w postaci FADU – fluorescencyjnej analizy rozwijania DNA [6,29]), alkalicznej precypitacji [21], metodom sedymentacyjnym [10,16] i elektroforetycznym [36]. Możliwa jest także immunochemiczna ocena poziomu pęknięć DNA poprzez zastosowanie skoniugowanych z fluorochromami przeciwciał monoklonalnych przeciw pojedynczoniciowemu DNA [40,41].

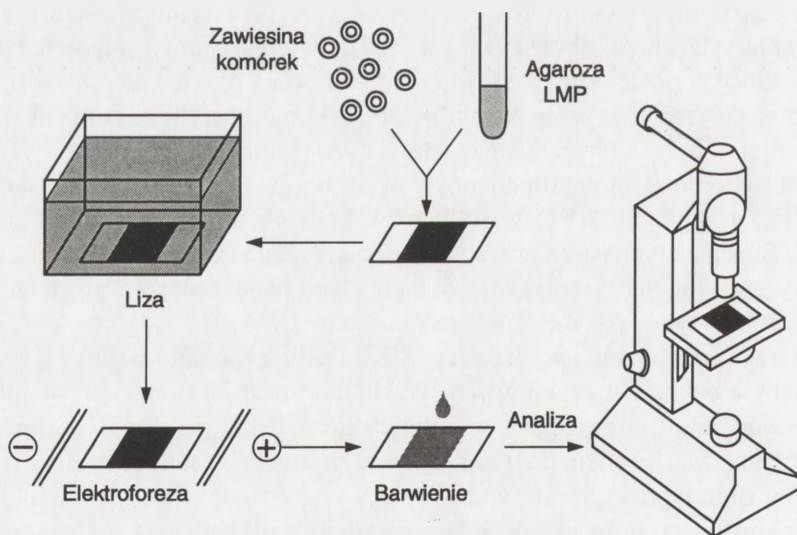
2. PODSTAWY TEORETYCZNE I METODOLOGIA

Elektroforeza pojedynczych komórek (ang. *single cell gel electrophoresis* – SCGE, nazwa funkcjonująca równoległe do *comet assay* oraz *microgel electrophoresis assay*) rozwinęła się na bazie doświadczeń Rydberga i Johansona, od których pochodzą pierwsze próby detekcji pęknięć DNA w indywidualnych komórkach [32]. Komórki zatopione w żelu były lizowane w warunkach alkalicznych, co umożliwiała częściowe rozwinięcie DNA. Po neutralizacji preparaty barwiono oranżem akrydyny (AO) i pod mikroskopem analizowano stosunek fluorescencji zielonej (reprezentującej dwuniciowy DNA) do czerwonej (jednociowy DNA). Technikę tę, znaną jako *halo assay*, zmodyfikowali w 1984 r. Östling i Johanson wprowadzając dodatkowy etap krótkiej elektroforezy, co powodowało, po wizualizacji żelu, pojawienie się charakterystycznego obrazu "komet" [27]. "Głowy" komet odpowiadały miejscom, w których przed lizą znajdowały się komórki, "ogony" natomiast pojawiały się tylko w przypadku występowania w DNA komórkowym uszkodzeń w postaci pęknięć nici i były interpretowane jako DNA uwolnione z "głowy". Östling i Johanson za pomocą fotometru dokonywali pomiarów fluorescencji centrum "głów" komet (F_o) i "ogonów" (F_x) w stałych, wybranych arbitralnie odległościach od "głowy". Stosunek tych parametrów (F_x/F_o) odzwierciedla ilość DNA, jaka przeszła z "głowy" do "ogona" i wykazuje dodatnią korelację z dawką promieniowania, które zostało użyte jako czynnik uszkadzający DNA. Ze względu na neutralne warunki lizy (prowadzonej w roztworze SDS) Östling i Johanson obserwowali efekt wynikający z pęknięć dwuniciowych. W kilka lat później rozwinęła się alkaliczna wersja *comet assay*, pozwalająca na pomiary sumy pęknięć jedno- i dwuniciowych [34]. Różnicę w stosunku do propozycji wyjściowych stanowiło pH lizy i elektroforezy oraz wprowadzenie dodatkowego etapu rozwijania (denaturacji) DNA przed elektroforezą, prowadzonego bezpośrednio w alkalicznym roztworze elektroforetycznym.

Przyjmuje się, że za powstawanie "komet" odpowiedzialne są dwa zjawiska – migracja wolnych fragmentów nici oraz rozciąganie łańcuchów zakotwiczonych jednym końcem w "głowie" komety, lub nawet całych, zrelaksowanych pętli. Przy niskich poziomach uszkodzeń DNA formowanie się komet jest głównie wynikiem tego drugiego zjawiska. W miarę narastania pęknięć nici pojawia się coraz więcej wolnych fragmentów DNA migrujących swobodnie. W przypadku procedury neutralnej za szybkość przemieszczania się DNA w żelu agarozowym odpowiedzialne są dwuniciowe przerwy, które w wersji alkalicznej ulegają transformacji w pęknięcia jednoniciowe.

Wzrastające zainteresowanie techniką elektroforezy pojedynczych komórek doprowadziło do opracowania szeregu wariantów procedury podstawowej. Wersja alkaliczna, ze względu na możliwość detekcji przerw jednoniciowych jest obecnie powszechnie stosowana. Ogólny schemat postępowania przedstawiono na rysunku 2.

Szczegółowa procedura przedstawia się następująco. Żel może stanowić jedną warstwę 0,5–0,75% agarozy o niskim punkcie topnienia (LMPA) zmieszanej z zawiesiną komórek, rozprowadzoną na powierzchni szlifowanego lub trawionego szkiełka mikroskopowego [22,25,27,28,35]. Częściej stosowane są żełe dwu- lub trójwarstwowe, przy czym pierwsza z warstw to 0,5% agarozu o normalnym punkcie topnienia (NMPA), druga warstwa zawierająca komórki składa się z 0,5–0,7% agarozy LMPA [9]. Ewentualna warstwa trzecia to również 0,5–0,7% LMPA [3,4,5,34,39]. Warstwy wylewa się kolejno, jedna na drugą, po uprzednim zastygnięciu poprzedniej



Rys. 2. Schemat procedury comet assay

przykrytej szkiełkiem nakrywkowym, zdejmowanym przed wylaniem następnej warstwy. Lizę neutralną przeprowadza się głównie przy użyciu 0,5–2,5% soli sodowej siarczanu dodecylu (SDS) [24,27,28]. Lizę alkaliczną wykonuje się w obecności wysokich stężeń NaCl w połączeniu z 1% Trytonu X-100 [9,15] i/lub 0,5–1% soli sodowej N-lauroiliosarkozyny (SLS) [1,4,5,39,42]. W celu maksymalnego usunięcia białek stosowano również trawienie proteinazą K [35]. Czas lizy wynosi od kilkudziesięciu minut do kilkudziesięciu godzin. Najbardziej uniwersalny czas to 1 h w temp. +4°C. Etap alkalicznej denaturacji obejmuje przeważnie 20–60-minutową kąpiel w roztworze elektroforetycznym, którego podstawowymi (i często jedynymi) składnikami są NaOH i EDTA [7,8,9]. Czas i warunki prądowe elektroforezy są dość zmienne w zakresie od 0,55 [23] do 5 V/cm [28]. Najczęściej spotykane procedury opisują elektroforezę przy 25 V, 300 mA przez 0,5 h [9]. Były również próby zastosowania elektroforezy w polu pulsującym [22]. Wizualizacja żeli odbywa się za pomocą rozmaitych barwników fluorescencyjnych wiążących się z DNA, takich jak bromek etydyny [1,3,15,35,39,42], jodek propidyny [23], oranż akrydyny [27,28], Hoechst 33342 [22], DAPI [9]. Wykorzystywano również autoradiografię po inkorporacji [¹⁴C]-tymidyny do DNA komórek w hodowli *in vitro* [27] lub przeciwciała skierowane przeciw bromodezoksyurydynie koniugowane z izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) po ekspozycji komórek na BrdUrd [22].

Wpływ warunków poszczególnych etapów procedury na ostateczny wynik, przede wszystkim na zakres czułości metody był przedmiotem badań porównawczych [22,42]. Detekcji niskich poziomów uszkodzeń sprzyja wydłużenie czasów alkalicznego rozwijania i elektroforezy bądź zwiększenie napięcia (w określonych granicach). Badano również wpływ barwników o różnych mechanizmach wiązania się z DNA (interkalujących i wiążących się z powierzchnią cząsteczki), nie zważając istotnego znaczenia typu fluorochromu na czułość analizy [22].

Ponieważ przedmiotem analizy techniką *comet assay* są pęknięcia DNA w indywidualnych komórkach, teoretycznie możliwa jest detekcja uszkodzeń w jednej komórce. W praktyce, ze względów statystycznych poddaje się testowi kilkadziesiąt do kilkuset tysięcy komórek (w przypadku pracy z limfocytami oznacza to ok. 10 l krwi na jeden żel). Jedynym czynnikiem ograniczającym przydatność testu w przypadku tkanek litych jest konieczność rozbicia ich na zawiesinę komórek, co jak wykazano może być źródłem uszkodzeń DNA [35]. Z tych powodów najczęstszym obiektem badań tego typu są limfocyty krwi obwodowej [4,5,7,8,13,33], niemniej lista rodzajów komórek włączonych dotychczas w analizę uszkodzeń DNA metodą *comet assay* jest bardzo obszerna. Obejmuje ona normalne komórki ludzkie, komórki różnych organów szczurów, myszy, psów, owiec, linie komórek ludzkich i zwierzęcych oraz zarówno ludzkie, jak i zwierzęce komórki nowotworowe pobierane np. metodą biopsji. Obszerne, tabelaryczne zestawienia danych dotyczących opisywanych w literaturze tkanek, komórek oraz czynników uszkadzających DNA

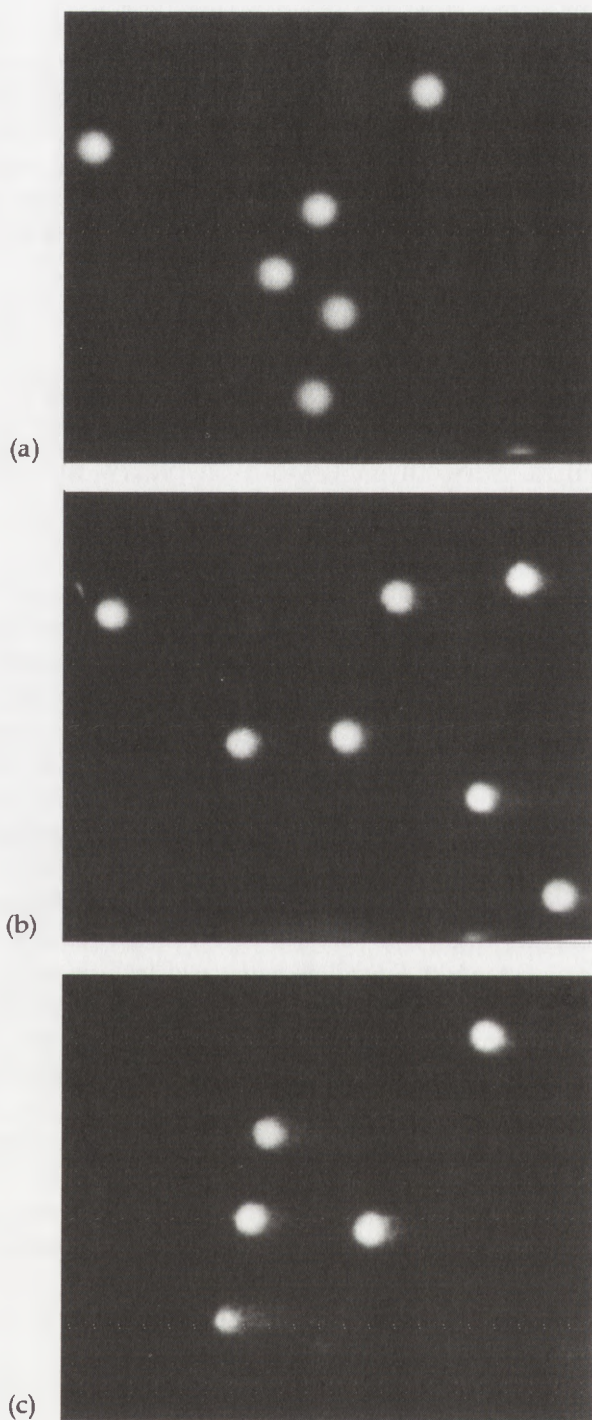
znaleźć można w pracach Fairbairn i wsp. [12] oraz Tice [37]. Więcej informacji na temat warunków elektroforezy pojedynczych komórek dostarczają również prace przeglądowe McKelvey-Martin i wsp. [20], Tice i wsp. [38].

Możliwości oceny stopnia uszkodzenia DNA techniką *comet assay* w dużej mierze zależą od przyjętej metody analizy obrazów obserwowanych pod mikroskopem. Najprostszym, nie wymagającym specjalnego wyposażenia (poza mikroskopem fluorescencyjnym) sposobem określania poziomu pęknięć DNA jest analiza wizualna [1,7,8,9]. Polega ona na liczeniu komet podzielonych na kategorie (0,1,2,3,4). Każdą obserwowaną kometę można sklasyfikować na podstawie jej morfologii (tj. długości "ogona" i wielkości "głowy"). Stopień (kategoria) uszkodzenia 0 odpowiada obiektom bez widocznego "ogona", a więc komórkom z nieuszkodzonym DNA. Kategoria 4 oznacza całkowitą degradację DNA – bardzo zredukowana, często ledwo widoczna głowa oraz długi, rozmyty "ogon". Pomiędzy tymi skrajnymi sytuacjami wyróżnić można umownie trzy, dobrze wyróżnialne etapy pośrednie. Ostateczny wynik obrazuje procent poszczególnych kategorii w preparacie lub średni poziom uszkodzenia DNA opisywany jednostkami arbitralnymi. Tę ostatnią wartość oblicza się następująco: jeśli liczbę komet kategorii 0 określić jako A_0 , kategorii 1 jako A_1 , itd., to średni stopień uszkodzenia DNA wynosi $A_1+2A_2+3A_3+4A_4$. Wartość ta odnoszona jest do 100 liczonych komet i zamyka się w przedziale od 0 do 400. Wyniki analizy wizualnej dobrze opisują stan faktyczny w przypadku niewielkiego stopnia uszkodzenia DNA, a więc stosunkowo niskich nateżeń czynników uszkadzających. Po przekroczeniu stężeń lub dawek krytycznych, czyli w przypadku uzyskania 100% komet kategorii 4, zwiększający się stopień fragmentacji DNA wymyka się możliwościom tego rodzaju oceny.

Przykładowy obraz uszkodzeń DNA w ludzkich limfocytach krwi obwodowej analizowanych techniką *comet assay* przedstawiono na fotografii 1.

Inne metody analizy wymagają mniej lub bardziej kosztownego wyposażenia. W najprostszym i najtańszym przypadku wymagany jest okular mikroskopowy z odpowiednią podziałką, pozwalającą na pomiary parametrów geometrycznych komet, przede wszystkim ich długości [15,35,38,42]. Zastosowanie kamer sprzężonych z komputerowymi systemami analizy obrazu znacznie zwiększa możliwości detekcji uszkodzeń DNA i wprowadza nowe parametry odzwierciedlające ich poziom. Wartościami mierzonymi i porównywanymi w ten sposób są: stosunek fluorescencji "głowy" do fluorescencji "ogona" lub tzw. *tail moment* odpowiadający iloczynowi intensywności fluorescencji "ogona" i jego długości [3,23]. Za pomocą analizy komputerowej możliwe stało się określanie procentu DNA w poszczególnych elementach komety [9,23], co rozszerza zastosowania *comet assay* do badań porównawczych komórek na różnych etapach cyklu komórkowego [23], komórek o różnej ploiddii, czy apoptozy przyciągającej w ostatnich latach wiele uwagi.

Przeprowadzone porównania różnych sposobów analizy w zakresie *comet assay* potwierdzają przydatność prostych, wizualnych metod określania stopnia fragmen-



Fot. 1. Uszkodzenia DNA wykazane za pomocą *comet assay* w ludzkich limfocytach krwi obwodowej eksponowanych na bleomycynę (10 min, 37°C); a – kontrola negatywna, b – 10 µg/ml, c – 20 µg/ml, powiększenie 250x, barwnik – DAPI

tacji DNA, zwłaszcza w zakresie niewielkich poziomów uszkodzeń. Wyniki analizy wizualnej (opartej na klasyfikacji komet) przy niskich poziomach uszkodzeń wykazują prostoliniową zależność z procentem DNA uwolnionego z "głowy" komety do jej "ogona" (parametr mierzony za pomocą systemu komputerowego) [9]. Określono również przybliżoną liczbę pęknięć DNA odpowiadającą określonym kategoriom komet. W przypadku komórek HeLa klasa 0 oznacza < 40 pęknięć, klasa 1 do 170 pęknięć, klasa 2 do 650 pęknięć, klasa 3 do 870, klasa 4 do 1300 lub więcej pęknięć na 10^{12} Da DNA [7].

3. ZASTOSOWANIA *COMET ASSAY*

3.1. Analiza pierwotnych i wtórnych przerw nici DNA

Podział pęknięć DNA na pierwotne i wtórne ma charakter umowny i pozwala na rozróżnienie dwóch klas uszkodzeń rejestrowanych za pomocą *comet assay*. Do kategorii pęknięć pierwotnych można zaliczyć przerwy bezpośrednio wywoływane działaniem czynników fragmentujących nici DNA. Stanowią one tylko część uszkodzeń generowanych przez np. promieniowanie jonizujące, ultrafioletowe czy tzw. radiomimetyki. Mimo iż pęknięcia DNA wywoływane przez te czynniki są w istocie rezultatem często skomplikowanych reakcji przebiegających poprzez reaktywne formy tlenu, można je sklasyfikować jako pierwotne i możliwe do bezpośredniej analizy za pomocą elektroforezy pojedynczych komórek.

Do kategorii pęknięć wtórnych zalicza się pęknięcia powstałe w trakcie większości procesów naprawczych DNA pod wpływem enzymów naprawczych. Tego rodzaju przerwy, generowane przez specyficzne enzymy, są wypełniane i łączone w kolejnych etapach procesu reperacyjnego i powstają jako efekt usuwania uszkodzeń DNA przez aparat naprawczy komórki. Szczególnie silnie zaznacza się to podczas naprawy przez wycinanie (ang. *excision repair*). Natomiast utlenieniu nukleotydów towarzyszy pojawienie się uszkodzeń oksydacyjnych w postaci np. 8-hydroksyguaniny czy formamidopirymidyn. Analiza tej kategorii uszkodzeń wymaga dodatkowo zastosowania naturalnych (przeważnie bakteryjnych) enzymów naprawczych, rozpoznających i specyficznie nacinających nici DNA w miejscach wystąpienia takich modyfikacji cząsteczki.

Ponadto restrykcyjne warunki testu mogą doprowadzić do powstania kolejnych pęknięć w labilnych miejscach cząsteczki DNA. Miejsca apurynowe czy apirymidynowe, pojawiające się w wyniku wycinania uszkodzonych zasad są wrażliwe na wysokie pH i podczas alkalicznej lizy również ulegają przekształceniu w jednoniciowe przerwy.

3.1.1. Pęknięcia DNA generowane przez promieniowanie jonizujące

Promieniowanie jonizujące jest powszechnie stosowanym w celach eksperymentalnych czynnikiem indukującym jedno- i dwuniciowe przerwy DNA. Cechą ułatwiającą badanie efektów jego działania jest wprowadzanie uszkodzeń z ominięciem mechanizmów w postaci aktywacji i dezaktywacji metabolicznej, aktualnego stanu przepuszczalności błony itp., komplikujących analizę wrażliwości na szereg związków chemicznych. Zainteresowanie nowymi możliwościami analizy wpływu promieniowania na komórkę wynika również z zastosowania tego czynnika w terapii nowotworów, wykazujących różną wrażliwość i podatność na radioterapię. Obserwowaną za pomocą innych technik niezdolność pewnych tkanek i zespołów komórek do pełnej naprawy uszkodzeń radiacyjnych, zjawisko o dużym znaczeniu tak dla patologii, jak i terapii, można było interpretować dwojako. Pierwsza możliwość zakłada identyczną, niepełną sprawność naprawczą wszystkich komórek badanej tkanki, druga mówi o istnieniu populacji czy subpopulacji komórek o różnych zdolnościach do usuwania uszkodzeń. *Comet assay* umożliwia rozstrzygnięcie tego problemu, pozwalając na stosunkowo łatwe stwierdzenie heterogenności komórek zarówno pod względem wrażliwości na promieniowanie (czy inny czynnik genotoksyczny), jak też sprawności aparatu naprawczego.

Komputerowa analiza obrazu umożliwia dokonywanie porównań między komórkami znajdującymi się w różnych punktach cyklu komórkowego na jednym preparacie (podobnymi możliwościami dysponuje cytofluorymetria przepływową). Posługując się tą metodą, w badaniach z użyciem komórek CHO stwierdzono największą szybkość naprawy uszkodzeń radiacyjnych przez komórki znajdujące się w fazie G1 [22]. Technika ta daje również możliwość porównywania komórek o różnej ploidii, co jest istotne w przypadku komórek nowotworowych. Guzy nowotworowe wykazują obecność subpopulacji komórek o zwiększonej oporności na radioterapię. Elektroforeza pojedynczych komórek dostarcza narzędzia do badania podatności określonego nowotworu na leczenie tą metodą oraz pozwala na oznaczenie udziału komórek niedotlenionych, które są znacznie mniej wrażliwe na promieniowanie [25,26]. Materiał konieczny do przeprowadzenia testu jest łatwo osiągalny np. za pomocą biopsji.

Wszelkie zastosowania *comet assay* związane z radiobiologią dadzą się również odnieść do wrażliwości komórek na chemiczne środki radiomimetyczne, do których zalicza się np. bleomycynę stosowaną jako lek w chemioterapii nowotworów. [1,28].

3.1.2. Uszkodzenia oksydacyjne

Ekspozując komórki na nadtlenek wodoru [1,7,8,9,18], promieniowanie jonizujące czy radiomimetyki obserwuje się powstawanie pęknięć łańcucha DNA. Pęknięcia

te nie stanowią jednak jedynych zmian w cząsteczce kwasu nukleinowego. Efektem działania reaktywnych form tlenu generowanych przez te czynniki są np. 8-hydroksyguanina czy uszkodzenia typu formamidopirymidyn. Collins i wsp. [7,9] wprowadzili modyfikację procedury *comet assay* umożliwiającą wykrywanie i analizę takich uszkodzeń, po uprzednim przekształceniu ich działaniem enzymów naprawczych we wtórne pęknięcia DNA. Stosując ekspozycję na H_2O_2 i inkubację preparatów po alkalicznej lizie w buforze zawierającym endonukleazę III [7,9] wykazali oni zwiększanie się w wyniku tej procedury poziomu jednoniciowych pęknięć. Ponieważ endonukleaza III rozpoznaje i nacina miejsca występowania utlenionych zasad (specyficznie pirymidyn), pozwala to wyciągnąć wniosek o takim właśnie charakterze powstających w wyniku ekspozycji na H_2O_2 uszkodzeń.

Stosując elektroforezę pojedynczych komórek podjęto również próby określenia wpływu antyutleniaczy (witaminy C i E) [1,14] oraz chelatorów jonów metali (desferroamina) [19] na pęknięcia nici DNA generowane nadtlenkiem wodoru czy bleomycyną, wykazując w przypadku niektórych z nich efekt ochronny.

3.2. Wiązania krzyżowe DNA

Reaktywne związki bifunkcyjne jak np. iperyt azotowy zdolne są do wytwarzania wiązań poprzecznych i jednoniciowych wiązań krzyżowych w cząsteczce DNA. Tego typu uszkodzenia nie są obojętne dla komórki, w której się pojawiają powodując zaburzenia replikacji (stąd szczególna wrażliwość na wiązania krzyżowe dzielących się komórek). Szereg środków stosowanych w chemioterapii nowotworów ma właśnie takie działanie – do leków trwale wiążących nici kwasów nukleinowych należą cis-platyna i mitomycyna C. Trwałe wiązania krzyżowe powstałe w wyniku ich aktywności wywierają działanie odwrotne na ruchliwość elektroforetyczną DNA niż pęknięcia nici. Wykorzystano to zjawisko przy badaniu tego rodzaju uszkodzeń za pomocą *comet assay*. Komórki poddane działaniu promieniowania X w stałych warunkach eksponowano na iperyt azotowy obserwując zmniejszenie się migracji DNA (skrócenie długości "ogonów" komet) po elektroforezie [22].

3.3. Badania genotoksyczności

Genotoksyczność rozumiana jako zdolność wywoływania względnie trwałych zmian w materiale genetycznym charakteryzuje wiele czynników chemicznych i fizycznych mogących w konsekwencji działać jako mutageny czy kancerogeny. Znany jest cały zespół technik wykorzystujących układy bakteryjne lub eukariotyczne do badania potencjału genotoksycznego różnorodnych czynników. Ze względu na czułość, szybkość oraz możliwość zastosowania do dowolnych komórek eukariotycznych (w szczególności ssaczych) elektroforeza pojedynczych komórek może być wygodnym testem do określania tej właściwości. Łatwo w ten sposób

wykazać zdolność do uszkodzania DNA przez różne związki aktywne w określonych tkankach organizmu ludzkiego, standardowych modelach zwierzęcych czy liniach komórkowych. Wykorzystując *comet assay* w połączeniu z testem Ames, De Méo i wsp. [11] poddali analizie genotoksyczność kwaśnych roztworów nadmanganianu potasu wykazujących silne właściwości utleniające. Podobne analizy przeprowadzono m.in. ze związkami kadmu i arsenu, porównując równolegle ich aktywność, manifestującą się zwiększaniem częstości wymiany chromatyd siostrzanych [15]. Testy genotoksyczności z zastosowaniem tej techniki nie są jeszcze tak rozpowszechnione jak np. test Ames, jednak lista już wykorzystanych czynników o potwierdzonych zdolnościach do indukowania uszkodzeń DNA w technice elektroforezy pojedynczych komórek przekroczyła 50 pozycji [12].

3.4. Analiza zdolności naprawczych komórek

Naturalną kontynuacją badań wrażliwości określonych komórek na czynniki wprowadzające uszkodzenia do materiału genetycznego jest analiza sprawności usuwania tych uszkodzeń przez komórki. Analizie w tym zakresie poddawane są zarówno zjawiska fizjologiczne, jak i stany patologiczne. Największe zainteresowanie towarzyszyło dotychczas uszkodzeniom wywoływanym przez promieniowanie UV, X i nadtlenek wodoru. Znajduje to odbicie w ilości prac poddających analizie kinetykę naprawy pęknięć nici i uszkodzeń oksydacyjnych będących następstwem oddziaływania tych czynników z DNA. Dla ludzkich fibroblastów określono na dwie godziny czas kompletnej naprawy uszkodzeń wywołanych promieniami Roentgena w dawce 200 radów [35]. W przypadku ludzkich limfocytów poddanych identycznej ekspozycji ten sam autor określa czas pełnej naprawy również na 2 godziny wskazując jednak, iż największa część uszkodzeń reperowana jest w ciągu pierwszych 15 minut [34]. Sygnalizowano również możliwość zastosowania elektroforezy indywidualnych komórek w badaniach potencjału naprawczego ekstraktów bezkomórkowych [8]. Użycie różnych stężeń wolnych nukleotydów dostępnych dla syntezy naprawczej i ATP umożliwia ocenę sprawności etapów naprawy zależnych od prekursorów i źródła energii.

3.5. Epidemiologia i profilaktyka molekularna

Pełna sprawność mechanizmów naprawczych w znaczeniu zdolności do kompletnego usuwania uszkodzeń DNA oraz silne zaburzenia tych procesów manifestujące się jako poważne schorzenia są przypadkami skrajnymi. Między nimi istnieje całe spektrum stanów pośrednich, możliwe do uchwycenia jako zróżnicowana wrażliwość na powstawanie uszkodzeń i szybkość procesów naprawczych. Wykorzystując szybkie i tanie metody epidemiologii molekularnej możliwe jest określanie wiążanego ze sprawnością reperacji DNA ryzyka wystąpienia określonych

typów nowotworów np. w różnych grupach zawodowych. Określenie indywidualnej wrażliwości na czynniki uszkodzające DNA (mutageny, kancerogeny) występujące w środowisku może dać podstawę do profilaktyki polegającej np. na unikaniu pewnych ekspozycji (np. w miejscu pracy). Testy obejmujące duże grupy ludzi muszą spełniać kilka warunków decydujących o przydatności metody do tego rodzaju badań. Podstawowymi wymogami są niewielkie koszty, łatwość i szybkość wykonania, powtarzalność wyników czy nieinwazyjność metody. *Comet assay* wydaje się być jedną z niewielu technik użytecznych w zakrojonych na dużą skalę projektach, obejmujących duże fragmenty lokalnych populacji, grup zwiększonego ryzyka zachorowalności na nowotwory itp. Należy jednak zaznaczyć, że stwierdzenie zwiększonej wrażliwości komórek na określone czynniki genotoksyczne, czy obniżonego tempa reperacji uszkodzeń wykrywanych za pomocą elektroforezy pojedynczych komórek daje jedynie przesłankę do określenia ewentualnej podatności na pewne schorzenia. Proces nowotworzenia związany jest z wystąpieniem mutacji, będących konsekwencjami pojawienia się uszkodzeń DNA, których duża część nie stanowi pęknięć nici, bądź (na razie) nie jest możliwe enzymatyczne lub chemiczne przekształcenie ich w jedno- czy dwuniciowe przerwy. *Comet assay* może więc być dogodnym testem wstępnym w tego typu badaniach lub uzupełniać inne metody epidemiologii molekularnej.

Jednym z głównych czynników wiązanych z zachorowalnością na określone typy nowotworów jest palenie tytoniu. Badania przeprowadzone przez Betti i wsp. na stu-, a następnie dwuosobowej grupie zdrowych dawców krwi wskazują na znamienne przewagę ilości pęknięć DNA w limfocytach osób palących [4,5]. Interesujące dane pochodzą z doświadczeń mających na celu analizę uszkodzeń DNA limfocytów noworodków, których matki były aktywnymi lub biernymi palaczkami [34]. Nawet w warunkach przedłużonej elektroforezy nie udało się stwierdzić uszkodzeń DNA w komórkach dzieci, których matki nie paliły, paliły biernie lub paliły bardzo mało. Czynnikiem różnicującym w obrębie grupy noworodków, których matki paliły różną liczbę papierosów dziennie, okazał się procent limfocytów z widocznymi uszkodzeniami DNA (rosnący wraz z intensywnością nałogu matki).

Epidemiologia molekularna z zastosowaniem *comet assay* nie ogranicza się jedynie do możliwości oszacowania ryzyka wystąpienia nowotworu na podstawie wrażliwości na środowiskowe czynniki genotoksyczne. Znanych jest szereg chorób, których przyczyn upatruje się w zaburzeniach komórkowych procesów naprawy uszkodzeń DNA. Niektóre z nich charakteryzują się wysoką wrażliwością tkanek i komórek pacjentów na określone czynniki uszkodzające materiał genetyczny lub obniżoną zdolnością reperacji uszkodzeń w stosunku do osób zdrowych. Green i wsp. [13] wykorzystując naświetlanie limfocytów T promieniowaniem UV-C (czynnik powodujący powstawanie głównie dimerów pirymidyn) potwierdził nadwrażliwość na ten czynnik komórek pacjentów cierpiących na *Xeroderma pigmentosum*, proponując *comet assay* jako szybką technikę diagnostyczną. W tym przypadku

niesprawność mechanizmów naprawczych powoduje mniejszą niż u osób zdrowych liczbę wtórnych przerw DNA wynikającą z niewydajnego nacinania nici w miejscach wystąpienia uszkodzeń.

4. UWAGI KOŃCOWE

Wszechstronność zastosowań *comet assay* wynika z możliwości czułej detekcji i analizy jedno- i dwuniciowych przerw w cząsteczce DNA. Teoretycznie każdy typ modyfikacji łańcucha kwasu nukleinowego można enzymatycznie lub chemicznie przekształcić w pęknięcia i w praktyce takie podejście możliwe jest obecnie w stosunku do niektórych uszkodzeń. Budzącą największe zainteresowanie i nadzieje cechą elektroforezy pojedynczych komórek jest możliwość obserwacji procesów związanych z uszkodzaniem i naprawą DNA w indywidualnych komórkach. Znacznie ułatwione stało się badanie różnic międzykomórkowych w obrębie określonych populacji np. limfocytów czy komórek jednego guza nowotworowego. Określanie wrażliwości na rozmaite czynniki terapeutyczne subpopulacji komórek nowotworowych, czy oszacowanie ilości komórek szczególnie odpornych pozwala zoptymalizować przebieg leczenia i być może pozwoli uzyskać informacje o przewidywanej skuteczności terapii.

Stworzenie możliwości porównywania wyników uzyskiwanych przez różne laboratoria wymaga przyjęcia jednolitej procedury. Konieczność taka sygnalizowana jest przez różnych badaczy [30]. Szeroko zakrojone badania biomonitoringu populacyjnego wchodzące w zakres epidemiologii molekularnej będą możliwe dopiero po standaryzacji podstawowych wariantów *comet assay*. Różnorodność obecnie stosowanych, często drobnych modyfikacji metody pozwala jedynie na stwierdzanie podobieństw badanych procesów i parametrów bez możliwości jednoznacznych uogólnień.

Technika elektroforezy pojedynczych komórek wykazuje zdecydowaną przydatność we wstępnej analizie omówionych efektów, a zwłaszcza genotoksyczności i badań procesów naprawy uszkodzeń DNA, jednak do bardziej zaawansowanych wniosków i uogólnień wymaga współdziałania z innymi technikami badawczymi.

LITERATURA

- [1] ANDERSON D, YU TW, PHILLIPS BJ, SCHMEZER P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutat Res* 1994; **307**:261–271.
- [2] AHNSTRÖM G, ERIXON K. Radiation-induced strand breakage in DNA from mammalian cells. Strand separation in alkaline solution. *Int J Radiat Biol* 1973; **23**:285–289.
- [3] ASHBY J, TINWELL H, LEFEVRE PA, BROWNE MA. The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. *Mutagenesis* 1995; **10** (2): 85–90.

- [4] BETTI C, DAVINI T, GIANNESSI L, LOPRIENO N, BARALE R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 1994; **307**: 323–333.
- [5] BETTI C, DAVINI T, GIANNESSI L, LOPRIENO N, BARALE R. Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat Res* 1995; **343**: 201–207.
- [6] CELOTTI, FERRAROP, BIASIN MR. Detection by fluorescence analysis of DNA unwinding and unscheduled DNA synthesis, of DNA damage and repair induced *in vitro* by direct-acting mutagens on human lymphocytes. *Mutat Res* 1992; **281**: 17–23.
- [7] COLLINS AR, DUTHIE SJ, DOBSON VL. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 1993; **14**: 1733–1735.
- [8] COLLINS AR, FLEMING IM, GEDIK CM. *In vitro* repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercoiled nucleoid DNA by human cell extract. *Bioch Bioph Acta* 1994; **1219**: 724–727.
- [9] COLLINS AR, AI-GUO M, DUTHIE SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 1995; **336**: 69–77.
- [10] COOK PR, BRAZELL JA. Detection and repair of single-strand breaks in nuclear DNA. *Nature* 1976; **263**: 679–682.
- [11] DeMÉO M, LAGET M, CASTEGNARO M, DUMÉNIL G. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. *Mutat Res* 1991; **260**: 295–306.
- [12] FAIRBAIRN D, OLIVE PL, O'NEILL KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995; **339**: 37–59.
- [13] GREEN MHL, LOWE JE, HARCOURT SA, AKINLUYI P, ROWE T, COLE J, ANSTEY AV, ARLETT CF. UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and *Xeroderma pigmentosum* donors in the comet assay: A potential diagnostic technique. *Mutat Res* 1992; **273**: 137–144.
- [14] GREEN MHL, LOWE JE, WAUGH APW, ALDRIDGE KE, COLE J, ARLETT CF. Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mutat Res* 1994; **316**: 91–102.
- [15] HARTMANN A, SPEIT G. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Env Mol Mutag* 1994; **23**: 299–305.
- [16] KLUCIS ES, LETT JT. Zonal centrifugation of mammalian DNA. *Anal Bioch* 1970; **35**: 480–488.
- [17] KOHN KW, GRIMEG-EWIG RA. Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells. *Cancer Res* 1973; **33**: 1849–1853.
- [18] KRUSZEWSKI M, GREEN MHL, LOWE JE, SZUMIEL I. DNA strand breakage, cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide treatment at 4°C and 37°C in L5178Y sublines. *Mutat Res* 1994; **308**: 233–241.
- [19] KRUSZEWSKI M, GREEN MHL, LOWE JE, SZUMIEL I. Comparison of effects of iron and calcium chelators on the response of L5178Y sublines to X-rays and H₂O₂. *Mutat Res* 1995; **326**: 155–163.
- [20] McKELVEY-MARTIN VJ, GREEN MHL, SCHMEZER P, POOL-ZOBEL BL, De MÉO MP, COLLINS A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat Res* 1993; **288**: 47–63.
- [21] OLIVE PL, CHAN APL, CU CS. Comparison between the DNA precipitation and alkali unwinding assays for detecting DNA strand breaks and cross-links. *Cancer Res* 1988; **48**: 6444–6449.
- [22] OLIVE PL, WLODEK D, DURAND RE, BANÁTH JP. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp Cell Res* 1992; **198**: 259–267.

- [23] OLIVE PL, BANÁTH JP. Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res* 1993; **294**: 275–283.
- [24] OLIVE PL, BANÁTH JP, MACPHAIL HS. Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines. *Cancer Res* 1994; **54**: 3939–3946.
- [25] OLIVE PL, JACKSON SM, DURAND RE. Predicting tumor response to radiotherapy using the comet assay. Proceedings of the 4th International Conference on Time, Dose and Fractionation. [w] Paliwal B.R., Kinsella T.J., Herbert D., Fowler J. [red.] Radiation Oncology, The American Institute of Physics, Woodbury, NY 1993, 65–76.
- [26] OLIVE PL, LeRICHE J, JACKSON SJ. Growth fraction of human tumors: assays and complications. [w] Durand R.E. [red.] Seminars in Radiation Oncology 1993, 7: Cell Kinetics: Applications to Cancer Therapy, 3: 90–98.
- [27] ÖSTLING O, JOHANSON KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Bioch Bioph Res Comm* 1984; **123**, 1: 291–298.
- [28] ÖSTLING O, JOHANSON KJ. Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. *Int J Radiat Biol* 1987; **52**, 5: 683–691.
- [29] PERCY AJ, CHIPMAN JK. The measurement of DNA strand breaks in rat colonic mucosa by fluorometric analysis of DNA unwinding. *Toxicol Letters* 1991; **56**: 69–77.
- [30] ROSS GM, MCMILLAN TJ, WILCOX P, COLLINS AR. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. *Mutat Res* 1995; **337**: 57–60.
- [31] RYDBERG B. The rate of strand separation in alkali of DNA of irradiated mammalian cells. *Radiat Res* 1975; **61**: 274–287.
- [32] RYDBERG B, JOHANSON KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. [w] Hanawalt P.C., Friedberg E.C., Fox C.F. [red.] DNA repair mechanisms, Academic Press, NY 1978: 465–468.
- [33] SARDAS S., WALKER D, AKYOL D, KARAKAYA AE. Assessment of smoking-induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res* 1995; **335**: 213–217.
- [34] SINGH NP, MCKOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL. A simple technique for quantitation of low levels of damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; **175**: 184–191.
- [35] SINGH NP, TICE RR, STEPHENS RE, SCHNEIDER EL. A microgel electrophoresis technique for direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat Res* 1991; **252**: 289–296.
- [36] SUTHERLAND JC, LIN B, MONTELEONE DC, MUGAVERO J, SUTHERLAND B.M. AND TRUNK J. Electronic imaging system for direct and rapid quantitation of fluorescence from electroforetic gels: application to ethidium bromide-stained DNA. *Anal Biochem* 1987; **163**: 446–457.
- [37] TICE RR. The single cell gel/comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. [w] Phillips D.H., Venitt S. [red.] Environmental mutagenesis, BIOS Scientific Publishers, Oxford 1995, 315–339.
- [38] TICE RR, STRAUSS GHS. The single cell gel electrophoresis/comet assay: A potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 1995; **13**, Suppl. 1: 207–214.
- [39] TICE RR, STRAUSS GHS, PETERS WP. High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 1992; **271**: 101–113.
- [40] TIMMERMAN AJ, MARS-GROENENDIJK RH, van der SCHANS GP, BAAN RA. A modified immunochemical assay for the fast detection of DNA damage in human white blood cells. *Mutat Res* 1995; **334**: 347–356.

- [41] Van der SCHANS GP, Van LOON AAWM, GROENENDIJK RH, BAAN RA. Detection of DNA damage in cells exposed to ionizing radiation by use of anti-single-stranded DNA monoclonal antibody. *Inter J Radiat Biol* 1989; **55**:747–760.
- [42] VIJAYALAXMI, TICE RR, STRAUSS GHS. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res* 1992; **271**: 243–252.

Otrzymano: 28.12.1995 r.

Przyjęto: 25.03.1996 r.

*Adres autorów: Zakład Genetyki Człowieka PAN
60-479 Poznań, ul. Strzeszyńska 32*

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA ZESPOŁU NADNERCZOWO-PŁCIOWEGO*

MOLECULAR DIAGNOSIS OF CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA

Piotr KUPCZYK¹, Piotr SAWIŃSKI², Wiesław H. TRZECIAK³

¹Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ²Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ³Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Streszczenie: Najczęstszą przyczyną zespołu nadnerczowo-płciowego (ZNP) jest niedobór cytochromu P450₂₁, składnika kompleksu enzymatycznego 21-hydroksylazy steroidowej. Uniemożliwia to syntezę glukokortykoidów i mineralokortykoidów i prowadzi do nadmiernego wydzielania androgenów nadnerczowych. Gen funkcjonalny cytochromu P450₂₁(CYP21B) oraz pseudogen (CYP21A) są zlokalizowane na krótkim ramieniu chromosomu 6 w paśmie 21.3. Badania mutacji genu CYP21B dowiodły, że przyczyną ZNP mogą być konwersje, delecje, insercje, podwojenia oraz mutacje punktowe wywołujące przedwczesną terminację transkrypcji, przesunięcie ramki odczytu, zaburzenia składania RNA i in. Przedstawiono i przedyskutowano metody molekularne najczęściej stosowane do badań genu CYP21B oraz niektóre wyniki uzyskane za pomocą tych technik. Do najczęściej wykorzystywanych należą: analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA, blotting Southerna, analiza konformacji pojedynczej nici DNA i sekwencjonowanie. Nadzieję na łatwiejsze wykrycie mutacji w genie CYP21B stwarza również metoda chemicznego rozcinania DNA, rozdział fragmentów DNA w żelu poliakryloamidowym, zawierającym wzrastający gradient związku denaturującego, czy też wykorzystanie zjawiska nieuprawnionej transkrypcji. Zastosowanie metod molekularnych umożliwia precyzyjną diagnostykę prenatalną ZNP, co ułatwia wczesne zastosowanie skutecznego leczenia.

Słowa kluczowe: niedobór 21-hydroksylazy steroidowej, zespół nadnerczowo-płciowy, CYP21B, diagnostyka molekularna

Summary: The most common cause of congenital adrenal hyperplasia (CAH) is the deficiency of cytochrome P450₂₁ - a component of steroid 21-hydroxylase. This blocks the synthesis of glucocorticoids

*Pracę finansowano z programu badań statutowych A.M. 502 -1-067

and mineralocorticoids and leads to excessive secretion of adrenal androgens. The functional gene of cytochrome P450₂₁ (CYP21B) as well as its pseudogene (CYP21A), are located on the short arm of chromosome 6 p21.3. The detection of mutations of the CYP21B gene revealed that the main cause of CAH are conversions, deletions, insertions, duplications and point mutations, resulting in premature termination of transcription, frame shift, aberration of RNA splicing etc.

Molecular methods most commonly employed in investigations of CYP21 gene were discussed and some results obtained with the use of these methods were presented. The most commonly used methods are: restriction fragment length polymorphism, Southern blotting, DNA single strand conformation polymorphism and sequence analysis. Chemical cleavage method and denaturing gradient gel electrophoresis of the DNA fragments, or else applying the illegitimate DNA transcription, will hopefully facilitate detection of the mutations in the CYP21B gene. The application of the molecular methods enables precise prenatal diagnosis of CAH, which facilitates early and successful treatment.

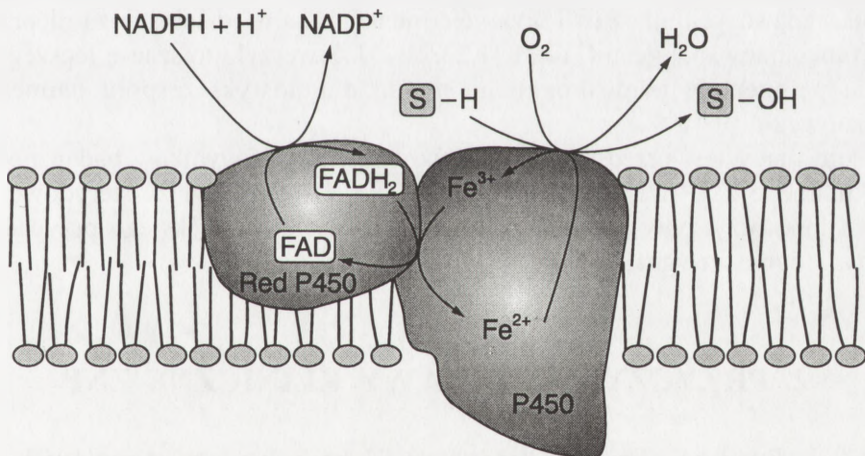
Key words: 21-hydroxylase deficiency, congenital adrenal hyperplasia, CYP21B, molecular diagnosis

1. WSTĘP

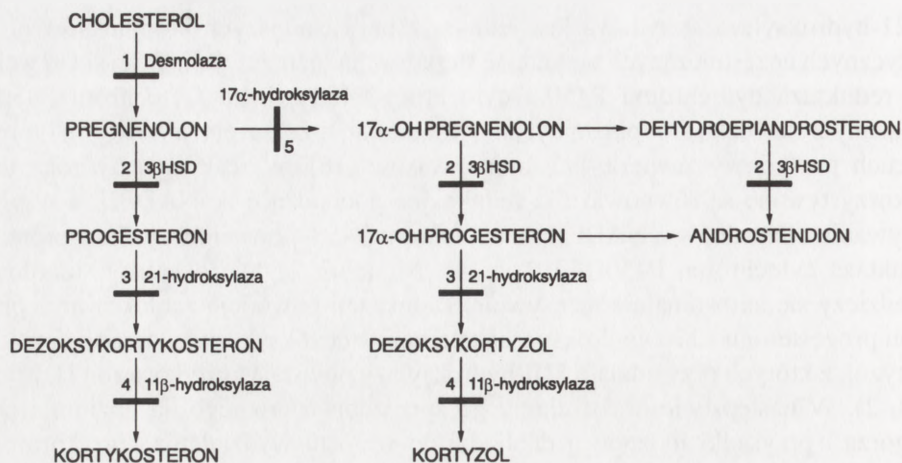
W korze nadnerczy człowieka syntetyzowane są mineralokortykoidy biorące udział w regulacji gospodarki wodno-elektrolitowej, glukokortykoidy uczestniczące w przemianach węglowodanów, białek, lipidów i kwasów nukleinowych oraz androgeny odpowiedzialne za powstawanie cech fenotypowych męskich. Reakcje syntezy hormonów sterydowych kory nadnerczy katalizują enzymy, spośród których kluczową rolę odgrywają hydroksylazy sterydowe, zawierające specyficzne cytochromy P450 jako końcowe akceptory elektronów [40]. Niedobór każdego z tych enzymów prowadzi do zaburzeń syntezy kortykosterydów, co znajduje odbicie w cechach fenotypowych osobnika dotkniętego takim defektem i prowadzi do wystąpienia objawów klinicznych zespołu nadnerczowo-płciowego (ZNP). Przyczyną ZNP jest najczęściej niedobór 21-hydroksylazy sterydowej. Z tego względu jest on najlepiej poznanym defektem enzymatycznym w procesie syntezy hormonów sterydowych i jednym z najczęściej występujących, genetycznie uwarunkowanych zaburzeń funkcji wewnątrzwydzielniczej [9,24,25]. Do wystąpienia ZNP prowadzą też niedobory 11-hydroksylazy, dehydrogenazy 3-hydroksysterydowej/⁵Δ izomerazy, 17-hydroksylazy i desmolazy cholesterolu [25,41].

Wyróżnia się kilka postaci klinicznych ZNP, w których konstelacje objawów mogą się znacznie różnić w zależności od lokalizacji i nasilenia defektu enzymatycznego. Różnorodność obrazu klinicznego stwarza potrzebę dokładnej diagnostyki laboratoryjnej, która wymaga arsenału metod pozwalających odróżnić poszczególne postaci zespołu. Badania molekularne pozwalają na wykrycie wady już w okresie życia płodowego i zastosowanie skutecznego leczenia, a nawet na wykazanie korelacji zaburzeń na poziomie molekularnym z określoną postacią choroby.

21-hydroksylaza sterydowa jest jednym z najważniejszych kompleksów enzymatycznych uczestniczących w syntezie sterydów nadnerczowych. W jej skład wchodzi reduktaza cytochromu P450 i cytochrom P450₂₁ [40]. Cytochrom P450₂₁, związany z siateczką śródplazmatyczną, jest białkiem żelazoporfirynowym, którego łańcuch peptydowy zawiera 495 aminokwasów [18]. W reakcjach hydroksylacji wykorzystywane są równoważniki redukcyjne pochodzące ze NADPH, a w przekazywaniu elektronów z NADPH na cytochrom P450₂₁ pośredniczy flawoproteina, reduktaza cytochromu P450 [40] (rys. 1). Niedobór 21-hydroksylazy sterydowej dziedziczy się autosomalnie recesywnie. Defekt ten powoduje zablokowanie przemian progesteronu i 17 α -hydroksyprogesteronu w dezoksykortykosteron i dezoksykortyzol, z których przy udziale 11 β -hydroksylazy powstają kortykosteron i kortyzol (rys. 2). W następstwie braku ujemnego sprzężenia zwrotnego na poziomie podwzgórza i przysadki mózgowej dochodzi do wzrostu wydzielania kortykotropiny (ACTH). Nadmierna stymulacja kory nadnerczy przez ACTH prowadzi do jej przerostu. Produkty pośrednie, proksymalne do bloku enzymatycznego (17 α -hydroksypregnenolon i 17 α -hydroksyprogesteron), są przekształcane w androgeny: dehydroepiandrosteron (DHEA) i androstendion, a z nich w wyniku przemiany peryferyjnej powstaje testosteron [24]. Nadmierne stężenie androgenów jest przyczyną nieprawidłowego rozwoju somatycznego u obu płci (wirylicacja u dziewcząt, przyspieszone dojrzewanie płciowe u chłopców) [17,25,42].



Rys. 1. Struktura 21-hydroksylazy sterydowej: cytochrom P450₂₁ i reduktaza cytochromu P450₂₁ związane z błoną siateczki śródplazmatycznej; substratem (S-H) są progesteron lub 17-hydroksyprogesteron (opis działania w tekście); NADP⁺ – nukleotyd nikotynoamidoadeninowy; NADPH+H⁺ – zredukowana forma NADP; FAD – nukleotyd flawinoadeninowy; FADH₂ – zredukowana forma FAD; S-OH – hydroksylowana postać substratu; P450₂₁ – cytochrom P450₂₁; Red P450₂₁ – reduktaza cytochromu P450₂₁



Rys. 2. Synteza hormonów sterydowych w korze nadnerczy – zaznaczono bloki enzymatyczne w przypadkach niedoboru: 1 – desmolazy cholesterolu; 2 – dehydrogenazy 3 β -hydroksysterydowej/ Δ^5 izomerazy (3 β HSD); 3 – 21-hydroksylazy sterydowej; 4 – 11 β -hydroksylazy sterydowej; 5 – 17 α -hydroksylazy/17,20 liazy; DHEA – dehydroepiandrosteron

Badania molekularne niedoboru 21-hydroksylazy sterydowej doprowadziły do sklonowania cDNA cytochromu P450₂₁ i poznania struktury molekularnej oraz sekwencji genu tego cytochromu (CYP21B) i pseudogenu (CYP21A) [15], a rozwój technik badawczych umożliwił wykrycie mutacji odpowiedzialnych za nieprawidłowe funkcjonowanie genu CYP21 [1,23,24,25]. Stworzyło to szansę lepszego poznania patogenezy i udoskonalenia metod diagnostyki zespołu nadnerczowo-płciowego.

Celem pracy jest przedstawienie metod i niektórych wyników badań podłoża molekularnego ZNP wynikającego z niedoboru 21-hydroksylazy sterydowej, natomiast inne przyczyny zespołu, stanowiące niewielki odsetek jego przypadków, zostaną jedynie zasygnalizowane.

2. PRZYCZYNY I OBJAWY KLINICZNE ZNP

2.1. Postacie kliniczne niedoboru 21-hydroksylazy sterydowej

Niedobór 21-hydroksylazy sterydowej jest powodem 90–95% przypadków zespołu nadnerczowo-płciowego (w piśmiennictwie anglosaskim używa się terminu wrodzony przerost nadnerczy – *congenital adrenal hyperplasia, CAH*) [25,42]. Ze względu na przebieg kliniczny można wyróżnić:

- 1) postać z wirylizacją prostą – WP;

- 2) postać z utratą soli – US (określane łącznie jako postać klasyczna) i
 3) postać nieklasyczną – NK [17,25] (tab. 1).

W postaci klasycznej u noworodków płci żeńskiej stwierdza się obojnacze zewnętrzne narządy płciowe, których stopień maskulinizacji zależy od okresu życia wewnątrzmacicznego, w którym nastąpiła ekspozycja na androgeny [25]. Wewnętrzne narządy płciowe rozwijają się prawidłowo, a przewód Wolffa zanika, gdyż najprawdopodobniej androgeny produkowane przez korę nadnerczy nie mogą zapewnić stężenia wystarczającego do jego zachowania. Dlatego chore z ZNP mają zachowane funkcje rozrodcze, pod warunkiem wczesnego rozpoznania oraz prawidłowego leczenia substytucyjnego i chirurgicznego. U starszych dziewcząt obserwuje się androidalną budowę ciała, z męskim typem owłosienia, niedorozwojem sutków i przerostem łechtaczki. Miesiączki są skąpe lub nie występują. U noworodków płci męskiej fenotyp przy urodzeniu jest zwykle prawidłowy. Nadmiar androgenów ujawnia się klinicznie najczęściej w 2–3 roku życia, prowadząc do przyspieszonego rozwoju zewnętrznych narządów płciowych i wcześniejszego pojawienia się cech dojrzewania płciowego. Ponadto w niektórych przypadkach dochodzi do zablokowania wydzielania LH, co hamuje powiększanie się jąder i prawidłowe dojrzewanie komórek plemnikotwórczych. W późniejszym wieku występuje oligo- lub azoospermia. U reszty chłopców zwiększone wytwarzanie androgenów powoduje przedwczesne dojrzewanie układu podwzgórzowo-przysadkowego, co doprowadza do postaci prawdziwej przedwczesnego dojrzewania płciowego (*pubertas praecox vera*) z przyspieszonym występowaniem spermatogenezy. U obu płci następuje przedwczesne skostnienie nasad kości długich. Z tego względu ostateczny wzrost chorych jest zwykle niski [17,25,42].

TABELA 1. Niedobór 21-hydroksylazy sterydowej jako przyczyna ZNP

Postać kliniczna	Stężenie		Steryd wydzielany w nadmiarze	Haplotypy HLA towarzyszące postaci klinicznej zespołu	Częstość występowania
	kortyzolu	aldosteronu			
WP	↓ lub prawidłowe	prawidłowe lub ↑	17 α -hydroksyprogesteron i androstendion	HLA-Bw51	postaci klasycznej: 1:14199 urodzeń dla homozygot i 1:60 dla heterozygot; znaczne różnice pomiędzy populacjami z poszczególnych krajów, a nawet regionów
US			17 α -hydroksyprogesteron i androstendion	HLA-Ac Bw47,DR7 i HLA-Bw60	
NK	prawidłowe	prawidłowe	17 α -hydroksyprogesteron i androstendion	HLA-B14,DR1	1:100 dla heterozygot rasy białej; znaczne różnice pomiędzy grupami etnicznymi

WP – postać z wirylizacją prostą, US – postać z utratą soli, NK – postać nieklasyczna, HLA (*human leucocytes antigens*) – antygeny leukocytów ludzkich (wg [18], [25] i [42] zmodyfikowane)

Postać z utratą soli występuje u 75% pacjentów z postacią klasyczną ZNP [1]. Obok zaburzeń spowodowanych nadmiarem androgenów, występuje również defekt w syntezie aldosteronu. Objawy kliniczne pojawiają się gwałtownie już w pierwszych dwóch tygodniach życia (najczęściej między 5 a 15 dniem) i obejmują dyselektrolitamię (hiponatremię i hiperkaliemię), kwasicę, biegunkę, gwałtownie narastające odwodnienie, zaburzenia w pracy serca oraz sinicę skóry. Tendencję do utraty soli nasilają gromadzące się progesteron i 17α -hydroksyprogesteron, które wywierają działanie antymineralokortykoidów. W okresie noworodkowym często następuje zgon spowodowany wstrząsem wynikającym ze zmniejszenia objętości krwi krążącej, do którego prowadzi utrata soli [22, 24, 25].

Objawy postaci nieklasycznej pojawiają się dopiero w okresie dojrzewania lub u dorosłych i obejmują przedwczesny rozwój owłosienia łonowego, trądzik oraz niski ostateczny wzrost chorych. U osobników płci żeńskiej może wystąpić różnego stopnia wirylicacja, nieregularne miesiączkowanie, wtórny brak miesiączki, zespół wielotorbielkowatych jajników oraz niepłodność. U niektórych chorych objawy kliniczne są niezauważalne, a defekt enzymatyczny można wykryć jedynie na podstawie badań laboratoryjnych [3,24].

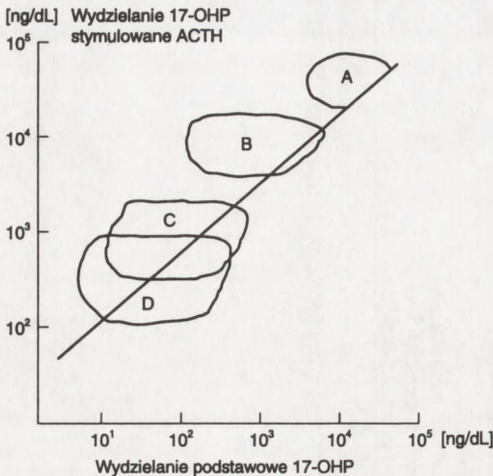
2.2. Inne przyczyny ZNP

Inne defekty enzymatyczne, takie jak niedobór 11β -hydroksylazy, dehydrogenazy 3β -hydroksysterydowej⁵ Δ izomerazy i 17α -hydroksylazy stanowią zaledwie kilka procent przypadków ZNP. Objawy kliniczne wynikające z zaburzeń metabolicznych zależnych od tych niedoborów znacznie się różnią. W przypadku niedoboru 11β -hydroksylazy i 17α -hydroksylazy, w wyniku nadmiernej produkcji mineralokortykoidów (głównie 11-dezoksykortyzonu – DOC) dochodzi do powstania nadciśnienia tętniczego. Niedobory 17α -hydroksylazy, dehydrogenazy 3β -hydroksysterydowej⁵ Δ izomerazy i desmolazy cholesterolu, obok przerostu kory nadnerczy, prowadzą do wystąpienia cech obojnactwa rzekomego męskiego. Niedobór dehydrogenazy 3β -hydroksysterydowej⁵ Δ izomerazy jest przyczyną syntezy nadmiernych ilości dehydroepiandrosteronu (DHEA). Jednocześnie synteza testosteronu przez gonady męskie jest zahamowana. DHEA jest zbyt słabym androgenem, by zapewnić prawidłowy rozwój jąder u chłopców, ale dostatecznie silnym, by doprowadzić do objawów wirylicacji u dziewcząt [25,41,42]. Lokalizację bloków enzymatycznych przedstawiono na rysunku 1, a krótką charakterystykę tych zaburzeń podano w tabeli 2.

TABELA 2. Inne defekty enzymatyczne jako przyczyny ZNP

Niedobór enzymatyczny	Postać kliniczna	Stężenie kortyzolu	Stężenie aldosteronu	Steryd wydzielany w nadmiarze	Objawy kliniczne	Lokalizacja genu na chromosomie
Dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa ^Δ izomeraza	1) K 2) NK	0	0	dehydroepiandrosteron (DHEA) i 17 α -hydroksy-pregnenolon	druga główna przyczyna ZNP, występuje najczęściej jako postać US, objawy wrytylizacji u dziewcząt, zaburzenia rozwoju gonad u chłopców	1
11 β -hydroksylaza	1) K 2) NK			11-dezoksykortyzol i 11-dezoksykortykosteron (DOC)	nadciśnienie tętnicze i hipokaliemia jako rezultat gromadzenia 11-dezoksykortykosteronu potencjalnego mineralokortykoidu	8
17 α -hydroksylaza				kortykosteron i 11-dezoksykortykosteron (DOC)	nadciśnienie tętnicze, zasadowica i hipokaliemiczna, zmniejszona aktywność reniny w osoczu (w wyniku gromadzenia się 11-dezoksykortykosteronu) i hipogonadyzm u obu płci z wysokim stężeniem gonadotropin i niskim stężeniem 17-ketosteroidów w moczu	
Desmolaza	Lipidowy przrost kory nadnerczy	0	0	cholesterol	rzadko występujący, zwykle jako postać US; gromadzenie się lipidów w komórkach kory nadnerczy i jąder; często defekt letalny	15

Kolejność w tabeli odpowiada częstości występowania; K – postać klasyczna, NK – postać nieklasyczna. Wszystkie defekty dziedziczą się autosomalnie recesywnie. Nie obserwowano związku występowania wymienionych niedoborów enzymatycznych z określonymi haplotypami HLA (wg [25], [41] i [42] zmodyfikowane)



Rys. 3. Test stymulacji kortykotropiną: nomogram odnoszący wartości stężeń 17-OHP podstawowego (0 min testu) do stymulowanego ACTH (60 min po dożylnym podaniu); umożliwia on zaliczenie chorych do grup mających określone genotypy: A – klasycznej postaci niedoboru 21-hydroksylazy steroidowej (genotyp: 21-OH-def^{ciężki}/21-OH-def^{łagodny}); B – postaci nieklasycznej (genotypy: 21-OH-def^{ciężki}/21-OH-def^{łagodny} lub 21-OH-def^{łagodny}/21-OH-def^{łagodny}); C – heterozygoty dla wszystkich postaci niedoboru (genotypy: 21-OH-def^{ciężki}/21-OH-prawidłowy lub 21-OH-def^{łagodny}/21-OH-prawidłowy), D – populacja ogólna (genotyp: 21-OH-prawidłowy/21-OH-prawidłowy), 21-OH-def^{ciężki} – allel dla ciężkiej postaci niedoboru 21-hydroksylazy steroidowej, 21-OH-def^{łagodny} – allel dla postaci łagodnej, 21-OH-prawidłowy – prawidłowy allel CYP21B, 17-OHP – 17 α -hydroksyprogesteron, wartości stężeń dla poszczególnych grup są przybliżone (wg [1] i [25] zmodyfikowane)

3. BADANIA LABORATORYJNE STOSOWANE W ROZPOZNAWANIU ZNP

W rozpoznaniu zespołu nadnerczowo-płciowego pomocne jest oznaczanie w osoczu krwi stężenia podstawowego 17 α -hydroksyprogesteronu (17-OHP) w godzinach rannych (ze względu na dobowy cykl wydzielania tego steroidu) oraz stężeń 17-OHP, pregnenolonu, 17 α -hydroksypregnenolonu, DHEA, testosteronu, 11-dezokykortyzolu i kortyzolu przed i 60 min po dożylnym podaniu 0,25 mg ACTH (test stymulacji kortykotropiną). W przypadku niedoboru 21-hydroksylazy steroidowej stężenie podstawowe 17-OHP jest podwyższone, a odpowiedź na podanie ACTH – nadmierna, przy czym obie wartości u pacjentów z postacią klasyczną zespołu są wyższe niż u pacjentów z postacią nieklasyczną. Test ten umożliwia zakwalifikowanie chorych do grup posiadających określone genotypy skorelowane z postaciami klinicznymi choroby oraz, w większości przypadków (około 80%), wykrycie heterozygotycznych nosicieli nieprawidłowych alleli genu CYP21B [1,9,25,40] (rys. 3). Pomiar stężeń wszystkich wymienionych steroidów pozwala odróżnić niedobór 21-hydroksylazy steroidowej od innych przyczyn ZNP oraz zaburzeń prowadzących do obojactwa rzekomego [22]. Ze względu na istnienie enzymów dotąd nie scharakteryzowanych, mogących przeprowadzać hydroksylację w pozycji 21 w nadnerczach i tkankach obwodowych stwierdzenie małych ilości 21-hydroksylowanych steroidów nie zawsze wskazuje, że blok enzymatyczny jest tylko częściowy. W niektórych przypadkach, zazwyczaj u dorosłych, aktywność tych enzymów wystarcza, aby zamaskować ob-

jawy kliniczne niedoboru 21-hydroksylazy. Dotyczy to szczególnie utraty soli, ponieważ zapotrzebowanie organizmu na mineralokortykoidy maleje z wiekiem [22,25].

W dobowej zbiorce moczu chorych, stężenia głównego metabolitu 17-OHP (pregnantriolu) i metabolitów DHEA, androstendionu i testosteronu (17-ketosterydów) są podwyższone. W przypadku zespołu z utratą soli istnieje odwrotnie proporcjonalna zależność między ilością wydalanych 17-ketosterydów a stężeniem sodu we krwi [17,18]. Duże znaczenie, jakie te badania miały w przeszłości, zostało ograniczone z chwilą pojawienia się testów radioimmunologicznych, które pozwalają na oznaczanie w surowicy krwi produktów pośrednich sterydogenezy, stanowiących obecnie podstawę diagnostyki laboratoryjnej [25].

Podwyższona aktywność reniny w osoczu krwi świadczy o zaburzeniach w syntezie aldosteronu. W ZNP z utratą soli stwierdza się też hiponatremię, hiperkaliemię, duże stężenie sodu w moczu oraz małe stężenia aldosteronu w surowicy krwi i w moczu [24].

U noworodków i starszych dzieci istotnej informacji dostarcza ustalenie kariotypu, który jest zgodny z fenotypem [22].

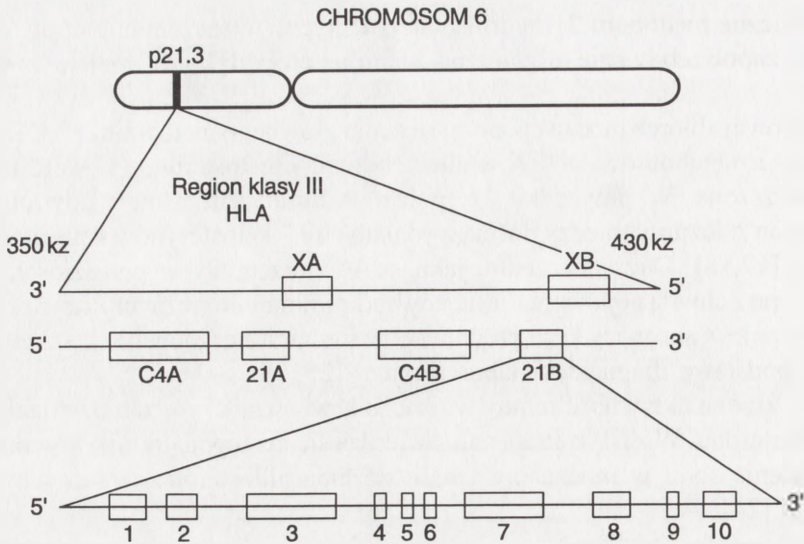
Rozpoznanie postaci nieklasycznej ZNP u starszych dzieci i u dorosłych wymaga oznaczenia podstawowego poziomu 17-OHP, a w przypadku jego podwyższenia wykonania testu stymulacji kortykotropiną. U miesiączkujących kobiet pomiar podstawowego stężenia 17-OHP należy wykonywać w fazie folikularnej cyklu, ponieważ w fazie lutealnej następuje wzrost stężenia tego hormonu zależny od jego syntezy w jajnikach [3].

Poza badaniami laboratoryjnymi w rozpoznawaniu i różnicowaniu ZNP używa się m.in. badania radiologicznego w celu ustalenia wieku kostnego, ultrasonografii miednicy, tomografii komputerowej, scyntygrafii i arteriografii nadnerczy oraz badania kontrastowego górnego odcinka przewodu pokarmowego. Omówienie tych badań przekracza jednak ramy tego artykułu.

4. STRATEGIA BADAŃ MUTACJI GENÓW CYP21

4.1 Struktura genów CYP21A i B

W DNA człowieka zidentyfikowano dwa geny 21-hydroksylazy sterydowej: pseudogen CYP21A i gen funkcjonalny CYP21B, z których każdy ma długość około 3,4 kbp [15]. Oba wysoce homologiczne (98%) geny, zawierające po 10 eksonów, znajdują się na krótkim ramieniu chromosomu 6 (pasma 21.3) w regionie HLA klasy III głównego kompleksu genów zgodności tkankowej, pomiędzy loci dla genów HLA B i HLA DR [1,22,23]. Wraz z genami dla składnika czwartego układu dopełniacza (C4A i C4B) oraz znajdującymi się na komplementarnej nici DNA



Rys. 4. Tandemowy układ genów w regionie klasy III głównego kompleksu zgodności tkankowej: dwie górne linie przedstawiają geny na przeciwnych niciach DNA, dolna linia ilustruje sekwencję eksonów i intronów genu funkcjonalnego 21-hydroksylazy sterydowej (21B), 21A – pseudogen 21-hydroksylazy sterydowej; C4A i C4B – geny kodujące dwie formy składnika 4 układu dopełniacza; XA i XB – pseudogen i gen funkcjonalny białka macierzy pozakomórkowej, długości fragmentów DNA są przybliżone (wg [18] i [23] zmodyfikowane)

genami kodującymi białko macierzy pozakomórkowej tenascin X (XA i XB) tworzą one układ tandemowy C4A, CYP21A, XA, C4B, CYP21B i XB [4,23] (rys. 4). Duże podobieństwo sekwencji nukleotydów pomiędzy sąsiadującymi ze sobą genami jest przypuszczalnie wynikiem częstych rekombinacji krzyżowych, które mogą prowadzić do niedoboru 21-hydroksylazy [15,22]. Dodatkowo, stwarza to też trudności w identyfikacji genów CYP21A i B na poziomie molekularnym.

Za unieczynnienie genu CYP21A odpowiadają głównie 3 mutacje. Delecja 8 par zasad (5'-GAGACTAC-3') w eksonie 3 powoduje przesunięcie ramki odczytu, natomiast insercja T w eksonie 7 i tranżycja C na T w eksonie 8 prowadzą do powstania kodonu nonsensownego w mRNA, co powoduje przedwczesną terminację translacji [15]. W najnowszych badaniach wykazano, że w komórkach kory nadnerczy geny CYP21A i XA ulegają transkrypcji. Nie mają one jednak otwartej ramki odczytu i dlatego przypuszczalnie nie kodują białek [4,11]. W procesie transkrypcji genu CYP 21B powstaje mRNA wielkości około 2 kz [23].

4.2. Metody stosowane do badań genu CYP21B

W celu wykrycia podwojeń (duplikacji), ubytków (delekcji), konwersji, większych wstawek (insercji) lub mutacji punktowych przeprowadza się analizę polimorfizmu

TABELA 3. Metody najczęściej stosowane do badania podłoża molekularnego ZNP

Me- to- da	Zasada	Długość fragem- tu (kpz)	Wykrywalność	Wady
RFLP	Elektroforetyczna identyfikacja fragmentów restrykcyjnych DNA	30	Wykrywa większe delecje, insercje i konwersje	Nie wykrywa mutacji punktowych
SSCP	Badanie polimorfizmu konformacji pojedynczej nici DNA	300	Wykrywa niewielkie delecje, insercje i mutacje punktowe	Nie wykrywa niektórych mutacji punktowych
CCM	Chemiczne rozcinanie heterodupleksów w miejscu mutacji punktowej	300	Wykrywa mutacje punktowe zasad komplementarnych do T lub C nici prawidłowej	Nie wykrywa mutacji punktowych zasad komplement. do A lub G nici prawidłowych
HDF	Różnica migracji hetero- i homodupleksów podczas elektroforezy	370	Wykrywa pojedyncze delecje lub insercje	Nie wykrywa substytucji
DGGE	Analiza różnic w ruchliwości elektroforetycznej zdenaturowanych hetero- i homodupleksów	500	Wykrywa wszystkie substytucje, pojedyncze insercje lub delecje	Wprowadzanie do DNA odcinka GC o długości 40 z, aby zapobiec rozdzieleniu obu nici w czasie denaturacji
Analiza sekwencyjna DNA	Różnica migracji fragmentów różnej długości podczas elektroforezy	300	Ustalenie zmiany sekwencji DNA	

RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych; SSCP (*single strand conformation polymorphism*) – polimorfizm konformacji pojedynczej nici DNA; CCM (*chemical cleavage method*) – metoda chemicznego rozcinania DNA; HDF (*heteroduplex formation*) – metoda tworzenia heterodupleksów; DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) – elektroforeza we wzrastającym gradiencie związku denaturującego.

długości fragmentów restrykcyjnych DNA, *blotting Southerna*, analizę polimorfizmu konformacji pojedynczej nici DNA, tworzenie heterodupleksów, elektroforezę we wzrastającym gradiencie związku denaturującego bądź chemiczne rozcinanie DNA. W tabeli 3 przedstawiono metody, jakie mogą być zastosowane do badania podłoża molekularnego zespołu nadnerczowo-płciowego.

4.2.1. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

Badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP), polega na otrzymywaniu przy pomocy odpowiednich enzymów restrykcyjnych fragmentów DNA, które można zidentyfikować za pomocą

TABELA 4. Identyfikacja genu CYP21B za pomocą analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) [18,23]

Enzym	Fragment (kbp)			
	CYP21B		CYP21A	
Bam H I			14	
Bgl I	10		11	
Bgl I /Eco R I			2,4	8
Eco R I	17		12,3	14
Eco R V			25	
Hind III			18	20
Kpn I	2,9		1,1	2
Nco I			0,9	2,3
Pvu II	1,8		3,3	3,5
Taq I	2,5	3,7		4

elektroforezy w żelu agarozowym, wykorzystując różnice ich długości [7,20]. Najczęściej używane enzymy restrykcyjne, wykorzystywane w analizie genów CYP21 metodą RFLP oraz długości uzyskanych fragmentów podano w tabeli 4.

Rozdzielone za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym fragmenty restrykcyjne genomowego DNA można przenieść na błonę nitrocelulozową lub nylonową i poddać hybrydyzacji ze znakowaną sondą (*Southern blotting*), zawierającą pełnej długości cDNA kodujący ludzki CYP21. Komplementarne do sondy fragmenty genu, identyfikuje się za pomocą autoradiografii. Odcinek DNA zawierający mutację, nie hybryduje z sondą i dlatego nie stwierdza się jego obecności na autoradiogramie, natomiast jest on widoczny po wybarwieniu żelu bromkiem etydydy [2].

4.2.2. Polimorfizm konformacji pojedynczej nici DNA

Metoda badania polimorfizmu konformacji pojedynczej nici DNA (*single strand conformation polymorphism*, SSCP) polega na wykorzystaniu różnic w migracji w żelu poliakrylamidowym zdenaturowanego fragmentu DNA, zawierającego mutację, w odniesieniu do analogicznego fragmentu, nie zawierającego jej. Różnica w migracji poszczególnych nici może być wywołana już mutacją punktową w fragmencie o długości nawet kilkuset zasad. Poszczególne fragmenty są wcześniej amplifikowane techniką PCR (*polymerase chain reaction*) z wykorzystaniem znakowanych lub nieznakowanych starterów [19,27].

4.2.3. Tworzenie heterodupleksów

Zamiana tylko jednej zasady w łańcuchu DNA powoduje powstawanie w czasie reakcji PCR heterodupleksów, pomiędzy nicią o prawidłowej sekwencji nukleotydów, a nicią komplementarną zawierającą mutację.

Heterodupleksy, które mają zmienioną konformację dwuniciowej helisy, wędrują na żelu poliakryloamidowym wolniej niż odpowiadające im homodupleksy prawidłowego DNA. W metodzie tej nie ma jednak korelacji pomiędzy rodzajem zamienionej zasady, a różnicą w migracji homo i heterodupleksów. W metodzie tworzenia heterodupleksów (*heteroduplex formation*, HDF) rozdziela się fragmenty nie przekraczające długości 370 pz, które można uzyskać poprzez trawienie DNA odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi [2]. Fragmenty znakowane izotopami promieniotwórczymi wykrywa się autoradiograficznie. Wykrywanie fragmentów w wyżej wymienionych metodach można zastąpić poprzez wybarwienie rozdzielanych elektroforetycznie fragmentów DNA azotanem srebra [30]. Ilość DNA wykrywanego tą metodą wynosi ok. 1 pg/mm² przekroju poprzecznego prążka.

4.2.4. Elektroforeza we wzrastającym gradiencie związku denaturującego

W badaniach genetycznych coraz częściej wykorzystuje się elektroforezę w gradiencie związku denaturującego (*denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE). Wprowadzenie do badanego fragmentu DNA ok. 40-nukleotydowego odcinka złożonego z sekwencji GC chroni obydwie nici przed rozdzielaniem po denaturacji (spowodowanej wzrastającym stężeniem mocznika i formamidu w żelu poliakryloamidowym). Nić DNA zawierająca mutację tworzy z prawidłową nicią komplementarną heterodupleks o niższej temperaturze topnienia DNA (T_m) niż homodupleks złożony z obu nici prawidłowych. Mamy wtedy do czynienia z różnicą w migracji w żelu poliakryloamidowym między heterodupleksami i homodupleksami.

4.2.5. Metoda chemicznego rozcinania DNA

Mutacje punktowe w DNA genu CYP21B określano również za pomocą metody chemicznego rozcinania (*chemical cleavage method*, CCM). Heterodupleks pomiędzy znakowanym izotopowo fragmentem genu o prawidłowej sekwencji a fragmentem nieznakowanym, pochodzącym od pacjenta, poddawano chemicznej modyfikacji za pomocą czterotlenku osmu i hydroksyloaminy. Pierwszy z wymienionych związków powoduje modyfikacje tymin odpowiadających w heterodupleksie zasadom niekomplementarnym, drugi natomiast w podobnej sytuacji powoduje modyfikacje cytozyn. Tak zmodyfikowane heterodupleksy poddaje się następnie działaniu piperydyny, która rozcina je w miejscu modyfikacji. Uzyskane produkty rozdziela się elektroforetycznie w żelach sekwencyjnych i wykrywa za pomocą autoradiografii [6].

4.2.6. Sekwencjonowanie DNA

Przypadki mutacji punktowych genu CYP21B mogą być wykrywane poprzez sekwencjonowanie DNA, najczęściej metodą terminacji łańcucha. W metodzie tej,

polimeraza wydłuża starter (*primer*) – krótki fragment DNA komplementarny do sekwencji wybranego regionu matrycy. Synteza kopii zatrzymywana jest przez dołączenie do tworzonego łańcucha DNA 2', 3'-didezoksyanalogu jednego z czterech trifosforanów nukleozydów. Przeprowadza się jednocześnie cztery reakcje enzymatyczne, każdą z analogiem innego nukleotydu. Otrzymane w ten sposób cztery zestawy fragmentów DNA rozdziela się za pomocą elektroforezy wysokonapięciowej w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących, zaś dodany do mieszaniny znakowany nukleotydy, zwykle [³⁵S]dATP, pozwala na odczytanie sekwencji z autoradiogramu [31]. Do znakowania odcinków DNA wykorzystuje się również związki fluoryzujące [35].

Nową metodą odczytu kodu genetycznego jest sekwencjonowanie DNA przez hybrydyzację (*sequencing by hybridization*, SBH). Specjalne programy komputerowe pozwalają na odczytanie sekwencji na podstawie sygnałów na filtrze nitrocelulozowym, uzyskanych w wyniku hybrydyzacji techniką *dot-blot* badanego fragmentu DNA z oligonukleotydowymi sondami (7 – 10-nukleotydowymi) znakowanymi [γ -³²P] na końcu 5' [16].

4.2.7. Inne metody, które mogą zostać wykorzystane do wykrywania mutacji genów CYP21

Technika *dot-blot* (lub *slot-blot*) nie wymaga trawienia enzymami restrykcyjnymi ani rozdziłu elektroforetycznego. Zdenaturowany, za pomocą soli o wysokim stężeniu, genomowy DNA nakłada się na filtry nitrocelulozowe i hybryduje się ze znakowanymi oligonukleotydami o specyficznej sekwencji. Metoda ta jest czuła i umożliwia wykrycie mutacji w odpowiednim fragmencie genu, w próbce zawierającej zaledwie 1 μ g DNA [2].

Nadzieję na łatwiejszą lokalizację mutacji w genie CYP21B stwarza również odkrycie zjawiska nieuprawnionej transkrypcji (*illegitimate transcription*). Wysoki poziom nieuprawnionych transkryptów znajdowano w komórkach intensywnie replikujących DNA, np. w limfoblastach i fibroblastach. Analiza transkryptów ektopowych wymaga odwrotnej transkrypcji całkowitego komórkowego RNA, a następnie amplifikacji uzyskanego cDNA i jego sekwencjonowania.

5. DIAGNOSTYKA PRZEDURODZENIOWA

Technik genetyki molekularnej używa się na coraz szerszą skalę w diagnostyce prenatalnej, kiedy istnieje wysokie ryzyko wystąpienia ZNP u dziecka. W celu zapobieżenia wirylizacji płodu podaje się matce w 4 do 5 tyg. ciąży doustnie syntetyczny glukokortykoid – deksametazon [8]. W 8 tyg. ciąży można wykonać biopsję kosmówki, zaś w 15 tyg. pobrać za pomocą punkcji płyn owodniowy [29,34]. Po namnożeniu komórek *in vitro* i określeniu kariotypu, izoluje się z nich DNA,

który następnie poddaje się amplifikacji i analizie molekularnej. Po stwierdzeniu kariotypu żeńskiego i występowania mutacji odpowiedzialnych za ZNP, podawanie deksametazonu kontynuuje się do momentu rozwiązania. Terapia ta stosowana jest dotąd jedynie w nielicznych ośrodkach klinicznych i nie jest ona całkowicie skuteczna [9,10,24,26].

6. IDENTYFIKACJA MUTACJI GENU CYP21B

Badania mutacji genu CYP21B dowiodły, że przyczyną ZNP mogą być konwersje, ubytki, wstawki, podwojenia oraz mutacje punktowe (tranzycje i transwersje), których efektem są: zahamowanie ekspresji genu, przedwczesna terminacja transkrypcji, przesunięcie ramki odczytu i in.

Mutacją, która wywołuje ok. 60% przypadków formy klasycznej ZNP, jest konwersja genu CYP21B w pseudogen CYP21A [23,33,39].

Prawie 50% znanych przypadków postaci US spowodowanych jest ubytkiem odcinka o długości ok. 30 kpz, obejmującego fragment 3' genu CYP21A, homologiczny fragment 5' genu CYP21B oraz cały gen C4B. Przyczyną wystąpienia objawów formy US może być również delecja 8 par zasad w eksonie 3 genu CYP21A [21,23]. Przeniesienie tej mutacji przez *crossing-over*, do genu CYP21B powoduje powstanie hybrydy genowej, w której koniec 3' jest typowy dla CYP21B, zaś koniec 5' dla CYP21A. Objawy formy US mogą być także spowodowane np. włączeniem dodatkowej T w pozycji 1761 eksonu 7 [14] lub podstawienie A zamiast T w pozycjach: 1380,1383,1389 eksonu 6 [3]. Wśród licznych przypadków substytucji zwraca uwagę tranzycja CG w intronie 2 (pozycja 655), powodująca zaburzenie składania pre-mRNA (*aberration of splicing*). Mutacja ta obniża aktyw-

TABELA 5. Niektóre mutacje punktowe wykryte w genie CYP 21B

Ekson	Pozycja	Mutacja	Defekt białka	Postać	Aktywność 21-HS (%)
1	89	C→T	Pro →Leu	NK	30–60 [38]
4	999	T→A	Ile →Asn	WP	3–7 [5]
7	1645	G→C	Ser →Thr	US	5 [36]
7	1683	G→T	Val →Leu	NK	20–50 [43]
7	1713	G→A	Gly →Ser	US	0 [43]
8	1994	C→T	Gln →stop	YΣ	0 [21]
8	2108	X→T	Arg →Trp	US	2 [5]
10	2578	C→T	Pro → Ser	NK	20–50 [12]

21-HS – 21-hydroksylaza sterydowa (aktywność mierzono *in vitro*), NK – forma nieklasyczna, WP – wirylizacja prosta, US – postać z utratą soli (w nawiasach kwadratowych podano piśmiennictwo)

ność 21-hydroksylazy sterydowej *in vitro* do 5% i związana jest z postaciami US i WP zespołu nadnerczowo-płciowego [14,32,37]. Inne wykryte dotąd podstawienia w genie CYP21B przedstawiono w tabeli 5.

Jedna piąta poznanych przypadków WP związanych jest natomiast z podwojeniem genów CYP21A i C4B [23,33].

7. UWAGI KOŃCOWE

Badania nad niedoborem innych enzymów uczestniczących w syntezie hormonów sterydowych: 17 α -hydroksylazy sterydowej, 11 β -hydroksylazy sterydowej czy też 3 β -dehydrogenazy hydroksysterydowej nie są tak dalece zaawansowane, jak to ma miejsce w przypadku 21-hydroksylazy sterydowej, lecz szybki rozwój technik biologii molekularnej pozwala przypuszczać, iż niebawem nastąpi bardzo znaczny postęp badań uwarunkowań genetycznych tych zaburzeń.

LITERATURA

- [1] AISENBERG JE, SPEISER WP. The genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Endocrinology* 1994; **4**: 92–97.
- [2] AUSBEL FM. Current protocols in molecular biology. (Tom 2) John Wiley & Sons, Inc. 1994: 2.9.2–2.9.17.
- [3] AZZIZ R, DEWAILLY D, OWERBACH D. Clinical review 56. Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **78**: 810–814.
- [4] BRISTOW J, GITELMAN SE, TEE MK, STEALS B, MILLER WL. Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A "pseudogene". *J Biol Chem* 1993; **268**: 12919–12926.
- [5] CHIOU SM, HU MC, CHUNG BC. A missense mutation at Ile 172Asn or Arg 365Trp causes steroid 21-Hydroxylase deficiency. *J Biol Chem* 1990; **265**: 3549–3552.
- [6] COTTON RGH, RODRIGUES NR, CAMPBELL RD. Reactivity of cytosine and thymine in single-base pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 4397–4405.
- [7] DONOHOUE PA, NETO RS, COLLINS MM, MIGEON CJ. Exon 7 Nco I restriction site within CYP21B (steroid 21-hydroxylase) is a normal polymorphism. *Mol Endocrinol* 1990; 1354–1361.
- [8] DÖRR HG, SIPPELL WG. Prenatal dexamethasone treatment in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: Effect in midgestational amniotic fluid steroid levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; **76**: 117–120.
- [9] DÖRR HG, SIPPELL WG. Adrenogenitales Syndrom (AGS) mit 21-Hydroxylase – Defekt. *Monatschr Kinderheilkd* 1993; **141**: 609–621.
- [10] DÖRR HG, SIPPELL WG, WILLIG RP. Pränatale Therapie und Diagnostik des adrenogenitalen Syndroms mit 21-Hydroxylasedefekt. *Pediatric Praxis* 1992; **43**: 517–520.
- [11] GITELMAN SE, BRISTOW J, MILLER WL. Mechanism and consequences of the duplication of the human C4/P450c21/ gene X locus. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 2124–2129.

- [12] HELMBURG A, TUSIE-LUNA MT, TABARELLI M, KOFLER R, WHITE PC. R339H and P453S: CYP 21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversion. *Mol Endocrinol* 1992; **6**: 1318–1322.
- [13] HAGLUND-STENGLER B, RITZEN EM, GUSTAFSSON I, LUTHMAN H. Haplotypes of the 21-hydroxylase gene region encoding mild 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8352–8356.
- [14] HIGASHI Y, HIROMASA T, TANAE A, MIKI T, NAKURA J, NAKAYAMA K, FUJII-KURIYAMA Y. Effects of the individual mutations in the P-450 (C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biochem Tokyo* 1991; **109**: 638–644.
- [15] HIGASHI Y, YOSHIOKA H, YAMANE M, GOTOH O, FUJII-KURIYAMA Y. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: A pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **3**: 2841–2848.
- [16] JANITZ M, KURPISZ M. Sekwencjonowanie przez hybrydyzację – nowa metoda odczytu kodu genetycznego. *Post Biochem* 1994; **40** (2): 72–76.
- [17] KALUZEWSKI B, JAKUBOWSKI L. Wrodzony przerost kory nadnerczy. [w:] Pawlikowski M [red.] *Zarys endokrynologii klinicznej*. Warszawa: PZWL 1992: 153–157.
- [18] KUPCZYK P, SAWIŃSKI P, TRZECIAK WH. Podłoże molekularne niedoboru 21-hydroksylazy sterydowej. *Post Biochem* 1995; **41**(1): 38–45.
- [19] LIU ET, HE M, RAJGOPAL U. Differential polymerase chain reaction in the analysis of the gene dosage. *Seminars in cancer biology* (Tom 4), 1993: 47–58.
- [20] MORNET E, COUILLIN P, RAUX MC, WHITE PC, COHEN D, BOUE A, DAUSSET J. Associations between restriction fragment length polymorphisms detected with a probe for human 21-hydroxylase (21-OH) and two clinical forms of 21-OH deficiency. *Hum Genet* 1986; **74**: 402–408.
- [21] MORNET E, CRETE P, KUTTEN F, RAUX-DERMAZ MC, BOUE J, WHITE PC, BOUE A. Distribution of deletion and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1991; **48**: 79–88.
- [22] MILLER WL. Clinical review 54: Genetics, diagnosis, and management of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **78**: 241–244.
- [23] MOREL Y, MURENA M, NICOLINO M, FOREST MG. [w:] Saez J.M., Brownie A.C., Capponi A., Chambaz EM, Mantero F [red.] *Cellular and Molecular Biology of the Adrenal Cortex* (Tom 2) John Libbey Eurotext Ltd, Montrouge, 1993: 123.
- [24] NEW MI. 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; **48**: 15–22.
- [25] NEW MI, WHITE PC, PANG S, DUPONT B, SPEISER PW. [w:] Scriver C., Beaudet A., Sly S., Valle D. [red.] *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill 1989: 1881–1917.
- [26] NIVELON JI, CHOUCANE M, FOREST MG, MOREL M, HUET F, NIVELON-CHEVALLIER A, FRANCOIS c. Traitement prenatal de l'hyperplasie surrenale congenitale par deficit en 21-hydroxylase. A propos de neuf grossesses traitees. *Ann Pediatr Paris* 1993; **40**(7): 421–425.
- [27] OWERBACH D, BALLARD AL, DRAZNIN MB. Salt-wasting adrenal hyperplasia: detection and characterization of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene, CYP21, using the polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; **74**: 553–558.
- [28] OWERBACH D, SHERMAN L, BALLARD AL, AZZIZ R. Pro-453 to Ser mutation in CYP21 is associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency. *Mol Endocrinol* 1992; **6**: 1211–1215.
- [29] PARTSCH CJ, SIPPPELL WG, MACKENZIE IZ, AYNLEY-GREEN A. The steroid hormonal milieu of the undisturbed human fetus and mother at 16–20 weeks gestation. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; **73**: 969–973.
- [30] RABILLOUD T. Staining nucleic acids with silver. *Electrophoresis* 1990; **11**: 785–795.
- [31] ŚLĄTKOBE. Protocols for manual dideoxy DNA sequencing. [w:] Karan J, Chao L, Warr G [red.] *Methods in Nucleic Acids Research*. CRC Press, Boca Raton, Fla, 1991: 83–129.

- [32] SCHULZE E, SCHARER G, PRIEBE L, BETTENDORF M, LEWICKA S, HEINRICH UE, HOEPFFNER W, SCHWABE U. Divergence between genotype and phenotype in relatives of patients with the intron 2 mutation of steroid – 21-hydroxylase. *Exp Clin Endocrinol* 1995; 103 Suppl.1
- [33] SPEISER PW, DUPONT J, ZHU D, SERRAT J, BUEGELEISEN M, TUSIE-LUNA M, LESSER M, NEW MI, WHITE PC. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1992; **90**: 594–595.
- [34] SPEISER PW, LAFORGIA N, KATO K, PAREIRA J, KHAN R, YANG SY, WHORWOOD C, WHITE PC, ELIAS S, SCHROCK E, SIMPSON JL, TASLIMI M, NAJJAR J, MAY S, MILLS G, CRAWFORD C, NEW MI. First trimester prenatal treatment and molecular genetic diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *J Clin Endocr Metab* 1990; **70**: 838–848.
- [35] STARKE HR, YAN JY, ZHANG JZ, MUEHLEGGER K, DOVICH NJ. Internal fluorescence labeling with fluorescent deoxynucleotides in two-label peak-height encoded DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 3997–4001.
- [36] STRACHAN T. Molecular pathology of congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocr* 1990; **32**: 373–393.
- [37] TAJIAMA T, FUJIEDA K, NAKAYAMA K, FUJI-KURIYAMA Y. Molecular analysis of patients and carrier genes with congenital steroid 21-hydroxylase deficiency by using polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. *J Clin Invest* 1993; **92**(5):2182–2190.
- [38] TUSIE-LUNA MT, SPEISER PW, DUMIE M, NEW MJ, WHITE PC. A mutation (Pro 30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol* 1991; **5**: 685–692.
- [39] URABE K, KIMURA A, HARADA F, IWANAGA T, SASAZUKI T. Gen conversion in steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet* 1990; **46**: 1178–1186.
- [40] VINSON PG, WHITEHOUSE B, HINSON J. The Adrenal Cortex. New Jersey: Prentice Hall, Englewood Cliffs 1992: 32–44.
- [41] WILLIAMS GH, DLUHY RG. Diseases of the adrenal cortex. [w] Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL [red.] Harrison's Principles of Internal Medicine. (Tom 2) New York: McGraw-Hill 1994: 1953–1976.
- [42] WILSON JD, GRIFFIN JE. Disorders of sexual differentiation. [w] Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. [red.] Harrison's Principles of Internal Medicine. (Tom 2) New York: McGraw-Hill 1994: 2039–2051.
- [43] WU DA, CHUNG BC. Mutations of P450c21 (Steroid-21-Hydroxylase at Cys428, Val281, and Ser265) result in complete, partial, or no loss of enzymatic activity, respectively. *J Clin Invest* 1991; **88**: 519–523.
- [44] WU R. Development of the primer – extension approach: a key role in DNA sequencing. *TIBS* 1994; **19**: 429–433.

Otrzymano: 18.12.1995 r.

Przyjęto: 19.03.1996 r.

Adres autorów: 60-781 Poznań, ul. Świecickiego 6

ZASTOSOWANIE TECHNIK CYTOGENETYCZNYCH DO BIOLOGICZNEGO MONITOROWANIA NARAŻENIA NA CZYNNIKI MUTAGENNE

APPLICATION OF THE CYTOGENETIC TESTS IN DETECTION OF HUMAN EXPOSURE TO MUTAGENIC AGENTS

Maria SAŚIADEK, Małgorzata PAPROCKA-BOROWICZ, Ryszard ŚLĘZAK

Zakład Genetyki, Akademia Medyczna, Wrocław

Streszczenie: Wzrastająca liczba czynników mutagennych występujących w środowisku życia i pracy człowieka sprawiła, że narażenie na ich działanie dotyczy całej populacji ludzkiej. Prowadzone są więc badania nad opracowaniem metod, które pozwolą na określenie wpływu mutagenów na materiał genetyczny osób narażonych. W tym celu stosowane są następujące testy cytogenetyczne: analiza aberracji strukturalnych chromosomów (CA), analiza częstości wymian siostrzanych chromatyd (SCE), test mikrojądrowy (MN). Testy te zostaną omówione w przedstawianym artykule.

Słowa kluczowe: mutageneza, monitorowanie biologiczne, testy cytogenetyczne, aberracje chromosomowe, wymiany siostrzanych chromatyd, test mikrojądrowy.

Summary: During the last decades human exposure to potentially mutagenic and/or carcinogenic agents has greatly increased. Therefore evaluation of biological effects of human exposure to mutagens is very important. Cytogenetic tests: chromosome aberrations (CA), sister chromatid exchanges (SCE) and micronuclei (MN) are well recognized and widely used. In present paper CA, SCE and MN tests are described.

Key words: mutagenesis, biomonitoring, sister chromatid exchanges, micronuclei, chromosome aberrations.

Wykaz skrótów: BLC (ang. *baseline cells*) – komórki o podstawowej częstości SCE, CA (ang. *chromosome aberrations*) – aberracje chromosomowe, CBG (ang. *C-bands by barium hydroxide using Giemsa*) – prążki C, uzyskiwane przez działanie na chromosomy wodorotlenkiem baru, a następnie barwnikiem Giemsy, FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*) – hybrydyzacja *in situ* z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego do uwidocznienia miejsca związania sondy, GTG (ang. *G-bands by trypsin using Giemsa*) – prążki G, uzyskiwane przez trawienie chromosomów trypsyną, a następnie barwienie barwnikiem Giemsy, HFC (ang. *high frequency cells*) – komórki o najwyższej częstości SCE, ISCN, 1985 (ang. *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) – międzynarodowy system nomenklatury stosowany w cytogenetyce człowieka opracowany w 1985 r, MN (ang. *micronuclei*) – mikrojądra, PAINT (ang. *Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology*) –

logy) – system klasyfikacji i zapisu aberracji strukturalnych chromosomów barwionych techniką FISH, RI (ang. *replication index*) – wskaźnik replikacji komórek, SCE (ang. *sister chromatid exchange*) – wymiany siostrzanych chromatyd.

Wzrastająca liczba czynników mutagennych występujących w środowisku życia i pracy człowieka sprawiła, że narażenie na ich działanie dotyczy całej populacji ludzkiej. Wynika ono zarówno ze stylu życia (czynne i bierne palenie papierosów, stosowanie kosmetyków, leków), jak i pracy zawodowej (narażenie zawodowe). Prowadzone są więc badania nad opracowaniem coraz dokładniejszych metod biologicznego monitorowania narażenia, które mają na celu:

(a) określenie progu indukowanych zmian genetycznych nie stanowiącego zagrożenia dla równowagi genetycznej populacji,

(b) identyfikację osób szczególnie wrażliwych na działanie czynników genotoksycznych,

(c) rutynowe monitorowanie biologiczne osób narażonych zawodowo na działanie potencjalnie mutagennych związków,

(d) ocenę zmian genetycznych w populacjach szczególnie zagrożonych (np. po katastrofach ekologicznych), a także

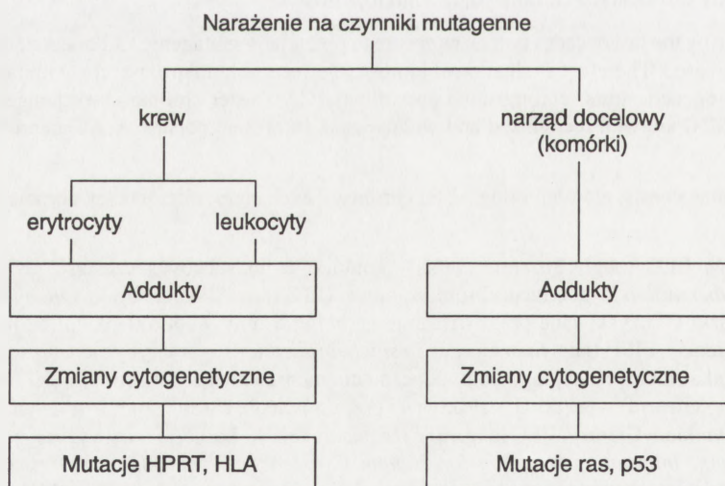
(e) badania nad genotoksycznością nowych związków chemicznych wprowadzanych do środowiska [9,12,14,16,20,41,44].

Do tych celów stosowane są różne testy (rys. 1) [11], a wśród nich testy cyto-genetyczne:

(a) aberracji strukturalnych chromosomów (CA),

(b) analizy częstości wymian siostrzanych chromatyd (SCE),

(c) mikrojądrowy (MN) [8,23,27,31,34,37].



Rys. 1. Badania stosowane w biologicznym monitorowaniu narażenia na związki mutagenne (wg [11])

Wszystkie trzy testy cytogenetyczne są stosowane zarówno do biologicznego monitorowania narażenia, jak i w badaniach doświadczalnych.

I. MATERIAŁ DO BADAŃ CYTOGENETYCZNYCH

Badania cytogenetyczne mogą być prowadzone na chromosomach limfocytów krwi obwodowej lub komórek narządów docelowych dla badanego związku [11]. W badaniach prowadzonych u narażonych ludzi chromosomy są zwykle uzyskiwane z limfocytów krwi obwodowej, gdyż są to komórki łatwe do pobrania od badanych i do hodowli *in vitro*. Ponadto obserwowane w nich zmiany są czułym markerem procesów zachodzących w organizmie, gdyż limfocyty krążąc w krwioobiegu są ekspozowane na działanie związków mutagennych lub ich metabolitów w różnych narządach. Okres półtrwania limfocytów T w organizmie wynosi trzy lata, dlatego też obserwujemy w nich uszkodzenia chromosomów zarówno nowopowstałe, jak i przetrwałe, najczęściej będące efektem kumulacji wpływów mutagennych. W badaniach doświadczalnych często używane są linie komórkowe. Zasady wykonywania badań cytogenetycznych oraz analizy wyników są ściśle określone, w celu uzyskania porównywalności wyników badań uzyskiwanych przez różne zespoły badaczy [20,28,37].

II. TEST ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH

Aberracje chromosomów (*chromosome aberrations* – CA) strukturalne u ludzi nienarażonych na działanie znanych mutagenów występują w 0,7 do 1,0% metafaz [1,3]. Pod wpływem działania związków mutagennych może dojść do zwiększenia częstości występowania CA: złamań, odcinków achromatycznych (co do których nie ma pełnej zgodności wśród autorów, czy należy je zaliczać do aberracji), translokacji, delecji, chromosomów policentrycznych bądź fragmentów acentrycznych [19]. Aberracje występują zwykle przypadkowo, w pojedynczych metafazach, a nie w klonach (klon jest to populacja komórek pochodzących ze wspólnej komórki macierzystej). Aberracje strukturalne zaliczamy do zmian klonalnych, jeśli dana aberracja występuje w co najmniej dwóch z 25 analizowanych metafaz, a aberracje liczbowe – jeśli występuje w co najmniej 3 ze 100 analizowanych metafaz [47]. W badaniach z zakresu mutagenezy aberracje chromosomowe są najczęściej oceniane na preparatach barwionych barwnikiem Giemsa, rzadziej – barwionych technikami prążkowymi. W ostatnich latach wykorzystywana jest technika hybrydyzacji *in situ* (*fluorescence in situ hybridization* – FISH), przede wszystkim w modyfikacji pozwalającej na wybarwienie całych chromosomów (tzw. technika malowania chromosomów – *chromosome painting technique*).

Barwienie barwnikiem Giemsy prowadzi do uzyskania jednolicie ciemno wybarwionych chromosomów, które są klasyfikowane na podstawie wielkości i kształtu (uwarunkowanego położeniem centromeru). Dlatego też analiza chromosomów wybarwionych barwnikiem Giemsy jest mało dokładna i pozwala jedynie na ocenę ilościową występowania złamań i odcinków achromatycznych, fragmentów acentrycznych oraz chromosomów policentrycznych. Należy się liczyć z możliwością błędnego zaklasyfikowania skrzyżowania chromatyd, jako dodatkowego centromeru.

Aby dokładnie ocenić centromery, stosuje się technikę wybiórczego ich barwienia – najczęściej prążki C (CBG – *C-bands by barium hydroxide using Giemsa*).

Dokładną analizę aberracji strukturalnych chromosomów można przeprowadzić stosując metody prążkowe barwienia chromosomów. Są to techniki, które prowadzą do uzyskania naprzemiennie ułożonych jasnych i ciemnych obszarów (tzw. prążków), układających się w charakterystyczny dla każdej pary chromosomów wzór. Najczęściej wykorzystywana jest technika prążków G (GTG – *G-bands by trypsin using Giemsa*). W 1985 roku został opracowany międzynarodowy system nomenklatury stosowany w cytogenetyce człowieka (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature* – ISCN, 1985)[46]. W ISCN, 1985 zostały jednoznacznie określone kryteria klasyfikacji i zapisu prawidłowych chromosomów oraz aberracji chromosomowych.

Analiza chromosomów barwionych technikami prążkowymi pozwala na określenie dokładnej lokalizacji aberracji. Na tej podstawie można ocenić, czy rozkład punktów złamań chromosomów w kariotypie jest losowy, czy też pewne pary chromosomów są szczególnie wrażliwe na występowanie w ich obrębie uszkodzeń pod wpływem określonych związków mutagennych. Można również stwierdzić, czy występuje korelacja pomiędzy lokalizacją obserwowanych punktów złamań a lokalizacją w kariotypie człowieka genów o zasadniczym znaczeniu w procesach transformacji nowotworowej [17,21]. Po zastosowaniu barwienia GTG stwierdzono np., że u pracowników narażonych zawodowo na działanie różnych mutagenów chemicznych rozkład punktów złamań w kariotypie odbiega od losowego i jest różny, w zależności od rodzaju narażenia [32,33].

Techniki prążkowe są również wykorzystane do oceny wyników testu bleomycynowego, stosowanego do wykrywania tzw. "ukrytej łamliwości chromosomów", wynikającej ze zwiększonej podatności na działanie czynników mutagennych. W teście tym limfocyty ludzkie są poddawane *in vitro* działaniu bleomycyny (jest to antybiotyk o właściwościach cytostatycznych), która uszkadza DNA powodując złamania chromosomów (rys. 2). W klasycznym teście bleomycynowym analizowane są chromosomy barwione barwnikiem Giemsy (nie mniej niż 50–100 metafaz w każdym badaniu), a oceniana jest średnia liczba złamań przypadająca na komórkę. Stwierdzenie więcej niż jednego złamania na komórkę jest uważane za wyraz zwiększonej łamliwości chromosomów. Zwiększoną łamliwość chromosomów w teście



Rys. 2. Przykład metafazy barwionej techniką GTG, z zaznaczonym strzałką złamaniem chromosomu

bleomycynowym stwierdzono u około 16% zdrowej populacji oraz w grupach pacjentów z niektórymi nowotworami (np. nowotworami głowy i szyi, rakiem okrężnicy), podczas gdy w grupach pacjentów z innymi chorobami nowotworowymi (jak np. rak płuc, czy też nowotwory centralnego układu nerwowego) nie obserwowano zwiększenia częstości występowania aberracji chromosomowych pod wpływem bleomycyny [4,16,35]. Hsu i wsp. oceniając chromosomy barwione techniką GTG wykazali natomiast, że w grupach pacjentów z różnymi nowotworami rozkład punktów złamań powstających pod wpływem bleomycyny jest nielosowy i powiązany z postacią histopatologiczną nowotworu [6,45].

Analiza chromosomów barwionych technikami prążkowymi jest jednak stosunkowo rzadko stosowana w badaniach z zakresu mutagenezy, gdyż przy konieczności wykonywania dużej liczby analiz u poszczególnych osób narażonych (minimum 100 metafaz) wymaga dużego nakładu pracy. Metodą pozwalającą na szybką ocenę wybranych chromosomów jest FISH, w której stosowane są sondy hybrydujące ze zdenaturowanym DNA chromosomów metafazalnych. Miejsce związania sondy jest widoczne dzięki zastosowaniu barwników fluorescencyjnych. Obecnie możliwe jest wykonanie dwu- lub trójkolorowej hybrydyzacji, a więc uwidocznienie jednocześnie dwóch lub trzech par chromosomów. Ta metoda została szczegółowo opisana w piśmiennictwie polskim przez Zawadę i Latos-Bieleńską [46].

Dzięki wybiórczemu barwieniu poszczególnych par chromosomów można dokonać szybkiej oceny wybranych chromosomów w dużej liczbie metafaz. Został

opracowany wzór matematyczny, pozwalający na obliczenie średniej częstości występowania aberracji w komórce na podstawie oceny dwóch lub trzech chromosomów przy założeniu, że rozkład aberracji w chromosomach jest losowy:

$$F_G = \frac{F_p}{2,05f_p(1-f_p)}$$

gdzie:

F_G – częstość występowania aberracji w genomie,

F_p – obserwowana liczba aberracji,

f_p – wyrażona w procentach, wybarwiona część genomu [18,22].

Obraz chromosomów barwionych techniką "malowania chromosomów" jest odmienny od obrazu uzyskiwanego w wyniku barwienia techniką GTG. Dlatego też ISCN,1985 [47] nie może być wykorzystany do klasyfikacji i zapisu aberracji strukturalnych obserwowanych w chromosomach barwionych techniką "malowania chromosomów". W 1995 roku został opracowany szczegółowy system klasyfikacji i zapisu aberracji strukturalnych chromosomów, barwionych omawianą techniką – PAINT (*Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology*) [39]. W tym systemie zapisu zastosowane zostały skróty opisujące rodzaj aberracji zgodnie z ISCN,1985 [47] oraz symbole oznaczające niewybarwione (A,a) i wybarwione (B,b) fragmenty chromosomów, przy czym dużymi literami zostały oznaczone fragmenty zawierające, a małymi – niezawierające centromer. Podstawowa różnica pomiędzy zasadą zapisu aberracji wg ISCN a PAINT wynika z faktu, że PAINT polega na zapisie obserwowanych aberracji bez zaznaczenia związków między nimi, np. translokacja wzajemna jest opisana jako dwa chromosomy w obrębie których znajduje się materiał pochodzący z innego chromosomu [39].

Omawiana technika, ze względu na łatwość wykonania i szybkość analizy znalazła zastosowanie głównie w biodozymetrii i obecnie jest już stosowana do oceny narażenia na promieniowanie jonizujące [2,40]. Zastosowanie barwienia, w którym wybiórczo uwidoczniane są translokacje pozwoliło np. na stwierdzenie, że promieniowanie jonizujące indukuje powstawanie aberracji niesymetrycznych (chromosomy policentryczne i fragmenty acentryczne) i symetrycznych (translokacje) równie często, a nawet, według niektórych autorów, aberracje symetryczne występują częściej [40].

Przy analizie tak barwionych chromosomów występuje możliwość błędnego zaklasyfikowania dicentryków, jako chromosomów z translokacją. Dlatego też niektórzy autorzy sugerują uzupełnienie "malowania chromosomów" technikami pozwalających na wybiórcze uwidocznienie centromerów, więc barwienia FISH z wykorzystaniem prób centromerowych lub barwienia techniką CBG preparatów barwionych uprzednio techniką FISH [22].

Analiza chromosomów barwionych techniką "malowania chromosomów" ma zastosowanie również w badaniach nad mechanizmami powstawania aberracji strukturalnych chromosomów [5].

III. TEST WYMIAN SIOSTRZANYCH CHROMATYD

Test SCE (*sister chromatid exchanges*) jest czułym, choć niespecyficznym testem dla oceny narażenia na czynniki mutagenne (rys. 3) [37,38]. Uważa się obecnie, że wymiany siostrzanych chromatyd zachodzą w punktach rozpoczęcia replikacji DNA bądź tuż obok nich. Wymiany siostrzanych chromatyd są indukowane efektywnie przez związki łączące się kowalencyjnie z DNA, zaburzające jego strukturę, działające na prekursorzy syntezy DNA lub zaburzające procesy reperacji [7,37]. Analiza wyników testu SCE polega na ocenie średniej liczby wymian siostrzanych chromatyd w komórkach, przy czym minimalna liczba ocenianych metafaz powinna wynosić 50–100 w każdym badaniu. U ludzi nienarażonych na działanie znanych mutagenów średnia częstość SCE waha się według różnych autorów od 4 do 8 wymian na komórkę. Poziom ten powinien być ustalany w każdym laboratorium wykonującym ten test. Wzrost średniej częstości wymian na komórkę powyżej wartości kontrolnej świadczy o zadziałaniu czynnika mutagennego. Bardziej dokładną ocenę można uzyskać wprowadzając podział na komórki o wysokiej częstości wymian (HFC – *high frequency cells* – jest to 10% komórek o najwyższej częstości wymian w badanym przypadku) oraz komórki o podstawowej częstości wymian (BLC – *baseline cells* – jest to 90% komórek, po wyłączeniu 10% komórek o największej częstości wymian). HFC – to komórki, które uległy najcięższemu uszkodzeniu i są najczęściej eliminowane z organizmu, a zmiany w nich obserwowane uważa się za nietrwałe (*unpersistent lesions*). Zmiany w komórkach o podstawowej liczbie wymian są zaliczane do zmian trwałych (*persistent lesions*) i są wyrazem w miarę stałego poziomu SCE dla osoby badanej w danych warunkach [15,43].

Za pomocą barwienia różnicowego siostrzanych chromatyd można także określić dynamikę podziałów komórkowych, obliczając indeks replikacyjny – RI. W tym celu należy ocenić 100 losowo wybranych, kompletnych metafaz, określając wśród nich liczbę metafaz po pierwszym (M_1), drugim (M_2) i trzecim (M_3) podziale komórkowym. Kryterium, na podstawie którego określa się liczbę podziałów przebytych przez daną komórkę *in vitro*, jest wzór zabarwienia chromatyd chromosomów. Po pierwszym podziale wszystkie chromatydy wybarwione są jednolicie ciemno, po drugim połowa chromatyd wybarwiona jest jasno, a połowa – ciemno, a po trzecim podziale – 2/3 chromatyd wybarwione jest jasno, a 1/3 – ciemno. Do obliczenia RI stosuje się wzór [28]:

$$RI = \frac{1M_1 + 2M_2 + 3M_3}{100}$$



Rys. 3. Przykład metafazy wybarwionej techniką SCE (widoczne jest 12 wymian siostrzanych chromatyd)

Analiza chromosomów barwionych techniką SCE nie jest czasochłonna a ponadto jest stosunkowo prosta i dlatego test ten jest powszechnie stosowany w badaniach nad mutagenezą [15,44].

IV. TEST MIKROJĄDROWY

Od początku lat osiemdziesiątych prowadzone są intensywne badania nad testem mikrojądrowym (MN – *micronucleus test*) i jego zastosowaniem do wczesnego wykrywania narażenia na czynniki mutagenne [25,28,30,36].

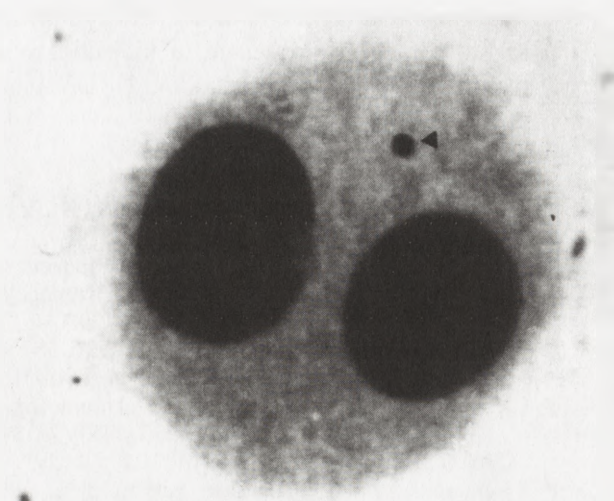
Mikrojądra są utworzone przez całe chromosomy, które na skutek uszkodzenia wrzeciona podziałowego pozostały po podziale komórki w cytoplazmie bądź też przez acentryczne fragmenty chromosomów, które nie przytwierdzone do wrzeciona podziałowego, pozostały w cytoplazmie (rys. 4). Są one widoczne w interfazie. Podwyższona liczba MN wskazuje, że badany był narażony na działanie mutagenu o działaniu klastogennym (powodującym aberracje strukturalne chromosomów) lub aneuploidogennym (powodującym aberracje liczbowe chromosomów) [3,10,29]. Mikrojądra są uznawane za efektywny marker biologiczny, jeśli są oceniane w

komórkach dzielących się po zadzia-
łaniu czynnika mutagennego. Wyty-
powanie tych komórek jest możliwe
dzięki zastosowaniu cytochalazyny
B, która zatrzymuje podział komórki
na etapie cytokinezy. W efekcie ko-
mórki, które ukończyły kariokinezę,
zawierają dwa jądra. Mikrojądra są
więc oceniane w komórkach dwu-
jądrzastych, w których są widoczne
jako drobne struktury (jedna lub wię-
cej), barwiące się tak, jak jądra wła-
ściwe. Za pomocą testu MN można
wykazać od 60 do 90% wszystkich
fragmentów acentrycznych, nie
można jednak odpowiedzieć na py-
tanie, czy delecja dotyczyła jednej,
czy też obu chromatyd. Możliwości
testu MN zostały znacznie poszerzo-

ne dzięki zastosowaniu dodatkowych barwień. Barwienie kinetochorów, lub barwienie centromerów techniką FISH pozwala na odróżnienie, czy mikrojądro zostało utworzone przez fragment acentryczny czy też cały chromosom. Badania za pomocą przeciwciał przeciw-kinetochorom pozwoliły na wykazanie, że niemal 50% tworzących się samoistnie mikrojąder zawiera całe chromosomy, a pozostałe – fragmenty acentryczne. Zastosowanie natomiast techniki FISH w modyfikacji "malującej chromosomy" umożliwia określenie, który z chromosomów utworzył mikrojądro [3,9].

Mimo że liczbę mikrojąder należy oceniać w 500–1000 metafaz w pojedynczym badaniu, nie jest to technika czasochłonna (uznaje się, że 1000 komórek można ocenić w ciągu 30 min). Ze względu na możliwość popełnienia istotnych statystycznie błędów przy ich liczeniu (nawet przez doświadczonych cytogenetyków), postuluje się obecnie wprowadzenie ścisłych zasad analizy MN, jak np. ocena jedynie bardzo dobrych preparatów o równomiernym rozkładzie komórek na szkiełku, wyłączenie z analizy uszkodzonych komórek, określenie jednoznacznych kryteriów rozróżnienia fragmentów uszkodzonych jąder od prawdziwych mikrojąder, zwiększenia obowiązującej liczby ocenianych komórek do 2000, a przede wszystkim do ustalenia obowiązującej minimalnej liczby analizowanych metafaz w pojedynczym badaniu [42].

Mimo że jak wynika z powyższych rozważań, kryteria oceny wyników testu MN są wciąż jeszcze opracowywane, jest to obecnie jedna ze standardowych metod oceny narażenia na czynniki mutagenne.



Rys. 4. Przykład komórki dwujądrzastej z widocznym mikrojądrem (zaznaczone strzałką)

Dla dokładnej oceny działania czynników mutagennych często omawiane testy są stosowane jednocześnie, a niejednokrotnie badania te są poszerzane o inne techniki, jak np. badanie adduktów DNA lub białek, czy też wykrywanie mutacji genowych [13,24,26,34].

LITERATURA

- [1] ANDERSSON HC. The spontaneous frequency of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in cultured peripheral lymphocytes of a single blood donor sampled more than 200 times. *Mutat Res* 1993; **286**: 281–292.
- [2] BAUCHINGER M, SCHMID E, ZITZELSBERGER H, BRASELMANN H, NAHRSTEDT U. Radiation-induced chromosome aberrations analysed by two-colour fluorescence *in situ* hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe. *Int J Radiat Biol* 1993; **64**: 179–184.
- [3] CHANNARAYAPPA J, NATH J, ONG T. Clastogenic and aneuploidogenic effects of cigarette smoke condensate, mitomycin C and vincristine sulfate. *Mutagenesis* 1992; **7**: 457–460.
- [4] CLOOS J, BRAAKHUIS BJM, STEEN I, COPPER MP, DE VRIES N, NAUTA JJP, SNOW GB. Increased mutagen sensitivity in head and-neck squamous-cell carcinoma patients, particularly those with multiple primary tumors. *Int J Cancer* 1994; **56**: 816–819.
- [5] COLUMNA EA, GIACCIA AJ, EVANS JW, YATES BL, MORGAN WF. Analysis of restriction enzyme-induced chromosomal aberrations by fluorescence *in situ* hybridization. *Environm Molec Mutagenesis* 1993; **22**: 26–33.
- [6] DAVE BJ, HSU TC, HONG WK, PATHAK S. Nonrandom distribution of mutagen-induced chromosome breaks in lymphocytes of patients with different malignancies. *Int J Oncology* 1994; **5**: 733–740.
- [7] DEGRASSI F, DE SALVIA R, BERGHELLA L. The production of chromosomal alterations by beta-lapachone, an activator of topoisomerase I. *Mutat Res* 1993; **288**: 263–267.
- [8] EVANS HJ. Cytogenetic markers in detecting the effects of exposure to complex mixtures of chemicals. *Complex Mixtures and Cancer Risk*, ed. Vainio H, Sorsa M, McMichael AJ. IARC 1990: 134–146.
- [9] FENECH M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 1993; **285**: 35–44.
- [10] GUSTAVINO B, DEGRASSI F, FILIPPONI R, MODESTI D, TANZARELLA C, RIZZONI M. Mitotic indirect non-disjunction in phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes. *Mutagenesis* 1994; **9**: 17–21.
- [11] HARRIS CC. Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis* 1989; **10**: 1563–1566.
- [12] HECHT F, HECHT BK. Chromosome instability before cancer the rapy. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **60**: 89–89.
- [13] HIGGINSON J. Environmental carcinogenesis. *Cancer* 1993; **72**: 971–977.
- [14] HOLMBERG K, FALT S, JOHANSSON A, LAMBERT B. Clonal chromosome aberrations and genomic instability in X-irradiated human T-lymphocyte cultures. *Mutat Res* 1993; **286**: 321–330.
- [15] KELSEY KT, CHRISTIANI DC, WIENCKE JK. Bimodal distribution of sensitivity to SCE induction by diepoxybutane in human lymphocytes. II. Relationship to baseline SCE frequency. *Mutat Res* 1991; **248**: 27–33.

- [16]HSU TC, JOHNSTON DA, CHERRY LM, RAMKISSOON D, SCHANTZ SP, JESSUP JM, WINN RJ, SHIRLEY L, FURLONG C. Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int J Cancer* 1989; **43**: 403–409.
- [17]KONDOH N, SCHWEINFEST CW, PAPAS TS. Chromosomal alterations in permanently differentiated HT29 colon carcinoma cells induced with sodium butyrate. *Int J Oncology* 1993; **3**: 177–183.
- [18]LUCAS JN, POGGENSEE M, STRUME T. Translocations between two specific human chromosomes detected by three-color "chromosome painting". *Cytogenet Cell Genet* 1993; **62**: 11–12.
- [19]LUTZE LH, CLEAVER JE, MORGAN WF, WINEGAR RA. Mechanisms involved in rejoining DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation and restriction enzymes. *Mutat Res* 1993; **99**: 225–232.
- [20]MADLE S, LANG R. Assessment and evaluation of genotoxicity findings. *Mutat Res* 1993; **291**:87–91.
- [21]MITCHELL ED, WOODHOUSE B, BIRCH JM, SANTIBANEZ-KOREFF F. The expression of aphidicolin-induced fragile sites in familial breast cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; **67**: 108–112.
- [22]NAKANO M, NAKASHIMAT E, PAWEL DJ, KODAMA Y, AWA A. Frequency of reciprocal translocations and dicentrics induced in human blood lymphocytes by X-irradiation as determined by fluorescence *in situ* hybridization. *Int J Radiat Biol* 1993; **64**: 565–569.
- [23]NORDIC STUDY GROUP ON THE HEALTH RISK OF CHROMOSOME DAMAGE. A nordic data base on somatic chromosome damage in humans. *Mutat Res* 1990; **241**:325–337.
- [24]MOTYKIEWICZ G, MICHALSKA J, PENDZICH J, PERERA FP, CHORAŻY M. A cytogenetic study of men environmentally and occupationally exposed to airborne pollutants. *Mutat Res* 1992; **280**: 253–259.
- [25]NORPPA H, HAYASHI M, MAKI-PAKKANEN J, SORSA M. The micro nucleus assay in lymphocytes. *Mutation and Environment* Willey-Liss Inc 1990; 207–216.
- [26]PERERA FP, HEMMINKI K, GRZYBOWSKA E, MOTYKIEWICZ G, MI CHALSKA J, SANTELLA RM, YOUNG TL, DICKEY C, BRANDT-RAUF P, DEVIVO I, BLANER W, TSAI WY, CHORAŻY M. Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland. *Nature* 1992; **360**:256–258.
- [27]POLI P, BUSCHINI A, CAMPANINI N, VETTORI MV, CASSONI F, CATTANI S, ROSSI C. Urban air pollution: Use of different mutagenicity assays to evaluate environmental genetic hazard. *Mutat Res* 1992; **298**:113–123.
- [28]PRESTON RJ, SAN SEBASTIAN JR, MCFEE AF. The *in vitro* human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. *Mutat Res* 1987; **189**:175–183.
- [29]RICHARD F, AURIAS A, COUTURIER J, DUTRILLAUX AM, FLURY-HERARD A, GERBAULT-SEUREAU M, HOFFSCHIR F, LAMOLIATTE E, LEFRAN COIS D, LOMBARD M, MULERIS M, PRIEUR M, RICOUL M, SABATIER L, VIEGAS-PEQUIGNOT E, VOLOBOUEV V, DUTRILLAUX B. Aneuploidy in human lymphocytes: an extensive study of eight individuals of various ages. *Mutat Res* 1993; **295**: 71–80.
- [30]ROSIN MP. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutat Res* 1992; **267**: 265–276.
- [31]ROTH S, NORPPA H, JARVENTAUS H, KYRONEN P, AHONEN M, LEHTO MAKI J, SAINIO H, SORSA M. Analysis of chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of pharmacists before and after working with cytostatic drugs. *Mutat Res* 1994; **325**:157–162.
- [32]SAŚLADEK M. Sister-chromatid exchanges and cell-cycle kinetics in the lymphocytes of workers occupationally exposed to a chemical mixture in the tyre industry. *Mutat Res* 1993; **302**: 197–200.

- [33] SAŚIADEK M. Nonrandom distribution of breakpoints in the karyotypes of workers occupationally exposed to benzene. *Environm Health Perspect* 1992; **97**:255–257.
- [34] SORSA M. Occupational genotoxicology. *Occupational Medicine* ed. Carl Zenz, Yearbook Med Pub Inc, New York 1988; 806–813.
- [35] SPITZ MR, FUEGER J, BEDDINGFIELD NA, ANNEGERS JF, HSU TC, NEWELL GR, SCHANTZ SP. Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis, an independent risk factor for upper aerodigestive tract cancers. *Cancer Res* 1989; **49**:4626–4628.
- [36] SURRALLES J, CARBONELLE, MARCOS R, DEGRASSIF, ANTOCCIA A, TANZARELLA. A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 1992; **7**: 407–410.
- [37] TAWN EJ, HOLDSWORTH D. Mutagen-induced chromosome damage in human lymphocytes. *Human Genetics. A Practical Approach*. ed. Rooney DE, Czepulkowsky BH, IRL Press and Oxford Univ. Press 1992: 189–207.
- [38] TUCKER JD, AULETTA A, CIMINO MC, DEARFIELD KL, JACOBSON-KRAM D, TICE RR, CARRANO A, V. Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox program. *Mutat Res* 1993; **297**: 101–180.
- [39] TUCKER JD, MORGAN WF, AWA AA, BAUCHINER M, BLAKEY D, CORNFORTH MN, LITTLEFIELD LG, NATARAJAN AT, SHASSERRE C. A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* 1995; **68**:211–221.
- [40] TUCKER JD, RAMSEY MJ, LEE DA, MINKLER JL. Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing. *Int J Radiat Biol* 1993; **64**: 27–37.
- [41] VAN BAO T, IMREH E, CZEIZAL AE. Cytogenetic effects of diazepam in peripheral lymphocytes of self-poisoned persons. *Mutat Res* 1992; **298**:131–137.
- [42] VIAN L, VAN HUMMELEN P, BICHET N, GOUY D, KIRSCH-VOLDERS M. Evaluation of hydroquinone and chloral hydrate on the *in vitro* micronucleus test on isolated lymphocytes. *Mutat Res* 1994; **334**:1–9.
- [43] WIENCKE JK, CHRISTIANI DC, KELSEY KT. Bimodal distribution of sensitivity to SCE induction by diepoxybutane in human lymphocytes. I. Correlation with chromosomal aberrations. *Mutat Res* 1991; **248**:17–26.
- [44] WIENCKE JK, WRENSCH MR, MIIKE R, PETRAKIS NL. Individual susceptibility to induced chromosome damage and its implications for detecting genotoxic exposures in human populations. *Cancer Res* 1991; **51**: 5266–5269.
- [45] WU X, HSU TC, ANNEGERS JF, AMOS CI, FUEGER JJ, SPITZ MR. A case-control study of nonrandom distribution of bleomycin-induced chromatid breaks in lymphocytes of lung cancer cases. *Cancer Res* 1995; **55**: 557–561.
- [46] ZAWADA M, LATOS-BIELEŃSKA A. Hybrydyzacja *in situ* (ISH) w cytogenetyce. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 363–371.
- [47] An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 1985). KARGER & Cytogenet Cell Genet 1985.

Otrzymano: 12.12.1994 r.

Przyjęto: 09.04.1996 r.

Adres autora: Zakład Genetyki, Akademia Medyczna,
50-398 Wrocław, ul. Marcinkowskiego 1

CYSTATYNY POCHODZENIA ROŚLINNEGO

CYSTATINS OF PLANT ORIGIN

Jakub GBUREK, Krzysztof GOŁĄB

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej, Wrocław

Streszczenie: Cystatyny to superrodzina endogennych inhibitorów peptydaz cysteinowych, takich jak: papaina, katepsyny B, H i L. Zainteresowanie cystatynami wynika w dużej mierze z możliwości ich zastosowania terapeutycznego w przypadkach, gdy niekontrolowana aktywność peptydaz cysteinowych jest jedną ze składowych patomechanizmu choroby. Wiele cystatyn pochodzenia zwierzęcego zostało dobrze scharakteryzowanych. W niniejszej pracy usystematyzowano informacje na temat właściwości fizykochemicznych, struktury pierwszorzędowej, właściwości inhibitorowych i roli fizjologicznej znacznie mniej poznanych cystatyn pochodzenia roślinnego. Rozważono – problem wyróżnienia nowej rodziny cystatyn – fitocystatyn.

Słowa kluczowe: cystatyna, inhibitor peptydaz, białka nasion roślin

Summary: Cystatins are the endogenous inhibitors of cysteine peptidases, such as papain, cathepsins B, H and L. Interest in cystatins derives mainly from their potential therapeutic applications in cases, when inappropriate action of cysteine peptidases is involved in pathomechanism of disease. While many animal cystatins have been well characterized, little is known about cystatins of plant origin. The paper presents the actual stage of knowledge on plant cystatins (physico-chemical properties, primary structure, inhibitory properties and physiological function). Distinguishing of a new family of cystatins – phyto-cystatins is also discussed.

Key words: cystatin, peptidase inhibitor, plant seeds proteins

Stosowane skróty: BANA – N- α -benzoilo-L-arginylo- β -naftyloamid; BAPA – N- α -benzoilo-L-arginylo-p-nitroanilid; ANA – L-arginylo- β -naftyloamid; Z-Phe-Arg-MCA – N-benzylloksykarbonylo-L-fenylalanylo-L-arginylo-7-(4-metylo)kumaryloamid;

Ac-Phe-Arg-NA-N- α -acylo-L-fenylalanylo-L-arginylo-naftyloamid; OC-I, OC-II – cystatyny ryżowe I, II; CC-I, CC-II, CI-4a – cystatyny kukurydziane I, II, I-4a; WCPI-3 – cystatyna ze słodzinu japońskiego; PMC – cystatyna z ziemniaka; m.cz. – masa cząsteczkowa; Ki – stała inhibicji

I. WSTĘP

Peptydazy cysteinowe to enzymy proteolityczne, które hydrolizują wiązania peptydowe z udziałem reaktywnych reszt cysteiny w centrum katalitycznym. Wyróżnia

się 14 ewolucyjnie spokrewnionych rodzin peptydaz cysteinowych, wśród nich najliczniejsza jest rodzina papainy obejmująca enzymy zawierające w swoich centrach katalitycznych reszty Gln, Cys, His, Asn [38]. Najlepiej poznane peptydazy z tej rodziny to roślinny enzym papaina oraz zwierzęce katepsyny B, H i L. Peptydazy cysteinowe rodziny papainowej stwierdzono u zwierząt, roślin i mikroorganizmów (głównie eukariotycznych). Mogą one występować zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowo [39]. U ssaków katepsyny występują głównie w lizosomach, choć ich obecność stwierdza się również w granulach wydzielniczych komórek produkujących hormony peptydowe. Katepsyny biorą udział w wewnątrzkomórkowym katabolizmie białek oraz w aktywacji swoistych proenzymów i prohormonów [45]. W pewnych stanach chorobowych (nowotworowych, zapalnych) enzymy te mogą ulegać sekrecji poza komórkę zachowując swoje katalityczne właściwości [14]. U niektórych stawonogów peptydazy cysteinowe rodziny papainowej występują w soku jelitowym i są uważane za enzymy trawienne [35, 38]. U roślin znajdowano je zarówno w wakuolach, jak i zewnątrzkomórkowo w soku mlecznym (lateksie). Wiadomo, że enzymy te są odpowiedzialne za pierwszy etap degradacji białek zapasowych w czasie kiełkowania nasion [42].

Aktywność peptydaz cysteinowych w komórkach i płynach ustrojowych jest kontrolowana przez ich endogenne inhibitory – cystatyny. Pierwszą cystatynę wyizolowano z białka jaja kurzego. Następne były izolowane z wielu tkanek i płynów ustrojowych, zarówno ludzkich jak i zwierzęcych. Wieloletnie badania nad inhibitorami peptydaz cysteinowych pochodzenia zwierzęcego wykazały, że ich struktura i właściwości są podobne, co pozwoliło zaliczyć je do jednej superrodziny cystatyn. Klasyfikację cystatyn zaproponował Barrett, wyróżniając cztery rodziny. I rodzina (stefiny) zawiera białka, składające się z około 100 reszt aminokwasowych (m.cz. około 11 kDa), nie mające części cukrowej oraz wiązań disiarczkowych. II rodzina (cystatyny) obejmuje białka składające się z około 115 reszt aminokwasowych (m.cz. ok. 14 kDa), bez komponenty cukrowej i zawierające w części C–końcowej dwie pętle stabilizowane wiązaniami disiarczkowymi. III rodzina (kininogeny) obejmuje jednołańcuchowe glikoproteiny (m.cz. 50–114 kDa), zawierające trzy lub więcej mostków disiarczkowych, zbudowane z trzech domen homologicznych z cystatynami z II rodziny (w tym dwóch inhibitorowo aktywnych) oraz kilku domen niehomologicznych. IV rodzina obejmuje białka nieinhibitorowe, takie jak glikoproteina bogata w histydyne czy α_2 HS-glikoproteina [13, 19]. Cystatyny hamują na ogół endopeptydazy cysteinowe z rodziny papainowej, takie jak: papaina, chymopapaina, ficyna, homologiczne lizosomalne peptydazy (katepsyny B, H i L), nie hamują jednak bromelainy. Wykazano również, że cystatyny mają zdolność hamowania egzopeptydazy – katepsyny C. Cystatyny łączą się ze zmodyfikowaną papainą, której cysteina w miejscu aktywnym została zalkilowana grupą karboksymetylową

lub karbamoilometylową, co wykorzystano do ich izolacji. Zmodyfikowanie papainy przez duże ugrupowania, takie jak E-64 (L-trans- epoksybursztyniło-leucyloamido (4-guanidyno) butan), stanowi przeszkodę do tworzenia kompleksu z cystatynami.

Cystatyny hamują aktywność peptydaz w sposób odwracalny. Cystatyna jaja kurzego hamuje kompetycyjnie papainę w stosunku stechiometrycznym 1:1. Kompleks cystatyna - papaina ulega dysocjacji podczas denaturacji w nieobecności czynników redukujących, dlatego też wyklucza się tworzenie stabilnego wiązania kowalencyjnego przy powstaniu kompleksu [15]. Mechanizm oddziaływania peptydaz cysteinowych z cystatynami został zaproponowany na podstawie struktur krystalograficznych papainy i cystatyny jaja kurzego przy wykorzystaniu wyników komputerowego modelowania molekularnego. Według tego modelu, cystatyny oddziałują z peptydazami cysteinowymi poprzez konserwatywny region (Gln⁵³ - Gly⁵⁷) o strukturze β -pętli, która znajduje się pomiędzy N-końcowym fragmentem (Leu¹ - Gly⁹) a drugą β -pętlą utworzoną przez fragment (Pro¹⁰³ - Leu¹⁰⁵). Obydwie pętle i N-koniec tworzą specyficzną konformację w kształcie klina, który jest komplementarny do centrum aktywnego papainy. N-końcowy segment cystatyny białka jaja kurzego bezpośrednio oddziałuje z kieszenią wiążącą S2 centrum aktywnego (wg terminologii Schechtera i Bergera [14]), ale jego konformacja oraz zbyt duża odległość od Cys²⁵ nie pozwala na rozszczepienie wiązania peptydowego w cystatynie [44]. Słuszność tej koncepcji została potwierdzona w badaniach nad strukturą kompleksu S-karboksymetylowanej papainy ze stefiną B [43], a także przez dane kinetyczne otrzymane dla oddziaływań natywnych i/lub zmodyfikowanych cystatyn z różnymi peptydazami cysteinowymi [12, 16, 31, 32]. Rola fizjologiczna cystatyn nie jest dobrze poznana. Sugeruje się, że biorą one udział w ochronie komórek przed niekontrolowaną proteolizą i w regulacji peptydaz cysteinowych własnego, bakteryjnego i wirusowego pochodzenia [17, 21].

Specyficzne białkowe inhibitory peptydaz serynowych pochodzenia roślinnego są znane od dawna. Wiele z nich scharakteryzowano i sklasyfikowano [18]. Niewiele wiadomo na temat roślinnych inhibitorów innych peptydaz. O występowaniu specyficznych inhibitorów peptydaz cysteinowych u roślin donieśli po raz pierwszy Meenakshi i wsp. [33] w 1980 r. Badacze ci stwierdzili obecność białkowych inhibitorów w ekstraktach z kultur tkankowych roślin kilkunastu gatunków. Od tego czasu inhibitory takie izolowano z wielu roślin. Niektóre z nich zaliczono do superrodziny cystatyn ze względu na budowę i właściwości inhibitorowe. Trwa dyskusja nad tym, czy wyróżnić nową rodzinę – fitocystatyn, czy też przyporządkować poznane cystatyny roślinne do jednej z trzech rodzin cystatyn zwierzęcych [25, 30]. Najlepiej scharakteryzowanymi cystatynami roślinnymi są cystatyny z ryżu (*Oryza sativa*). Początkowo badano głównie cystatyny izolowane z nasion [3, 5]. Otrzymanie cDNA oryzacystatyny I i II (OC-I i OC-II) z biblioteki λ gt10 niedojrzałych nasion ryżu pozwoliło na ustalenie ich sekwencji i opracowanie systemu ekspresji w *Escherichia coli*. Oryzacystatyna I została otrzymana jako białko fuzyjne, zawierające 27-ami-

nokwasową sekwencję bakteryjną, poprzedzającą właściwą sekwencję cystatyny [1, 2]. Oryzacystatynę II udało się otrzymać w postaci dokładnie odpowiadającej ustalonej uprzednio sekwencji [30]. Obecność OC I i OC II w nasionach została potwierdzona przy pomocy techniki *western-blotting* z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko tym białkom [1, 30]. Porównanie składu aminokwasowego inhibitora izolowanego z nasion i OC-I sugeruje, że są to te same białka [2]. Wśród cystatyn pochodzących z kukurydzy (*Zea mays*) tylko inhibitor oznaczony CI-4a został wyizolowany z nasion [9, 10]. Cystatynę kukurydzianą I (CC-I) otrzymano jako produkt ekspresji plazmidu kodującego 105 aminokwasów (Glu³¹ - Ala¹³⁵) w *Escherichia coli*. Sekwencja pierwszych 30 aminokwasów (Met¹ - Lys³⁰) stanowi najprawdopodobniej peptyd sygnałowy niedojrzałego białka. N-koniec dojrzałej cząsteczki nie jest jednak dokładnie znany [7, 8]. W innych badaniach obie cystatyny kukurydziane CC-I i CC-II zostały uzyskane jako białka fuzyjne złożone z sekwencji pozbawionej odpowiedniego peptydu sygnałowego i z sekwencji polilinkera [6]. Cystatyna z awokado (*Persea americana*) jest dotychczas jedyną cystatyną wyizolowaną z owocu [28]. Inhibitory peptydaz cysteinowych, o właściwościach cystatyn, wyizolowano także z bulw ziemniaka (*Solanum tuberosum*) [46], nasion soi (*Glycine max*) [24], nasion słodkownika japońskiego (*Wisteria floribunda*) WCPI-3 [25] i mchu (*Collema leptosporum* Malme) [36]. Cystatyna z rośliny *Ambrosia artemisiifolia* (brak polskiej nazwy) nie została dotychczas wyizolowana, znana jest tylko jej sekwencja, uzyskana na podstawie cDNA [40]. Celem tej pracy jest usystematyzowanie informacji na temat cystatyn roślinnych oraz porównanie ze znacznie lepiej poznanymi cystatynami pochodzenia zwierzęcego.

II. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE

Właściwości fizykochemiczne najlepiej poznanych roślinnych inhibitorów peptydaz cysteinowych zostały zebrane w tabeli 1. Prawie wszystkie znane cystatyny roślinne są białkami o niskiej masie cząsteczkowej rzędu kilkunastu kDa. Wyjątek stanowi cystatyna wyizolowana z ziemniaka (PMC) o m.c. 85 kDa. Jest to białko złożone z ośmiu cystatynowych domen o masie cząsteczkowej około 10 kDa każda, połączonych sekwencjami wrażliwymi na działanie takich peptydaz, jak: trypsyna, chymotrypsyna, proteinaza K i subtylizyna [46]. Najmniejszą poznaną cystatyną roślinną jest cystatyna z kukurydzy CI-4a (m.c. 9,2 kDa), która może być jednak fragmentem CC-I, powstałym w wyniku ograniczonej proteolizy w procesie oczyszczania [7]. Białka te składają się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego i nie zawierają części cukrowej. Punkty izoelektryczne cystatyn roślinnych są zbliżone i wynoszą od 5,0 do 6,0. Inhibitory te nie zawierają wiązań disiarczkowych i reszt cysteinowych. Cystatyny roślinne są termostabilne i pH-stabilne, np. OC-I jest trwałą

TABELA 1. Właściwości fizykochemiczne cystatyn roślinnych

Źródło inhibitora	Inhibitor	Masa cząst. (liczba aminokw.)	pI	Obecność cysteiny	Literatura
Nasiona ryżu	OC-I	(102)	5,3	brak	2
	OC-II	(107)	—	brak	30
Nasiona kukurydzy	CC-I	13 kDa	—	brak	7, 8
	CC-II	13 kDa	—	brak	6
	CI-4a	9,2 kDa	5,2	brak	9, 10
Nasiona soi	SCPI	12 kDa	5,3	—	24
Nasiona słodkownika japońskiego	WCPI-3	15,7–17,5 kDa	5,7	brak	25
Mech	3 inhibitory	20 kDa	—	—	36
Bulwa ziemniaka	PMC	85 kDa	—	brak	46
Pyłek <i>Ambrosia artemisiifolia</i>	IPC1/5	(92)	—	brak	40

w czasie 30 min ogrzewania w temperaturze do 100°C w pH 7,0 oraz nie ulega inaktywacji przez 3 godz. w temperaturze 37°C w zakresie pH od 2,2 do 9,0 [5]. Właściwości fizykochemiczne cystatyn roślinnych i cystatyn zwierzęcych z I i II rodziny są podobne. Ze względu na brak wiązań disiarczkowych cystatyny roślinne są najbardziej zbliżone do inhibitorów z I rodziny.

III. STRUKTURA PIERWSZORZĘDOWA

Sekwencje aminokwasowe cystatyn roślinnych oraz wybranych przedstawicieli cystatyn zwierzęcych zostały zestawione na rysunku 1. Wszystkie cystatyny roślinne, których sekwencja aminokwasowa jest znana, zawierają sekwencję Gln-Val-Val-Ala-Gly (53–57 wg numeracji cystatyny białka jaja kury) albo homologiczną z nią Gln-Xaa-Val-Xaa-Gly. Konserwatywna jest również reszta Gly w regionie N-końca (Gly⁹ w cystatynie białka jaja kury). Nie występuje ona tylko w przypadku OC-II. Obydwa powyższe fragmenty sekwencji uważane są za kluczowe w interakcji cystatyna – peptydaza cysteinowa. Analiza podobieństw w obrębie sekwencji aminokwasowych przeprowadzona programem komputerowym Clustal V Multiple Sequence Alignments [22] wskazuje, że cystatyny roślinne są najbardziej zbliżone do cystatyn z I i II rodziny (odpowiednio 19,2% i 17,8%). W przypadku przedstawicieli III rodziny podobieństwo to jest mniejsze (15,0%). W obrębie sekwencji cystatyn roślinnych występują jednak sekwencje typowe dla przedstawicieli II ro-

dziny, a w szczególności sekwencja Phe-Ala-Val, obecna w cystatynach z kukurydzy, cystatynach z ryżu oraz w cystatynie z ziemniaka. Cystatyny roślinne wykazują wysoki procent identyczności sekwencji (ok. 50% lub więcej). Na uwagę zasługuje bardzo wysoka homologia cystatyn CC-I, CC-II i OC-I (70%), znacznie wyższa niż w przypadku OC-I i OC-II (55%). Przepuszczalnie mogą one mieć podobne właściwości fizjologiczne, inne niż OC-II. Świadczyć o tym mogą także różnice w poziomie i profilu ekspresji mRNA tych inhibitorów podczas dojrzewania nasion, co omówiono szerzej w rozdziale V. Również inhibitor z awokado i OC-I wykazują wyższą homologię (60%) niż oba izoinhibitory. Prawdopodobnie dywergencja OC-I i OC-II zaszła przed zróżnicowaniem się roślin na jedno- i dwuliścienne. Wysoka homologia cystatyny z awokado i pozostałych cystatyn wskazuje, że cystatyny z owoców i nasion wykazują jedynie nieznaczne różnice [28]. Na rysunku 2 przedstawiono dendrogram, odzwierciedlający podobieństwa pomiędzy analizowanymi cystatynami.

IV. WŁAŚCIWOŚCI INHIBITOROWE

1. Hamowanie peptydaz

Właściwości inhibitorowe cystatyn roślinnych zastały najlepiej przebadane wobec papainy oraz katepsyn B, H i L. Stałe inhibicji (K_i) wymienionych peptydaz zebrano w tabeli 2. Rekombinowane cystatyny ryżowe wykazują różną aktywność hamującą w stosunku do peptydaz cysteinowych. OC-II jest około 10-krotnie słabszym inhibitorem, zarówno papainy jak i katepsyn H i L, w stosunku do OC-I. Izolowany z nasion i rekombinowany OC-I wykazują podobne stałe inhibicji w stosunku do papainy. Prawdopodobnie sekwencja polilinkera poprzedzająca N-koniec OC-I nie ma znaczącego wpływu na jego właściwości inhibitorowe [1]. Inhibitory kukurydziane CC-I i CC-II silniej hamują katepsyny H i L niż papainę. Z kolei CC-II jest około 100-krotnie silniejszym inhibitorem katepsyny L niż CC-I [6]. CI-4a hamuje aktywność papainy w podobnym stopniu jak CC-I i CC-II, jest jednak znacznie słabszym inhibitorem katepsyny H. Cystatyny roślinne nie hamują znacząco aktywności katepsyny B, jedynie CC-I i CC-II są jej słabymi inhibitorami [6]. Inhibitor z nasion słodkownika japońskiego (WCPI-3) i inhibitor z mchu oznaczony numerem III okazały się silniejszymi inhibitorami papainy niż cystatyny ryżowe i kukurydziane. Nie przebadano ich aktywności inhibitorowej wobec katepsyn [25, 36]. PMC z ziemniaka, jak i jego fragmenty trypsynowe, są najlepszymi inhibitorami papainy spośród cystatyn roślinnych, co więcej, PMC może wiązać jednocześnie osiem cząsteczek tego enzymu [46].

Najlepiej poznana cystatyna ryżowa OC-I, cystatyna z ziemniaka (PMC) oraz cystatyna z nasion kukurydzy oznaczona CI-4a nie hamują bromelainy, co prawdopodobnie odnosi się także do innych cystatyn roślinnych [5, 10, 46]. Cystatyna

TABELA 2. Stałe inhibicji (K_i) cystatyn roślinnych wobec wybranych peptydaz cysteinowych

Źródło inhibitora	Inhibitor	K_i [M]				Literatura
		papaína	katepsyna B	katepsyna H	katepsyna L	
Nasiona ryżu	OC-I	$3,2 \times 10^{-8}$ (BANA)	b.i. (BANA)	$7,8 \times 10^{-8}$ (ANA)	$5,1 \times 10^{-9}$ (Z-Phe-Arg-MCA)	29
	OC-II	$2,6 \times 10^{-7}$ (BANA)	$8,2 \times 10^{-6}$ (BANA)	$2,5 \times 10^{-7}$ (ANA)	$3,9 \times 10^{-8}$ (Z-Phe-Arg-MCA)	29
Nasiona kukurydzy	CC-I	$3,7 \times 10^{-8}$ (BANA)	$2,9 \times 10^{-7}$ (BANA)	$5,7 \times 10^{-9}$ (ANA)	$1,7 \times 10^{-8}$ (Z-Phe-Arg-MCA)	6
	CC-II	$6,6 \times 10^{-8}$ (BANA)	$1,3 \times 10^{-7}$ (BANA)	$1,1 \times 10^{-9}$ (ANA)	$1,1 \times 10^{-10}$ (Z-Phe-Arg-MCA)	6
	CI-4a	$2,3 \times 10^{-8}$ (BANA)	$1,6 \times 10^{-5}$ (BANA)	$2,3 \times 10^{-8}$ (BANA)	—	9
Nasiona słodliu japońskiego	WCPI-3	$6,1 \times 10^{-9}$ (BAPA)	—	—	—	25
Bulwa ziemniaka	PMC	$1,0 \times 10^{-10}$ (BAPA)	—	—	—	46
Mech	I	$2,8 \times 10^{-7}$ (Ac-Phe-Arg-NA)	—	—	—	36
	II	$8,2 \times 10^{-9}$ (Ac-Phe-Arg-NA)	—	—	—	36
	III	$6,3 \times 10^{-10}$ (Ac-Phe-Arg-NA)	—	—	—	36

* – brak znaczącej inhibicji, – brak danych, w nawiasach podano nazwy substratów użytych do oznaczeń K_i

z soi i cystatyny ryżowe wykazują aktywność hamującą także w stosunku do peptydaz cysteinowych, zawartych w ekstraktach jelitowych larw kilku gatunków chrząszczy. Ze względu na związek z fizjologiczną rolą cystatyn roślinnych właściwości te zostały szerzej omówione w następnym rozdziale.

Ogólnie mówiąc, cystatyny roślinne są dużo słabszymi inhibitorami peptydaz cysteinowych niż cystatyny zwierzęce. Wartość stałej inhibicji najsilniejszego spośród cystatyn roślinnych, inhibitora papaíny – PMC wynosi 0,1 nM. W przypadku cystatyn zwierzęcych wartości te są o wiele niższe i wynoszą w przypadku cystatyny kurzej, stefiny A i cystatyny C odpowiednio 0,005, 0,019 i 0,005 nM. Podobnie przedstawiają się różnice w hamowaniu katypsiny H i L [15]. Cystatyny roślinne, w przeciwieństwie do cystatyn zwierzęcych, praktycznie nie hamują katepsyny B.

2. Mechanizm inhibicji

Cystatyny roślinne tworzą równomolarnie kompleksy z papaíną [5, 7, 25] i S-karboksymetylowaną papaíną [11, 24]. Dokładnego mechanizmu ich oddziaływania

z peptydazami cysteinowymi jeszcze nie znamy. Pewne dane na ten temat uzyskano w wyniku analizy właściwości inhibitorowych mutantów rekombinacyjnych ryżowej OC-I. Obcięcie 21-aminokwasowej sekwencji N-końcowej, zawierającej wysoce konserwatywną resztę Gly⁹ lub 11-aminokwasowej sekwencji z C-końca cząsteczki nie powodowało zmiany stałej inhibicji wobec papainy. Regiony N- i C- końcowe cząsteczek cystatyn roślinnych nie biorą prawdopodobnie udziału w interakcji z enzymem. Mutacje w obrębie wysoce konserwatywnej sekwencji cystatyn Gln-Val-Val-Ala-Gly (53–57 według numeracji cystatyny kurzej) miały natomiast znaczny wpływ na właściwości inhibitorowe OC-I. Mutacja Gln⁵³ → Pro powodowała całkowity zanik aktywności, a mutacja Gln⁵³ → Leu i Val⁵⁵ → Asp powodowały podwyższenie stałej inhibicji odpowiednio 150 i 40 razy. Wskazuje to na kluczowe znaczenie tej sekwencji w interakcji cystatyna – peptydaza, również w przypadku cystatyn roślinnych. Bezpośredni kontakt tego regionu z centrum aktywnym papainy sugerują również badania nad cystatyną ze słodkownika japońskiego. Obecność Lys w miejsce konserwatywnej reszty Gln w WCPI-3 jest prawdopodobnie powodem braku powstawania kompleksu z S-karboksymetylowaną papainą. Przypuszczalnie, WCPI-3 tworzy z natywną papainą bardziej zwarty kompleks niż inne cystatyny [25]. W OC-II sekwencja ta różni się jednym aminokwasem (Gln-Val-Val-Gly-Gly). Również sekwencja Pro-Trp (103–104 według numeracji cystatyny kurzej), istotna dla właściwości inhibitorowych cystatyn zwierzęcych i obecna w OC-I, zmieniona jest w OC-II na Ala-Trp. W powyższych różnicach strukturalnych upatruje się przyczyny różnej specyficzności inhibitorowej OC-I i OC-II [30].

V. ROLA FIZJOLOGICZNA CYSTATYN ROŚLINNYCH

Funkcja naturalnie występujących inhibitorów peptydaz jest dwojaka:

(1) zapobieganie niekontrolowanej proteolizie wewnątrz komórek, w przestrzeni międzykomórkowej i w płynach ustrojowych, gdzie ograniczona proteoliza jest ważna dla procesów fizjologicznych,

(2) ochrona komórek, macierzy międzykomórkowej i płynów ustrojowych przed obcymi enzymami proteolitycznymi. Specyficzne funkcje większości inhibitorów peptydaz nie są jeszcze dokładnie poznane.

Jedną z lepiej udokumentowanych funkcji peptydaz cysteinowych u roślin jest ich udział w mobilizacji białek zapasowych podczas kiełkowania. Enzymy te są syntetyzowane *de novo* przez część osiową zarodka i/lub warstwę aleuronową, a następnie transportowane do wakuoli lub bielma (zboża), gdzie biorą udział w początkowych etapach procesu kiełkowania [26, 37, 42]. Udział cystatyn w kontrolowaniu aktywności endogennych peptydaz w okresie dojrzewania i kiełkowania nasion wydaje się bardzo prawdopodobny. Badania immunohistochemiczne nasion kukurydzy wykazały, że CC-I jest obecny głównie w komórkach warstwy aleuronowej i zarodka [7]. Stwierdzono również, że poziom mRNA tego inhibitora

jest najwyższy dwa tygodnie po zakwitnięciu rośliny i utrzymuje się przez cały okres dojrzewania nasion. Dwa tygodnie po zapyleniu obserwuje się natomiast ekspresję mRNA głównego białka zapasowego kukurydzy – zeiny [8]. Podobnie, poziom mRNA oryzacystatyny I osiąga maksimum dwa tygodnie po zakwitnięciu i stopniowo spada aż do zupełnego zaniku po 10 tygodniach. Jego ekspresja wyprzedza o tydzień ekspresję mRNA dla gluteiny – głównego białka zapasowego ryżu [2]. Profile ekspresji mRNA OC-II i OC-I różnią się. Synteza mRNA OC-II rozpoczyna się tydzień wcześniej i utrzymuje się aż do całkowitego dojrzenia nasion, na poziomie jednak znacznie niższym niż synteza mRNA OC-I [30]. Wykazanie udziału cystatyn w regulacji tych procesów wymaga stwierdzenia obecności ich kompleksów z peptydazami *in vivo*. Dotychczas wykazano jedynie w badaniach *in vitro*, że cystatyna z nasion ryżu silnie hamuje peptydazę ($K_i = 1,6 \text{ nM}$), wyizolowaną z kielkujących nasion ryżu, która wydajnie hydrolizuje gluteinę [4].

Peptydazy cysteinowe są głównym składnikiem systemów trawiennych larw szkodników nasion roślin strączkowych. Wyizolowano i częściowo scharakteryzowano peptydazy cysteinowe z jelit cienkich larw strąkowca fasolowego (*Acanthoscelides obtectus*) i strąkowca plamistego (*Callosobruchus maculatus*) [35]. Wykazano również, że enzymy te są istotne dla normalnego wzrostu i rozwoju owadów. Hines i wsp. [23] badali rozwój chrząszczy wybranych gatunków, uzupełniając ich dietę specyficznymi inhibitorami peptydaz serynowych i cysteinowych. Monitorowano śmiertelność i przebieg rozwoju, zaczynając od stadium jaja aż do osiągnięcia przez owady dojrzałości osobniczej. Dodanie do diety E-64, silnego i specyficznego inhibitora peptydaz cysteinowych, hamowało rozwój i powodowało większą śmiertelność larw strąkowca fasolowego, strąkowca plamistego i stonki ziemniaczanej (*Leptinotarsa decemlineata*). Działanie takie zostało odwrócone u strąkowca fasolowego przez dodanie do diety wolnych aminokwasów w ilości takiej, jaka znaduje się w fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*). Wykorzystanie peptydaz cysteinowych do trawienia pokarmu białkowego może być ewolucyjnym przystosowaniem, które pozwala chrząszczom żywić się nasionami roślin strączkowych lub innym materiałem roślinnym, wzbogaconym w inhibitory peptydaz serynowych.

Cystatyny prawdopodobnie mają znaczenie w naturalnej obronie roślin, hamując peptydazy cysteinowe szkodników. Cystatyna z soi wykazuje aktywność hamującą w stosunku do peptydaz cysteinowych zawartych w ekstraktach jelitowych larw chrząszczy kilku gatunków. Inhibitor ten wykazywał największą aktywność wobec peptydaz z jelita strąkowca plamistego (*Callosobruchus maculatus*) i trojszyka kasztanowego (*Tribolium castaneum*) [24], dużo słabszą natomiast wobec peptydaz jelitowych strąkowca fasolowego (*Acanthoscelides obtectus*). Dokładnie nie wiadomo, czy różnice w stopniu hamowania aktywności peptydazowej tych ekstraktów wynikają z różnej aktywności inhibitora wobec peptydaz cysteinowych występujących u różnych owadów, czy też z obecności innych peptydaz nie hamowanych przez ten inhibitor. Wykazano również, że ryżowy OC-I hamuje peptydazy cy-

steinowe zawarte w ekstraktach jelitowych wołka ryżowego (*Sitophilus oryzae*) i trojszyka kasztanowego [6]. Wzrost tego ostatniego został ograniczony o 35% przez 10% dodatek cystatyny z nasion ryżu do jego diety [20]. Oba inhibitory ryżowe OC-I i OC-II wykazywały znaczny wpływ na całkowitą aktywność proteolityczną ekstraktów jelitowych larw stonki ziemniaczanej, a maksymalna inhibicja zmieniała się w zakresie od 20 do 80% w zależności od pH 5,0–7,0. Wpływ pH na wydajność hamowania związany był z selektywną inaktywacją katepsyny H, obecnej w ekstrakcie, która jest słabo aktywna w pH 5,0, a największą aktywność osiąga w pH 7,0 [34]. Powyższe wyniki wskazują, że cystatyny roślinne są dobrymi kandydatami do dalszych badań w kierunku uzyskania nasion o zwiększonej odporności na owady.

Cystatyny ryżowe hamują również replikację *in vitro* poliovirusa w zakażonych komórkach *Vero*. Poliowirus z rodziny pikornawirusów, wykorzystuje w trakcie replikacji własną peptydazę cysteinową do przetwarzania swoich białek. OC-I pozabawiony 25 N-końcowych aminokwasów wykazywał większą aktywność niż inhibitor niezmodyfikowany, ujawniając swoje działanie w stężeniach mniejszych niż 0,25 nmol/ml. Inhibitory proteinaz cysteinowych o niskiej masie cząsteczkowej: E-64, E-64c (L-trans-Epoksybursztynilo-leucyloamido (3-metylo) butan) i loksystatyna nie wykazują działania antywirusowego [29]. Możliwe, że cystatyny chronią rośliny przed wirusami. Udział peptydaz cysteinowych w obróbce białek wirusów roślinnych jest dość powszechny [39].

Sugeruje się, że inhibitory proteinaz cysteinowych występujące w mchu (*Collema leptosporum*) mogą kontrolować wewnątrzkomórkową proteolizę, niezbędną w przemianach białek oraz mogą stanowić barierę ochronną dla mchów przed roślinnymi peptydazami cysteinowymi. Inhibitory te prawdopodobnie uczestniczą w procesach symbiotycznych mchów [36].

VI. UWAGI KOŃCOWE

Zainteresowanie cystatynami wynika w dużej mierze z możliwości ich zastosowania terapeutycznego w przypadkach, gdy niekontrolowana aktywność peptydaz cysteinowych jest jedną ze składowych patomechanizmu choroby. Niektóre inhibitory peptydaz serynowych, takie jak α 1-inhibitor proteinaz czy inhibitor trypsyny z trzustki bydłowej typu Kunitza znalazły już zastosowanie w leczeniu [15, 27]. Oprócz specyficzności w stosunku do peptydaz cysteinowych, szczególnie interesująca jest mała masa cząsteczkowa cystatyn, gdyż przy podawaniu tego typu leków niebezpieczeństwo odpowiedzi alergicznej i immunologicznej wzrasta z masą cząsteczkową. Ważna jest także ich termo- i pH-stabilność. Materiał roślinny może być tanim i łatwo dostępnym źródłem tych inhibitorów. Co więcej, badania nad cystatyną z nasion ryżu wskazują, że cystatyny roślinne mogą być lepszym niż cystatyny zwierzęce materiałem wyjściowym do ewentualnej modyfikacji w procesie

opracowywania terapeutycznego. Inhibitor ten, w przeciwieństwie do cystatyn zwierzęcych, nie traci aktywności ani w wyniku znacznego skrócenia jego N-końca, ani w wyniku dołączenia do niego dodatkowego peptydu.

Badania nad cystatynami roślinnymi są także obiecujące ze względu na zdolność tych inhibitorów do hamowania aktywności peptydazowej soków trawiennych niektórych szkodników roślin. Transformacja roślin za pomocą genów kodujących cystatyny, wyposażonych w silne promotory, może być w przyszłości strategią, umożliwiającą zwiększenie odporności roślin na szkodniki. Dla takich roślin, jak ziemniak i pomidor, technologie transformowania zostały już opracowane [41].

Wiedza na temat cystatyn roślinnych jest jeszcze dość skąpa. Nie można więc na razie podać pełnego zestawu cech, charakteryzujących cystatyny roślinne, co było możliwe w przypadku cystatyn zwierzęcych. Cystatyny roślinne wykazują jednak na tyle wysoki % identyczności sekwencji, zbliżone właściwości fizykochemiczne i inhibitorowe, że wyróżnienie rodziny – fitocystatyn wydaje się w pełni uzasadnione. Poznanie struktur krystalograficznych cystatyn roślinnych ułatwiłoby ich klasyfikację.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABE K, EMORI Y, KONDO H, ARAI S, SUZUKI K. The NH₂-terminal amino acid residues are not essential for the papain - inhibitory activity of oryzacystatin, a member of the cystatin superfamily. *J Biol Chem* 1988; **263**: 7655–7659.
- [2] ABE K, EMORI Y, KONDO H, SUZUKI M, ARAI S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. *J Biol Chem* 1987; **262**: 16793–16797.
- [3] ABE K, KONDO H, ARAI S. Purification of cysteine proteinase inhibitor from rice. *Agric Biol Chem* 1985; **49**: 3349–3350.
- [4] ABE K, KONDO H, ARAI S. Purification and properties of a cysteine proteinase from germinating rice seeds. *Agric Biol Chem* 1987; **51**: 1509–1514.
- [5] ABE K, KONDO H, ARAI S. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. *Agric Biol Chem* 1987; **51**: 2763–2768.
- [6] ABE M, ABE K, DOMOTO C, ARAI S. Two distinct species of corn cystatin in corn kernels. *Biosci Biotech Biochem* 1995; **59**: 756–758.
- [7] ABE M, ABE K, IWABUCHI K, DOMOTO CH, ARAI S. Corn cystatin I expressed in *Escherichia coli*: investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels. *J Biochem* 1994; **116**: 488–492.
- [8] ABE M, ABE K, KURODA M, ARAI S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. *Eur J Biochem* 1992; **209**: 933–937.
- [9] ABE M, ARAI S. Some properties of a cysteine proteinase inhibitor from corn endosperm. *Agric Biol Chem* 1991; **55**: 2417–2418.
- [10] ABE M, WHITAKER JR. Purification and characterization of a cysteine proteinase inhibitor from the endosperm of corn. *Agric Biol Chem* 1988; **52**: 1583–1584.
- [11] ARAI S, WATANABE H, KONDO H, EMORI Y, ABE K. Papain - inhibitory activity of oryzacystatin, a rice seed cysteine proteinase inhibitor, depends on the central Gln-Val-Val-Ala-Gly region conserved among cystatin superfamily members. *J Biochem* 1991; **109**: 294–298.

- [12] AUERSWALD EA, GENENGER G, ASFFALG-MACHLEIDT I, MACHLEIDT W, ENGH RA, FRITZ H. Hairpin loop mutation of chicken cystatin have difference effect on the inhibition of cathepsin B, cathepsin L and papain. *Eur J Biochem* 1992; **209**: 837–845.
- [13] BARRETT AJ. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 1987; **12**: 193–196.
- [14] BARRETT AJ, BUTTLE DJ, MASON RW. Lysosomal cysteine proteinases. [w] *I.S.I. Atlas for Science: Biochemistry* 1988: 256–260.
- [15] BARRETT AJ, RAWLINGS ND, DAVIES ME, MACHLEIDT W, SALVESEN G, TURK V. Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. [w] BARRETT AJ, SALVESEN G [red.] *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t 12., Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier 1986: 515–569.
- [16] BJÖRK I, ALRIKSSON E, YLINENJÄRVI K. Kinetics of binding of chicken cystatin to papain. *Biochemistry* 1989; **28**: 1568–1573.
- [17] BOBEK LA, LEVINE MJ. Cystatins – inhibitors of cysteine proteinases. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992; **3**: 307–332.
- [18] BODE W, HUBER R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem* 1992; **204**: 433–451.
- [19] CALKINS CC, SLOANE BF. Mammalian cysteine proteinase inhibitors: biochemical properties and possible roles in tumor progression. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1995; **376**: 71–80.
- [20] CHEN MING-SHUN, JOHNSON B, WEN L, MUTHUKRISHNAN S, KRAMER K, MORGAN T, REECK G. Rice cystatin: bacterial expression, purification, cysteine proteinase inhibitory activity and insect growth suppressing activity of a truncated form of the protein. *Protein Expression and Purification* 1992; **3**: 41–49.
- [21] DIECKMANN T, MITSCHANG L, MECHTILD H, KOS J, TURK V, AUERSWALD EA, JAENICKE R, OSCHKINAT H. Structures of native phosphorylated chicken cystatin and of a recombinant unphosphorylated variant in solution. *J Mol Biol* 1993; **234**: 1048–1059.
- [22] HIGGINS DG, SHARP PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS* 1989; **5**: 151–153.
- [23] HINES ME, NIELSEN SS, SHADE RE, POMEROY MA. The effect of two proteinase inhibitors, E-64 and the Bowman-Birk inhibitor, on the developmental time and mortality of *Acanthoscelides obtectus*. *Entomol Exp Appl* 1990; **57**: 201–207.
- [24] HINES ME, OSUALA CJ, NIELSEN SS. Isolation and partial characterization of a soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of Coleopteran digestive proteolytic activity. *J Agric Food Chem* 1991; **39**: 1515–1520.
- [25] HIRASHIKI J, OGATA F, YOSHIDA N, MAKISUMI S, ITO A. Purification and complex formation analysis of a cysteine proteinase inhibitor (cystatin) from seeds of *Wisteria floribunda*. *J Biochem* 1990; **108**: 604–608.
- [26] JONES BL, POULLE M. A proteinase from germinated barley. II. Hydrolytic specificity of a 30 kilodalton cysteine proteinase from green malt. *Plant Physiol* 1990; **94**: 1062–1070.
- [27] KASZA A, ŁĄCZKA A. Możliwości terapeutycznego zastosowania modyfikowanych, syntetycznych i otrzymanych w drodze rekombinacji inhibitorów proteinaz serynowych. *Postępy Biologii Komórki* 1994; **21**: 143–156.
- [28] KIMURA M, IKEDA T, FUKUMOTO D, YAMASAKI M, YONEKURA M. Primary structure of a cysteine proteinase inhibitor from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill). *Biosci Biotech Biochem* 1995; **59**: 2328–2329.
- [29] KONDO H, IJIRI S, ABE K, MAEDA H, ARAI S. Inhibitory effect of oryzacystatins and a truncation mutant on the replication of poliovirus in infected *Vero* cells. *FEBS Lett* 1992; **299**: 48–50.
- [30] KONDO H., ABE K, NISHIMURA I, WATANABE H, EMORI Y, ARAI S. Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. *J Biol Chem* 1990; **265**: 15832–15837.

- [31] LINDAHL P NYCANDER M, YLINENJÄRVI K, POL E, BJÖRK I. Characterization by rapid - kinetic and equilibrium methods of the interaction between N-terminally truncated forms of chicken cystatin and the cysteine proteinases papain and actinidin. *Biochem J* 1992; **286**: 165–171.
- [32] MACHLEIDT W, THIELE U, LABER B, ASFFALG-MACHLEIDT I, ESTERL A, WIEGAND G, KOS J, TURK V, BODE W. Mechanism of inhibition of papain by chicken egg white cystatin. Inhibition constants of N-terminally truncated forms and cyanogen bromide fragments of the inhibitor. *FEBS Lett* 1989; **243**: 234–238.
- [33] MEENAKSHI K, RELE V, VARTAK HG, JAGANNATHAN V. Proteinase inhibitors from *Vigna Unguiculata* subsp. *cylindrica*. *Arch Biochem Biophys* 1980; **204**: 117–128.
- [34] MICHAUD D, NGUYEN - QUOC B, YELLE S. Selective inhibition of Colorado potato beetle cathepsin H by oryzacystatins I and II. *FEBS Lett* 1993; **331**: 173–176.
- [35] MURDOCK LL, BROOKHART G, DUNN PE, FOARD DE, KELLY S, KITCH L, SHADE RE, SCHUKLE RH, WOLFSON JL. Cysteine digestive proteinases in *Coleoptera*. *Comp Biochem Physiol* 1987; **87B**: 783–787.
- [36] OLIVA MLV, MENDES CR, BUENO NR, HONDA NK, SAMPAIO MV, SAMPAIO CAM. Cysteine proteinase inhibitors in Lichen (*Collema Leptosporum* Malme). *Brazilian J Med Biol Res* 1992; **25**: 999–1002.
- [37] POULLE M, JONES BL. A proteinase from germinating barley. I. Purification and some physical properties of a 30 kilodalton cysteine endoproteinase from green malt. *Plant Physiol* 1988; **88**: 1454–1460.
- [38] RAWLINGS ND, BARRETT AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 1993; **290**: 205–218.
- [39] RAWLINGS ND, BARRETT AJ. Families of cysteine peptidases. *Methods in Enzymol* 1994; **244**: 461–486.
- [40] ROGERS B, POLLOCK J, KLAPPER D, GRIFFITH I. Sequence of the proteinase-inhibitor cystatin homologue from the pollen of *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed). *Gene* 1993; **133**: 219–221.
- [41] RYAN C. Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defences against herbivores. *BioEssays* 1989; **10**: 20–23.
- [42] SHUTOV AD, VAINTRAUB IA. Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry* 1987; **26**: 1557–1566.
- [43] STUBBS MT, LABER B, BODE W, HUBER R, JERALA R, LENARCIC B, TURK V. The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *EMBO J* 1990; **9**: 1930–1947.
- [44] TURK V, BODE W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 1991; **285**: 213–219.
- [45] UCHIYAMA Y, WAGURI S, SATO N, WATANABE T, ISHIDO K, KOMINAMI E. Cell and tissue distribution of lysosomal cysteine proteinases, cathepsins B, H, and L, and their biological roles. *Acta Histochem. Cytochem* 1994; **27**: 287–308.
- [46] WALSH TA, STRICKLAND JA. Proteolysis of the 80-kilodalton crystalline cysteine proteinase inhibitor from potato releases functional cystatin domains. *Plant Physiol* 1993; **103**: 1227–1234.

Otrzymano: 06.03.1996 r.

Przyjęto: 18.04.1996 r.

Adres autora: Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej,
50-139 Wrocław, ul. Szewska 38/39,

BIAŁKA WIĄŻĄCE GTP: BUDOWA I FUNKCJE*

GTP-BINDING PROTEINS: STRUCTURE AND FUNCTIONS

Andrzej TRETYN

Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, Uniwersytet Mikołaja Kopernika
w Toruniu

Streszczenie: Wiele bodźców natury fizycznej lub chemicznej aktywuje zlokalizowane w błonie komórkowej receptory. Odebrane z zewnętrznej strony błony informacje przekazywane są poprzez heterotrimerowe białka wiążące GTP (białka G lub Gp) na występujące po jej cytoplazmatycznej stronie efekторы. Modulacja aktywności efektorów wpływa na zmiany w stężeniu wtórnych przekaźników informacji, które z kolei stymulują powstanie odpowiedzi komórkowych. Powszechnie przyjmuje się, że heterotrimerowe białka G pełnią centralną rolę w kontroli przepływu informacji w komórkach eukariotycznych. Poza heterotrimerowymi, u zwierząt i roślin wykryto również tzw. "małe" lub niskocząsteczkowe białka wiążące GTP. W niniejszej pracy omówione zostaną niektóre właściwości heterotrimerowych i niskocząsteczkowych białek wiążących GTP, funkcjonujących zarówno u zwierząt, jak i u roślin.

Słowa kluczowe: białko G, transdukcja sygnału, receptory

Summary: Many physical and chemical signals are able to activate membrane-bound receptors. Afterwards, heterotrimeric GTP-binding proteins (G proteins or Gp) relay information from cell surface to effectors. Changes in effectors activity cause changes in second messenger levels which in turn may lead to cellular responses. It is widely accepted that heterotrimeric G proteins play central role in controlling a flow of information in eukaryotic cells. Beside heterotrimeric many types of so-called small GTP-binding proteins were found in many animal and plant systems. In this review some features of the structure and function of both heterotrimeric and small GTP-binding proteins in animals and plants will be summarized.

Key words: G protein, signal transduction, receptors

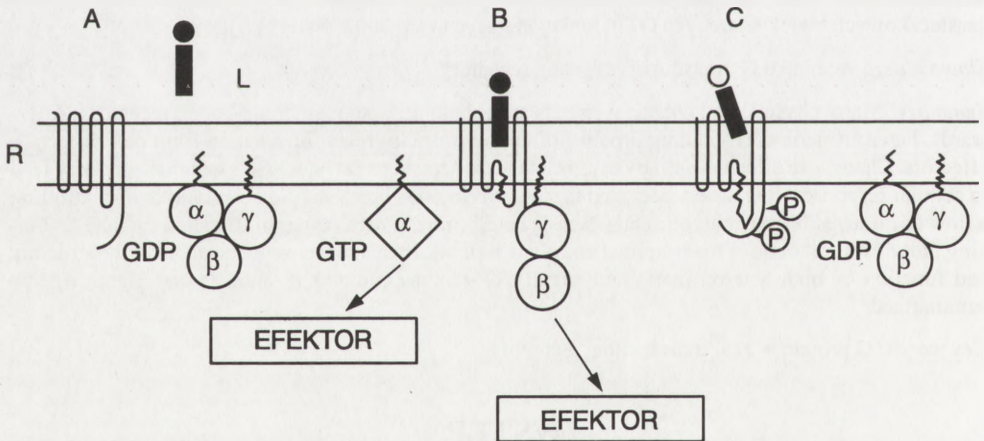
WSTĘP

Organizm człowieka i organizmy przeważającej większości zwierząt i roślin wyższych (eukariontów) składają się z olbrzymiej ilości komórek. W każdej z nich zachodzą skomplikowane procesy metaboliczne. Ich przebieg często regulowany

*Praca powstała w trakcie realizacji Grantu 6-6068-92-03 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

jest przez czynniki zewnątrzkomórkowe, których obecność w środowisku postrzegana jest przez receptory, białkowe struktury występujące głównie po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Przez wiele lat, od chwili wykrycia różnego typu receptorów, niewyjaśnionym pozostawał mechanizm, w jaki sposób odbierane przez nie sygnały środowiskowe przetwarzane są na wewnątrzkomórkowe odpowiedzi. Rozwiązanie tej intrygującej kwestii zawdzięczamy laureatom jednej z ostatnich Nagród Nobla (za 1994 rok), Amerykanom: Martinowi Rodbellowi oraz Alfredowi Gilmanowi. To prestiżowe wyróżnienie naukowe przyznano za odkrycie białek wiążących GTP (tzw. białek G) oraz określenie mechanizmu ich działania w komórkach eukariotycznych.

Już ponad dwadzieścia lat temu M. Rodbell odkrył, że przyłączenie do pewnych typów receptorów substancji biologicznie aktywnych (hormonów, neuroprzebieżników) prowadzi do aktywacji komórki [8, 55]. Wykazał również, że po rozpoznaniu sygnału przez komórkę następuje jego wielokrotne wzmocnienie. Proces ten, zwany transdukcją (transmisją) sygnału, inicjowany jest w wyniku aktywacji odpowiednich receptorów błonowych. Po ich pobudzeniu dochodzi do szybkiego wzrostu aktywności tzw. białek sprzęgających, które oddziałując na odpowiednie białka efektorowe odpowiadają za wielokrotny wzrost "natężenia" sygnału (wzmocnienie) oraz jego przeniesienie na cytoplazmatyczną stronę błony komórkowej (rys. 1). M. Rodbell stwierdził ponadto, że do prawidłowego przebiegu opisanego powyżej procesu niezbędny jest dopływ energii zgromadzonej w trifosfonukleotydzie –



Rys. 1. Schemat ilustrujący mechanizm transdukcji sygnałów z udziałem białka G, przed pobudzeniem receptor (R) i białko G pozostają niezwiązane ze sobą (A); w wyniku związania przez receptor ligandu (L) powstaje kompleks receptor-ligand, który łączy się z heterotrimerowym białkiem G; następuje oddysocjowanie podjednostki α od heterodimeru $\beta\gamma$; zarówno podjednostka α , jak i kompleks $\beta\gamma$ aktywują określone efekторы (B); w wyniku modyfikacji receptora (np. poprzez fosforylację) następuje jego inaktywacja, co powoduje zablokowanie pierwszego etapu szlaku transdukcyjnego (C); symbol ξ oznacza różne formy "zakotwiczenia" podjednostki α oraz kompleksu $\beta\gamma$ w błonie komórkowej

GTP [55, 60]. Brakujące ogniwo łańcucha opisanej powyżej reakcji wykryte zostało w 1980 roku przez A. Gilmana. Ów czynnik, od swojej właściwości polegającej na wiązaniu GTP nazwany został białkiem G [39, 55]. W ciągu kilkunastu lat, jakie upłynęły od wspomnianego odkrycia, dobrze poznano budowę wielu białek wiążących GTP, które dzieli się na: wysokocząsteczkowe lub heterotrimerowe białka wiążące i hydrolizujące GTP oraz niskocząsteczkowe, monomeryczne (w języku angielskim często nazywane *small Gp*) białka wiążące GTP [9, 19–21, 23, 24, 40, 41, 43–56, 60, 71, 72, 74].

W ostatnim czasie opublikowanych zostało kilka polskojęzycznych prac przeglądowych opisujących historię odkrycia [7, 52] oraz molekularne właściwości białek G [1, 53]. Niemniej, w żadnej z nich nie podano danych dotyczących budowy molekularnej, występowania i mechanizmu działania roślinnych białek wiążących GTP.

ZWIERZĘCE BIAŁKA G

W komórkach eukariotycznych występuje wiele odmiennych białek G. Przykładowo ze względu na udział w stymulującym bądź hamującym wpływie hormonów i neuroprzekazników na aktywność cykazy adenylanowej wyodrębniono odpowiednio G_s i G_i [39, 72]. Z pręcików i czopków siatkówki oka wyizolowano czynnik białkowy aktywujący zależną od cGMP fosfodiesterazę, który nazwano transducyną (oznaczany jako T lub G_t) [38]. Badania prowadzone na mózgu bydła wykazały, że obok dużych ilości G_i w tkance tej występuje jeszcze inne, nieznanne białko wiążące GTP, które oznaczono G_o (od angielskiego *other G protein* – inne białko G). Do tej pory u zwierząt opisano kilkadziesiąt różnych białek G, które na podstawie pokrewieństwa budowy i mechanizmu działania dzieli się na cztery rodziny (tab. 1).

Obecnie wiadomo, że wszystkie wysokocząsteczkowe białka wiążące GTP zbudowane są z trzech podjednostek: α , β i γ [39, 53, 56, 71, 72, 74].

1. HETEROTRIMEROWE BIAŁKA G

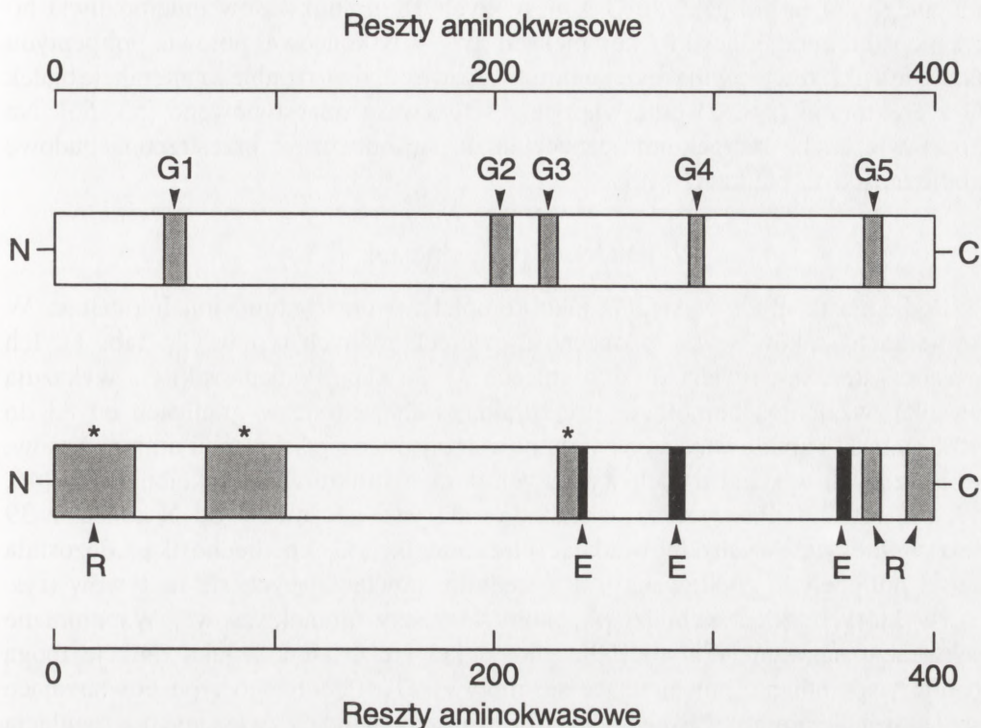
1.1. Budowa podjednostki α

Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasów G_α i mechanizmów działania wyróżnia się 4 klasy białek G, oznaczane jako G_s , G_i , G_q i G_{12} (tab. 1)[44, 60]. Do tej pory poznano pierwszorzędową strukturę ponad 20 różnych G_α [53–56, 60, 71]. Ich masa cząsteczkowa waha się w granicach od 40 do 46 kDa [46,

TABELA 1. Właściwości podjednostek α , β i γ heterotrimerowych białek wiążących GTP

Rodzina podrodzina	Masa cząsteczkowa (kDa)	% identyczności aminokwasów	Rozmieszczenie tkankowe	Effektor/ rola
G_s				
α_s	44,2	100	powszechne	↑cyklaza adenylanowa
α_{olf}	44,7	88	nabłonek węchowy	↑cyklaza adenylanowa
G_i				
α_{i1}	40,3	100	dosyć powszechne	↑kanały potasowe
α_{i2}	40,5	88	powszechne	↓kanały wapniowe
α_{i3}	40,5	94	dosyć powszechne	↓cyklaza adenylanowa (?)
α_{OA1}	40,0	73	mózg i inne tkanki	↑fosfolipaza C (?)
α_{OA2}	40,1	73	mózg i inne tkanki	↑fosfolipaza A ₂
α_{t1}	40,0	68	pręciki siatkówki	↑cGMP fosfodiesteraza
α_{t2}	40,1	68	czopki siatkówki	↑cGMP fosfodiesteraza
α_g	40,5	67	kubki smakowe	?
α_{iz}	40,9	60	mózg	↓cyklaza adenylanowa
G_q				
α_q	42,0	100	dosyć powszechne	↑fosfolipaza C β_1 - β_3
α_{11}	42,0	88	dosyć powszechne	↑fosfolipaza C β_1 - β_3
α_{14}	41,5	79	krtań, nerki, wątroba	?
α_{15}	43,0	57	komórki B i mielinowe	?
α_{16}	43,5	58	komórki T i mielinowe	↑fosfolipaza C β_1 - β_3
G₁₂				
α_{12}	44,0	100	powszechne	?
α_{13}	44,0	67	powszechne	?
β_1	37,3	100	powszechne	niezbędne do interakcji G α
β_2	37,3	90	dosyć powszechne	z receptorem; hamują aktywność G α ;
β_3	37,2	83	dosyć powszechne	modulują aktywność cykazy adenylanowej przez G α_s lub kalmodulinę.
β_4	37,2	89	dosyć powszechne	
γ_1	8,4	100	siatkówka, inne tkanki	stymulują aktywność fosfolipazy C i A ₂ oraz kanałów
γ_2	7,9	38	mózg, nadnercza	potasowych; biorą udział w
γ_3	8,5	36	mózg, jądra	fosforylacji i deaktywacji
γ_4	?	?	nerki, siatkówka	receptorów
γ_5	7,3	25	wątroba, inne tkanki	
γ_6	7,5	35	mózg, inne tkanki	

43–56] (tab. 1). Podjednostka α białka G jest enzymem, hydrolizującym GTP do GDP i nieorganicznego fosforanu [42]. Począwszy od pozycji 43 (licząc od N-końca) sekwencja kolejnych 18 aminokwasów G α jest identyczna dla wszystkich dotąd poznanych typów białek wiążących GTP [71]. Ten fragment polipeptydu



Rys. 2. Budowa podjednostki α białka G: zakreskowane regiony (G1–G5, w górnej części schematu) ilustrują odcinki polipeptydu biorące udział w wiązaniu nukleotydów guanidynowych; na dolnym diagramie przedstawiono domeny uczestniczące w oddziaływaniu podjednostki α z dimerem $\beta\gamma$ (zaznaczone gwiazdkami), białkiem efektorą (E) i białkiem receptorowym (R) (na podstawie [28, 60], zmodyfikowane)

odpowiada za wiązanie GDP i GTP (rys. 2). Poza wspomnianą, również cztery inne sekwencje aminokwasowe uczestniczą w wiązaniu nukleotydów guanidynowych. Ich dokładną charakterystykę przedstawiono w pracy Bourne i wsp. [21].

Oprócz sekwencji uczestniczących w wiązaniu GDP/GTP i hydrolizie GTP podjednostki α białka G mają regiony (domeny) odpowiedzialne za ich współdziałanie z receptorami oraz białkami efektorowymi (rys. 2). Wiązanie receptorów odbywa się w C-końcowym fragmencie polipeptydu [53, 56, 71, 74]. W procesie tym biorą udział reszty cysteinowe i argininowe leżące w pozycji 4 i 6 od C-końca [53]. Wspomniana reszta cysteinowa stanowi miejsce docelowego działania toksyny krztuśca, hamującej łączenie się pewnych białek G z receptorem. Również przeciwciała skierowane przeciw epitopom zlokalizowanym w C-końcowym fragmencie podjednostki α blokują wiązanie się całego białka G z receptorami [71].

N-końcowy odcinek cząsteczki G_α odpowiada za jej interakcje z dwiema pozostałymi podjednostkami białka G (rys. 2). Proteolityczne usunięcie (od wspo-

mnianego końca polipeptydu G_α) pierwszych 18 aminokwasów uniemożliwia łączenie się tej podjednostki z kompleksem $\beta\gamma$. W N-końcowej połowie polipeptydu podjednostki α występują reszty aminokwasowe odpowiedzialne za interakcje białek G z efektorami (rys. 2) oraz wiążące reszty kwasu mirystynowego [53, 56]. Na podstawie analiz rentgenograficznych udało się odtworzyć przestrzenną budowę podjednostki α białka G [19].

1.2. Budowa podjednostek β i γ

Podjednostki β i γ występują jako kompleks tworzący funkcjonalną całość. W komórkach ssaków wykryto obecność czterech różnych typów G_β (tab. 1). Ich masa cząsteczkowa waha się w granicach 35–36 kDa. Podjednostki G_β wykazują wysoką, wzajemną homologię strukturalną, wahającą się w granicach od 83 do 90% (tab. 1) i zbudowane są z ośmiu powtarzających się sekwencji aminokwasów, wchodzących w skład dwóch wyraźnych domen strukturalno-funkcjonalnych [46, 53, 56, 60, 71]. Pierwsza z nich zbudowana jest, począwszy od N-końca, z 39 reszt aminokwasowych odpowiadających za interakcję G_β z podjednostką γ . Pozostała część polipeptydu zbudowana jest z siedmiu, powtarzających się motywów (rys. 3), w których skład wchodzi po około 43 reszty aminokwasowe. Wspomniane sekwencje nazwano WD-40 [60]. Jak dotąd nie ustalono, jaką funkcję mogą pełnić wspomniane, powtarzające się motywy G_β . Podobnego typu powtarzające się sekwencje aminokwasowe odkryto również w białkach związanych z regulacją cyklu komórkowego, funkcjonowaniem cytoszkieletu i represją transkrypcyjną [60].

U ssaków poznano kompletną sekwencję aminokwasów sześciu z siedmiu znanych form G_γ . Charakteryzują się one większą heterogennością w porównaniu do G_α i G_β (tab. 1). Dla przykładu podjednostka γ_1 z siatkówki oka wykazuje jedynie 38% homologii z formą γ_2 izolowaną z mózgu [1, 46]. N-końcowy fragment cząsteczek G_γ wykazuje większą heterogenność w porównaniu z C-końcem [71]. W C-końcowym odcinku podjednostki γ występuje reszta cysteinowa ulegająca estryfikacji przez reszty farnesylowe lub geranylowe. Obecność wymienionych reszt izoprenylowych ułatwia wiązanie się kompleksu $\beta\gamma$ z błoną komórkową.

1.3. Oddziaływania między podjednostkami białek G

Doświadczenia nad ukierunkowaną mutagenezą oraz ograniczoną proteolizą wykazują, że za oddziaływanie podjednostki z dimerem odpowiedzialny jest jej krótki (2 kDa) N-końcowy fragment polipeptydu (rys. 2). Ubytek tego odcinka nie ma natomiast wpływu na związaną z G aktywność GTPazową [26, 57, 71]. Kompleks $\beta\gamma$ odpowiada za przestrzenne ukierunkowanie podjednostki α względem białek receptorowych oraz "zakotwiczenie" nieaktywnego białka G w błonie. W procesie tym uczestniczą również kwasy tłuszczowe (mirystynowy i palmitylowy) kowalencyjnie związane z N-końcowym fragmentem podjednostki α [8, 53, 56, 74].

Najprawdopodobniej przyłączanie wspomnianych kwasów następuje przy reszcie glicynowej G_{α} , gdyż wymiana glicyny na alaninę powoduje przesunięcie białka G z frakcji błonowej do cytozolu [60]. W przypadku niewiążącej kwasu tłuszczowego podjednostki α jej oddziaływanie z błoną komórkową zachodzi prawdopodobnie za pomocą C-końcowego fragmentu polipeptydu.

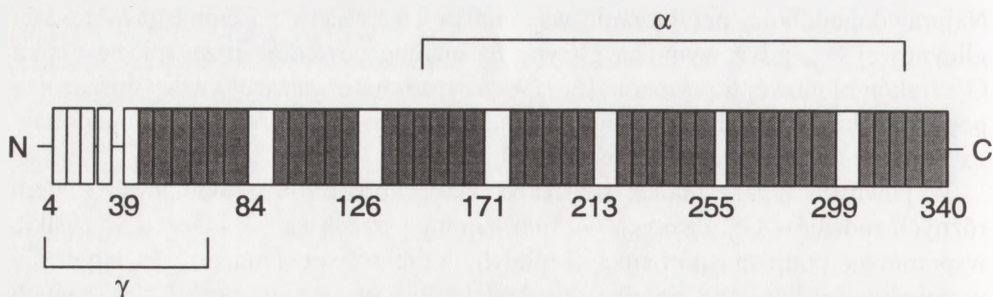
W pewnych typach tkanek stwierdzono obecność mRNA kodujących siedem różnych rodzajów G_{α} , czterech G_{β} i co najmniej trzech G_{γ} [71]. Jeżeli wszystkie wspomniane podjednostki białka G miałyby zdolność wzajemnego oddziaływania w pojedynczej komórce, mogłoby dochodzić do powstawania ponad 100 różnych heterotrimerów. W naturze istnieje wiele ograniczeń znacznie obniżających zakres możliwych do powstania kombinacji. Przykładowo, nie wszystkie podjednostki β i γ mogą łączyć się ze sobą. I tak podjednostka β_2 nie oddziałuje z γ_1 , a β_3 nie wiąże się z podjednostkami γ_1 i γ_2 [43]. Ponadto, obecność oddzielnych przedziałów w komórce i różne powinowactwo poszczególnych typów G_{α} do dimeru $\beta\gamma$ prowadzi do dalszego obniżenia liczby powstających form białka G [57, 71].

1.4. Struktura receptorów aktywujących białka G

W ciągu ostatnich lat sklonowano i zsekwencjonowano ponad 100 różnych typów receptorów sprzężonych z działaniem białek G [53, 68]. Ich wykaz można znaleźć w pracy Savarese'a i Frasera [64]. Receptory należące do omawianej klasy (nazywane często serpentynowymi lub R7G) aktywowane są zarówno przez małe aminy (np. epinefryna lub histamina), peptydy (np. wazopresynę lub bradykininę), jak i wysokocząsteczkowe hormony glikoproteinowe (np. hormon luteinizujący) [15, 68, 72].

Receptory R7G są glikoproteinami zbudowanymi z siedmiu transbłonowych segmentów (TM1-TM7). Każdy z nich zawiera 22–28 reszt aminokwasowych tworzących strukturę α -helisy. Odcinki transbłonowe połączone są trzema zewnątrzkomórkowymi (EC1-EC-3) i trzema cytoplazmatycznymi (IC1-IC3) pętlami. N-końcowy, podlegający glikozylacji fragment polipeptydu R7G wystaje na zewnątrz komórki, natomiast długa, około 90-aminokwasowa domena C-końcowa wnika w głąb cytoplazmy [28, 68]. W jej skład wchodzi reszta cysteinowa, która w przypadku szeregu typów receptorów (np. α - i β -adrenoergicznych oraz rodopsyny) podlega palmitylacji. Przypuszcza się, że poprzez resztę wspomnianego kwasu tłuszczowego zachodzi zakotwiczenie C-końcowej domeny receptora w błonie komórkowej. Bardzo ważną funkcję, poza wymienioną, pełnią dwie inne reszty cysteinowe. Występują one w pierwszej i drugiej pętli cytoplazmatycznej (IC1 i IC2) i poprzez powstające między nimi wiązanie dwusiarczkowe odpowiadają za utrzymywanie trzeciorzędowej struktury receptorów R7G [53, 68].

W wiązaniu agonisty uczestniczą reszty aminokwasowe występujące w zewnątrzkomórkowych końcach trzeciego, piątego i szóstego odcinka transbłonowego (TM3, TM5 i TM6). Trzecia pętla cytoplazmatyczna (IC3), występująca pomiędzy



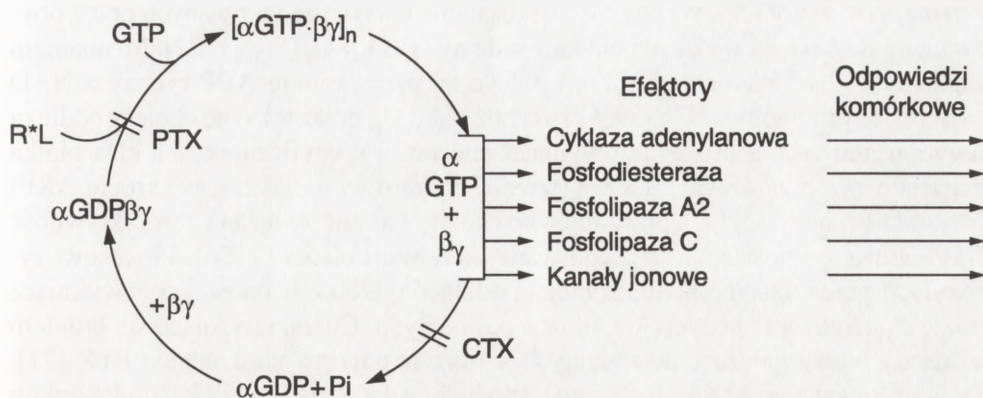
Rys. 3. Struktura podjednostki β z zaznaczeniem regionów polipeptydu odpowiedzialnych za jej oddziaływanie z podjednostkami α i γ białka G – dalszy opis w tekście (na podstawie [60], zmodyfikowane)

TM5 i TM6 łączy się z N- i C-końcowymi odcinkami podjednostki α białka G [68]. Z drugiej strony, pętla łącząca 3 i 4 segment transbłonowy R7G wiąże się z kompleksem $\beta\gamma$ wspomnianego białka [53]. Poza N-końcowym fragmentem polipeptydu G_α w tworzeniu przejściowego kompleksu pomiędzy uaktywnionym receptorem, białkiem G a efekтором uczestniczą cytoplazmatyczne końce piątego i szóstego odcinka transbłonowego, trzecia pętla cytoplazmatyczna oraz C-koniec R7G [53, 68].

Zakłada się, że aktywacja receptora (R) przez specyficznego agonistę (A) prowadzi do wzrostu dyfuzji kompleksu R-A w błonie lipidowej [12, 14, 48, 70]. W wyniku przypadkowych "zderzeń" dochodzi do oddziaływania wspomnianego kompleksu z białkiem G [48]. Ponieważ w pojedynczej komórce zwierzęcej na jeden receptor przypadać może do 100 cząsteczek białka G, przypuszcza się, że białko to jest mało mobilne, a jego aktywacja zachodzi w wyniku zderzeń z bardziej ruchliwym kompleksem R-A [12, 48]. Nie można również wykluczyć możliwości, że zarówno kompleks R-A, jak i białko G mają zdolność do szybkiego poruszania się w płaszczyźnie błony komórkowej. W kontroli przemieszczania się kompleksu R-A (a być może również białka G) w obrębie błon kluczową rolę może odgrywać układ spektrynowo-aktynowy [48].

1.5. Mechanizm działania białek G i ich oddziaływanie z białkami efektorowymi

W błonach komórek zwierzęcych występuje wiele typów receptorów, których działanie sprzężone jest z białkami G. Jak już wspomniano powyżej, białko to jest heterotrimerem składającym się z podjednostek: α , β i γ . W stanie podstawowym wszystkie one tworzą jeden kompleks, przy czym z podjednostką α nieaktywnego białka G związana jest cząsteczka GDP. Proces dysocjacji i asocjacji podjednostek α oraz $\beta\gamma$ stanowi kluczowe znaczenie dla mechanizmu działania białka G (rys. 4). Związanie się podjednostki α z dimerem $\beta\gamma$ powoduje około 100-krotny wzrost



Rys. 4. Cykl regulatorowy białka G z zaznaczeniem etapów wrażliwych na działanie toksyn krztuśca (PTX) i cholery (CTX) – cykl inicjowany jest w wyniku połączenia się kompleksu ligand-receptor (R^*L) z nieaktywnym białkiem G ($\alpha\text{GDP}\beta\gamma$); ten etap przemiany blokowany jest przez toksynę krztuśca; każdy kompleks R^*L może uaktywniać pewną liczbę (n) białek G, które w wyniku wymiany GDP na GTP rozpadają się na podjednostkę α oraz $\beta\gamma$; te zaś aktywują szereg efektorów odpowiedzialnych za regulację różnych odpowiedzi komórkowych; toksyna cholery hamuje związaną z G_α GTP-azę, a tym samym utrzymuje całe białko G w formie aktywnej (na podstawie [71], zmodyfikowane)

jej powinowactwa do GDP. Ma to istotne znaczenie dla stabilizacji białka G w jego heterotrimerowej formie. Aktywacja białka G zachodzi w wyniku wymiany GDP na GTP na podjednostce G_{α} , oddysocjowaniu G_{α} -GTP od dwu pozostałych podjednostek i związaniu się jej z błoną komórkową. Wiążąca GTP podjednostka α łączy się przejściowo z receptorem, a następnie oddysocjuje od receptora i w kolejnym etapie przemiany aktywuje określone białko efektorowe. W wyniku hydrolizy GTP dochodzi do ponownego połączenia się podjednostek α , β i γ w jeden, nieaktywny kompleks (rys. 4). Aktywacja białek efektorowych prowadzi to do zmiany cytoplazmatycznego stężenia odpowiednich substancji sygnałowych, zwanych wtórnymi przekaźnikami informacji [53].

Obecnie wiadomo, że oprócz podjednostki α także kompleks $\beta\gamma$ uczestniczy w regulacji aktywności różnych białek efektorowych [12]. Wśród nich można wymienić enzymy: fosfolipazę C (PLC- β 2) i fosfolipazę A_2 oraz cyklazę adenylnową (AC) i kinazę receptorową [12, 23, 24, 27, 67, 69, 76]. Ponadto heterodimer $\beta\gamma$ może modulować aktywność kanałów potasowych i wapniowych [23, 24]. Postuluje się, że pojedyncza cząsteczka białka G może działać jako łącznik spajający łańcuchy transdukcji sygnałów inicjowane aktywacją różnych receptorów błonowych [12].

1.6. Modyfikacje aktywności białek G

Aktywność większości heterotrimerowych białek G modyfikowana jest przez toksyny przecinkowca cholery (*Vibrio cholerae*; CTX) lub/i pałeczki krztuśca (*Bor-*

detella pertussis; PTX). Wrażliwość na działanie toksyn produkowanych przez obydwie gatunki bakterii wykazują białka z rodziny G_i , G_o i G_t [56, 71, 72]. Mechanizm działania obu wymienionych toksyn polega na przeniesieniu ADP-rybozy z NAD na określony aminokwas Gp [39, 67]. Rybozylacji G_α przez toksynę cholery podlega reszta argininowa, a proces ten wymaga obecności specyficznego, 21 kDa białka mającego właściwości GTP-azowe (tzw. *ADP-ribosylation factor*, w skrócie ARF) [39]. ADP-rybozylacja G_α przez toksynę cholery hamuje związaną z nią aktywność GTP-azową, co prowadzi do długotrwałej aktywacji białka G [56]. Procesowi rybozylacji przez toksynę krztuśca mogą podlegać tylko podjednostki α zawierające resztę cysteinową w pozycji 4. C-końca polipeptydu. Charakteryzujące się brakiem tej reszty białka należące do rodziny G_{12} i G_q są odporne na działanie PTX [71]. Zmodyfikowana przez toksynę krztuśca podjednostka α nie jest zdolna do interakcji z uaktywnionym receptorem, co prowadzi do zablokowania szlaku transdukcji sygnału indukowanego przez ten receptor. Wpływ toksyn krztuśca i cholery na określone etapy cyklu regulacyjnego heterotrimerowych białek G zilustrowano na rysunku 4.

Poza wymienionymi toksynami aktywność białek G może podlegać modyfikacjom przez niehydrolizujące analogi GTP i GDP. $GTP\gamma S$ (5'-[γ -tio]-trifosforan guanozyny) oraz $Gpp(NH)p$ (5'-[β,γ -imido]-trifosforan guanozyny) łącząc się z G_α indukują oddysocjowanie tej podjednostki od kompleksu $\beta\gamma$ [39]. Aktywacja białka G przez wspomniane analogi GTP indukuje powstawanie określonych odpowiedzi fizjologicznych. Z drugiej strony $GDP\beta S$ łącząc się z G_α hamuje dysocjację tej podjednostki od dimeru $\beta\gamma$, co prowadzi do zablokowania łańcuchów transdukcji sygnałów wymagających udziału białka G [39]. Wpływ niehydrolizujących analogów GTP i GDP na komórki eukariotyczne jest mało specyficzny. Poza heterotrimerowymi Gp wymienione substancje modulują aktywność niskocząsteczkowych białek wiążących GTP. Aby wyeliminować trudności związane z interpretacją wyników doświadczeń prowadzonych z użyciem wymienionych substancji, należy określić wpływ toksyny cholery i krztuśca na analizowany proces [56].

Fluorek glinu (AlF_4^-) znany jest z jego stymulacyjnego wpływu na aktywność białka G [71]. Związek ten ma budowę przestrzenną zbliżoną do reszt fosforanowych GTP i dzięki tej właściwości może wypierać GDP z podjednostki α białka G. Związanie się fluorku glinu z Gp prowadzi do oddysocjowania podjednostki α od dimeru $\beta\gamma$ i aktywacji określonych efektorów komórkowych. Ponieważ AlF_4^- nie ulega rozkładowi przez związaną z G_α GTP-azę, stymulacja omawianego białka przez ten związek ma trwały charakter [71].

Wszystkie dotąd omówione czynniki oddziałują na podjednostkę α białek wiążących GTP. Istnieje również pewien związek, fosducyna (ang. *phosducin*), który docelowo działa na kompleks $\beta\gamma$ [28]. Fosducyna wpływając na $G_{\beta\gamma}$ siatkówki blokuje wiązanie się tego heterodimeru z podjednostką α białka G_t . *In vitro* fosducyna

hamuje aktywność izolowanej z siatkówki cGMP fosfodiesterazy. Na tej podstawie przypuszcza się, że *in situ* fosducyna wpływa na szlaki transdukcyjne związane z procesem widzenia [28].

2. NISKOCZĄSTECZKOWE (MAŁE) BIAŁKA WIĄŻĄCE GTP

Oprócz heterotrimerowych białek G u mikroorganizmów, grzybów, zwierząt bezkręgowych i kręgowych (w tym człowieka), a także u roślin, wykryto kilkadziesiąt różnych, niskocząsteczkowych ("małych"), monomerycznych białek wiążących GTP [15, 40, 41, 56, 74]. Do omawianej grupy peptydów zaliczany jest czynnik elon-gacyjny Tu, białka Ras (Ral, Rab, Rac, Rho, i Arf) i pokrewne [15, 19-21, 46]. Ich masa cząsteczkowa waha się w granicach od 20 do 30 kDa [56, 74]. Wszystkie małe białka G mają podobnie zbudowane domeny uczestniczące w wiązaniu GTP [56].

Ogólnie "małe" białka G dzieli się na trzy główne grupy: białka Ras, Rho i Ypt/Rab [15, 40, 74]. Od strony molekularnej najlepiej poznano białka z podrodziny Ras [9, 15, 24, 38, 39], które wykazują duże podobieństwo do podjednostki α heterotrimerowych białek G. Stopień homologii składu aminokwasów pomiędzy obiema grupami białek sięga 50%. Ponadto ich aktywność regulowana jest w wyniku cyklicznego wiązania i hydrolizy GTP. W przypadku białek Ras w procesie wymiany GDP na GTP i hydrolizy GTP biorą udział białka towarzyszące. W tkankach zwierzęcych wykryto obecność tzw. białek aktywujących GTPazę (GAP – *GTPase activating proteins*) i stymulujących wymianę GDT na GTP (GDS – *GDP/GTP dissociation stimulator* lub GEF – *guanine nucleotide exchange factor*) [56]. Obydwa te czynniki mogą współdziałać z białkami Ras i regulować ich aktywność [15]. Jak dotąd poznano ponad 50 przedstawicieli białek wiążących GTP z rodziny Ras [15].

Druga grupa niskocząsteczkowych białek wiążących GTP składa się z kilku przedstawicieli podrodziny Rab u ssaków, białek typu Y_{PT}1 i SEC4 u drożdży oraz pokrewnych. Ich obecność stwierdzono w pęcherzykach wydzielniczych, błonach siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego [5]. Uważa się, że przedstawiciele podrodziny Rab/Ypt małych Gp biorą udział w procesach sekrecyjnych. Podobnie jak białka typu Ras aktywność małych Gp z podrodziny Rab/Ypt regulowana jest przez dwa wyżej wymienione czynniki białkowe (GAP, GEF) oraz jeden dodatkowy (GDI – *guanine-nucleotide dissociation inhibitors*), który hamuje dysocjację GDP z Rab/Y_{PT} [56].

W skład kolejnej podrodziny małych Gp wchodzi białka typu Rho i Rac ssaków oraz CDC42 drożdży. Zaangażowane są one w ustanawianiu i utrzymywaniu po-

larności komórek oraz w funkcjonowaniu cytoszkieletu [56, 71, 74, 85]. Oprócz wymienionych istnieją jeszcze trzy inne, znacznie gorzej poznane grupy niskocząsteczkowych białek wiążących GTP. Reprezentantem pierwszej z nich jest białko ARF ssaków i drożdży, które bierze udział w ADP-rybozylacji podjednostki G_{α} heterotrimerowych białek wiążących GTP (patrz 1.6). W komórkach drożdży wykryto małe białko G (CIN4), które uczestniczy w segregacji chromosomów. Natomiast w komórkach ssaków i drożdży zidentyfikowano odpowiednio białka oznaczone jako Ran i Sar1 regulujące transport pęcherzykowy [56].

Szczegółowe omówienie budowy i mechanizmów działania niskocząsteczkowych, zwierzęcych białek G wykracza poza granice tego artykułu.

3. ROŚLINNE BIAŁKA WIĄŻĄCE GTP

Występowanie białek G w komórkach roślinnych badano określając zdolność frakcji błonowych i izolowanych białek do wiązania radioaktywnie znakowanego GTP lub oddziaływania z nimi przeciwciał skierowanych przeciw różnym podjednostkom zwierzęcych białek G. Analizowano również wpływ niehydrolizujących analogów GTP i GDP oraz toksyn cholery i krztuśca (patrz 1.6) na przebieg różnych procesów związanych z regulacją wzrostu i rozwoju roślin. Ostatnio udało się sklonować kilka genów kodujących poszczególne podjednostki roślinnych białek G.

3.1. Wysokocząsteczkowe białka G

W drugiej połowie lat osiemdziesiątych [13, 32, 43] oraz na początku lat dziewięćdziesiątych [51, 84] stwierdzono, że [^{35}S]GTP γS wiąże się z surowymi ekstraktami i frakcjami błon izolowanymi z tkanek różnych gatunków roślin. Odkryto również, że rośliny zawierają białka, z którymi reagują przeciwciała skierowane przeciw konserwatywnym fragmentom polipeptydu podjednostki α i β zwierzęcych białek G [13, 51, 60] (tab. 2).

Od kilku lat, w celu identyfikacji białek G u roślin zaczęto stosować metody inżynierii genetycznej [56–58, 75, 83]. U *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano gen (*GPA1*) zbudowany z 14 egzonów i 13 intronów, kodujący białko G_{α} [57]. Na matrycy *GPA1* powstaje mRNA kodujący polipeptyd zbudowany z 383 reszt aminokwasowych, wykazujący 36% identyczności i 73% homologii składu aminokwasów w porównaniu do podjednostki αG_i i G_t ssaków [57]. Również jego masa cząsteczkowa (44,582 Da) zbliżona była do G_{α} ssaków. W genomie *A. thaliana* wykryto również sekwencje DNA charakterystyczne dla zwierzęcych G_{β} [31, 83]. Pierwszy ze zidentyfikowanych genów kodował białko ($AG\beta 1$) o masie cząste-

TABELA 2. Roślinne, wysokocząsteczkowe białka wiążące GTP – ich występowanie w tkankach i frakcjach poszczególnych gatunków roślin określano na podstawie: pozytywnej reakcji z przeciwciałami skierowanymi przeciw zwierzęcym G_{α} i G_{β} (^a), zdolności izolowanych frakcji błonowych lub oczyszczonych białek do wiązania znakowanego GTP (^b), bądź na podstawie analizy odpowiednich cDNA (^c), BD oznacza brak danych (na podstawie prac źródłowych oraz [56] i [74])

Gatunek	Występowanie	Masa cząsteczkowa	
		G_{α}	G_{β}
<i>Arabidopsis thaliana</i>	tkanki wegetatywne liście, korzenie	44,6 [57] ^c 36, 31 [13] ^a	41.0 [83] ^c
<i>Avena sativa</i>	jądra etiologowane siewki	75 [63] ^a 24 [52] ^a	BD
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	plamki oczne	24 [51] ^{a2} 21 [51] ^a	9, 24, 35, 15 [65] ^c
<i>Commelina communis</i>	liście, korzenie	38, 34 [13] ^a	BD
<i>Cucurbita pepo</i>	etiologowane hypokotyle	50, 35 [47] ^a	BD
<i>Dunaliella salina</i>	błona komórkowa	30, 28, 25 [61] ^{a,b}	BD
<i>Glycine max</i>	zawiesiny komórkowe	28, 24 [84] ^b	BD
<i>Hordeum vulgare</i>	komórki aleuronowe	32, 36 [56] ^a	BD
<i>Lycopersicon esculentum</i>	tkanki wegetatywne	44,9 [58] ^c	BD
<i>Nicotiana tabacum</i>	tkanki wegetatywne	BD	35,8 [56] ^c
<i>Oryza sativa</i>	koleoptyle	28, 30 [56] ^a	BD
<i>Pisum sativum</i>	etiologowane siewki	40, 30 [85] ^a	46, 36, 32, 26 [56] ^a
<i>Vicia faba</i>	błona komórkowa	37, 31 [13] ^a	BD
<i>Zea mays</i>	korzenie, pędy	34 [11] ^b	41,7 [56] ^c

czkowej 41,0 kDa i stosunkowo wysokim (44%) stopniu podobieństwa do zwierzęcych podjednostek G_{β} [83]. Odkrycie drugiego ze wspomnianych genów nastąpiło w wyniku izolacji mutantu *cop1*, którego rozwój w ciemności (skotomorfogeneza) przebiega podobnie jak roślin typu dzikiego (WT) na świetle (fotomorfogeneza). U WT światło jest niezbędne do uaktywnienia genu blokowanego przez charakteryzujące się niezwykle budową białko COP1 (tab. 2). W jego N-końcowym odcinku wykryto sekwencje aminokwasowe charakterystyczne dla tzw. "palców cynkowych" (mających zdolność wiązania się z DNA) [31]. C-końcowa połowa tegoż białka wykazywała duże podobieństwo do podjednostki β zwierzęcych białek G, zbudowanych z charakterystycznych domen typu WD-40 [31, 56] (patrz również 1.2).

Obecność genów kodujących podjednostki α i β białek G stwierdzono również u pomidora, kukurydzy, tytoniu i glonu *Chlamydomonas reinhardtii* [57, 58, 65, 83]. Gen pomidorowy, nazwany *TG α 1* koduje białko o masie cząsteczkowej 44,9 kDa, które w 34% podobne jest do G_{11} ssaków [58]. Tkankowo-niespecyficzna ekspresja genu *ZG β 1* u kukurydzy prowadzi do pojawiania się białka o budowie zbliżonej do zwierzęcej podjednostki β 2 (tab. 2). W przypadku tytoniu i *Chlamydomonas reinhardtii* wspomniane geny kodują odpowiednio białka określone jako *arcA* i *Cblp* w 66–67% podobne do zawierających motywy WD-40 zwierzęcych białek MHC12.3 [56].

Roślinne białka G, pod pewnymi względami mają odmienne właściwości w porównaniu do zwierzęcych, wysokocząsteczkowych białek wiążących GTP. Masy cząsteczkowe poszczególnych podjednostek roślinnych Gp odbiegają od tych, wyznaczonych dla zwierzęcych białek wiążących GTP (porównaj tabelę 1 z tabelą 2) [53, 56, 71, 74]. Niemniej, kinetykę wiązania i hydrolizy GTP przez roślinne Gp zbliżona jest do rejestrowanych u zwierząt [13, 34, 42, 43, 53, 60]. Ponadto ich obecność stwierdzano głównie we frakcjach wzbogacanych w błonę komórkową [11, 13, 34, 61, 62, 84]. Ostatnio stwierdzono również obecność białek G związanych z cytoszkieletem i macierzą jądrową [35]

Badania nad mechanizmem działania białek G u roślin opierają się głównie na doświadczeniach fizjologicznych, w których analizuje się wpływ GTP γ S oraz toksyn cholery i krztuśca na metabolizm oraz wzrost i rozwój tych organizmów. Na tej podstawie twierdzono, że Gp może uczestniczyć w procesie indukcji kwitnienia [16], mechanizmie działania fitohormonów [17, 21, 75] oraz fitochromu, barwnika kontrolującego fotomorfogenezę roślin [17, 22, 31, 43, 59, 62, 63, 80]. Indukowana przez światło stymulacja białek wiążących GTP prowadzi do aktywacji genów odpowiedzialnych za syntezę składników wchodzących w skład aparatu fotosyntetycznego [59, 60] oraz antocyjanów [22]. Doświadczalnie ustalono, że tylko w przypadku pierwszej grupy genów (kodujących składniki aparatu fotosyntetycznego) wzrost ich aktywności transkrypcyjnej wiąże się z podwyższeniem cytoplazmatycznego poziomu Ca^{2+} [22]. Wydaje się, że istnienie sprzężenia zwrotnego pomiędzy aktywacją Gp, metabolizmem fosfolipidów błonowych a wzrostem komórkowego stężenia jonów wapnia może dotyczyć wielu innych (poza fotomorfogenezą) procesów u roślin [2, 25, 33]. Od wielu lat wiadomo, że w błonach komórek roślinnych, podobnie jak to ma miejsce u zwierząt, funkcjonują tzw. kanały i pompy wapniowe [77, 78, 81, 82]. Ponadto wykazano, że regulacja cytoplazmatycznego stężenia Ca^{2+} u roślin ma podobny charakter jak w komórkach zwierzęcych [6, 8, 10, 25, 33, 78, 82]. Na tej podstawie proponuje się, że w przypadku obu typów organizmów jeden z mechanizmów działania białka G może polegać na zależnej od fosfolipidów błonowych mobilizacji Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów [25, 32, 33, 69, 72, 73, 81].

W genomie komórek zwierzęcych występuje wiele genów kodujących poszczególne podjednostki białek G. W przypadku przebadanych dotąd roślin wyższych zidentyfikowano pojedyncze kopie genów kodujących podjednostki α i β Gp. Jak dotąd nie wykryto u nich obecności genów dla podjednostki γ . Niemniej wydaje się, że mechanizmy działania roślinnych i zwierzęcych białek wiążących GTP są podobne. Brak w komórkach roślinnych możliwości oddziaływań pomiędzy różnymi typami podjednostek Gp może powodować, że zachodzące z ich udziałem szlaki transdukcji sygnałów są prostsze i bardziej uniwersalne w porównaniu do zwierząt.

3.2. Niskocząsteczkowe białka wiążące GTP

Do tej pory sklonowano kilkadziesiąt genów kodujących roślinne niskocząsteczkowe białka wiążące GTP [56, 74]. Pierwszą rośliną, w której genomie stwierdzono obecność sekwencji kodujących małe białko G, był rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*). Okazało się, że produkt tego genu w 26 do 55% podobny był do wszystkich zanych zwierzęcych niskocząsteczkowych Gp. Poza omówionym, u rzodkiewnika sklonowano 10 innych genów kodujących podobnego typu białko, które nazwano ara, rab i rha1 [3, 4, 56, 74]. Liczną rodzinę genów (13), kodujących małe białka G stwierdzono w tkankach grochu [56]. Również w genomie tytoniu stwierdzono obecność kilku genów (Rhn1, Np-ypt3 i Nt-rab5) kodujących małe Gp [29, 75]. Ponadto po kilka genów dla niskocząsteczkowych białek wiążących GTP stwierdzono u *Chlamydomonas reinhardtii* (yptC), *Glycine max* (sRab), *Gossypium hirsutum* (Rac9, Rac13), *Lycopersicon esculentum* (Rab1, Sar1, Ypt2), *Nicotiana* (Np-ypt3, Nt-rab5, Rhn i Rgb), *Oryza sativa* (Rgp, Ric), *Vicia faba* (Gnrp), *Volvox carteri* (YptV1, YptV2p) i *Zea mays* (Yptm) [30, 35, 56, 70].

Białka G typu Rha1 rzodkiewnika oraz Rhn1 i Nt-Rab5 tytoniu wykazują ponad 65% homologie składu aminokwasów i prawie identyczną masę cząsteczkową [70]. Bardzo duże podobieństwo istnieje również pomiędzy białkami Yptm1 (23,3 Da) i Yptm2 (22,5 Da) kukurydzy, Ara2 (23,9 Da) oraz YptV1 (22,5 Da) zielenicy *Volvox* [2, 36]. Z etiolowanych siewek grochu wyizolowano i sklonowano gen (*RHOIPs*) kodujący niskocząsteczkowe białko G, należące do podrodziny Rho białek Ras. Białko to zbudowane jest ze 197 aminokwasów i wykazuje 45–64% identyczności sekwencji aminokwasów w porównaniu do innych przedstawicieli z rodziny Rho i około 30% w stosunku do przedstawicieli nadrodziny Ras [85]. Choć ekspresję *RHOIPs* obserwowano we wszystkich tkankach grochu największe ilości transkrypty wykryto w wierzchołku korzenia i w pąku szczytowym pędu [85].

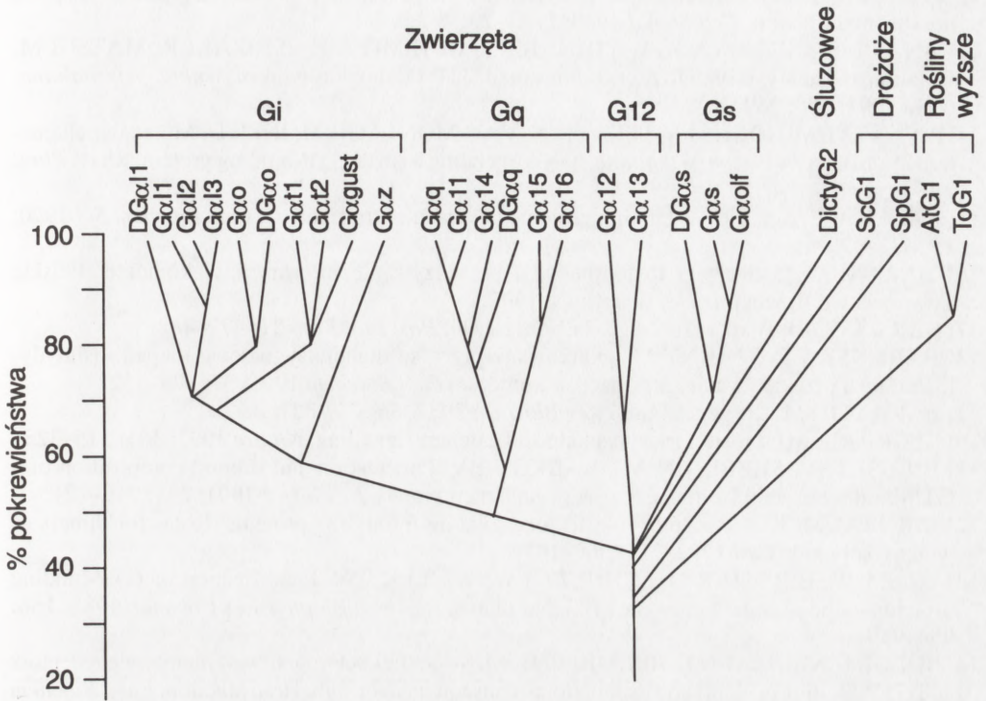
Bliższe poznanie funkcji niskocząsteczkowych białek G u roślin stało się możliwe dzięki różnego typu manipulacjom genetycznym. Ponieważ otrzymywanie roślin transgenicznych jest znacznie prostsze w porównaniu do zwierząt, badania prowadzone na organizmach roślinnych stanowią duży wkład do poznania mechanizmu działania białek G u eukariontów. Jak dotąd opisano szereg gatunków

roślin, do których wprowadzono obce geny kodujące różnego typu małe białka G lub też sekwencje antysensowne mRNA blokujące działanie endogennych białek wiążących GTP [75]. Tego typu doświadczenie przeprowadzono na tytoniu, do którego wprowadzono sensowny i antysensowny mRNA kodujące gen *rgp1* ryżu [49]. Oba typy otrzymanych roślin transgenicznych charakteryzowały się obniżoną dominacją wierzchołkową, karleniem i zaburzeniami w procesie kwitnienia [49]. Również poziom ekspresji macierzystych genów kodujących niskocząsteczkowe białka G prowadzić może do wielu zaburzeń w funkcjonowaniu komórek roślinnych. Dla przykładu, zaburzenia w ekspresji genu *ypt* u drożdży powoduje dezorganizację układu mikrotubularnego i utratę integralności strukturalnej jąder, co ma istotny wpływ na proces ich pączkowania [66]. Z drugiej strony ekspresja drożdżowego *Ras2* w komórkach *Nicotiana plumbaginifolia* prowadziła do zahamowania ich podziałów [45]. Natomiast wprowadzenie wspomnianego genu do komórek rzodkiewnika, marchwi i kukurydzy nie miało żadnego wpływu na zachodzące w nich procesy [49]. Wydaje się, że pewnego typu białka G mogą spełniać podobne funkcje u wszystkich organizmów eukariotycznych. Przykładem mogą być pewne, niskocząsteczkowe roślinne białka G, wykazujące wysokie podobieństwo do białek typu *Ypt/Rab*, które u zwierząt uczestniczą w regulacji wewnątrzkomórkowego transportu, np. w procesie endocytozy [35, 56, 70]. Więcej informacji na temat roślinnych, niskocząsteczkowych białek wiążących GTP może znaleźć czytelnik w pracach przeglądowych Ma [56] oraz Terryna i wsp. [74].

ZAKOŃCZENIE

Poza ssakami heterotrimerowe białka wiążące GTP wykryto w komórkach śluzowców (*Dictyostelium discoideum*), drożdży, owadów (*Drosophila*) i wielu gatunków roślin [48, 56, 64, 70]. Wykazano, że tzw. czynnik elongacyjny komórek prokariotycznych (Tu), białko Ras u drożdży oraz różnego typu roślinne białka G kodowane są przez geny o podobnej sekwencji nukleotydów [56, 74]. Na tej podstawie wnioskuje się, że białka wiążące GTP funkcjonowały już u pierwotnych organizmów, a struktura ich genów nie uległa istotnym zmianom mimo upływu kilku miliardów lat rozwoju życia na Ziemi (rys. 5). Przypuszcza się, że podobnie jak kalmodulina (białko wiążące Ca^{2+} [77]) Gp jest powszechnie występującym i uniwersalnie działającym pośrednikiem łączącym ze sobą procesy stymulacji komórek z powstawaniem w ich obrębie odpowiedzi fizjologicznych [50, 53, 56, 60, 67, 71, 72].

Odkrycie białek G pozwoliło lepiej zrozumieć mechanizm powstawania pewnych chorób. Wykazano między innymi, że choroby wywoływane przez przecinkowca cholery (*Vibrio cholerae*) oraz pałeczkę krztuśca (*Bordetella pertussis*) wynikają



Rys. 5. Porównanie budowy (wyrażanej w % identyczności składu aminokwasów) podjednostek α heterotrimerowych białek wiążących GTP, których charakterystykę przedstawia tabela 1; we wspomnianej tabeli nie uwzględniono białek typu DG z *Drosophila melanogaster*, DictyG2 z *Dictyostelium discoideum*, ScG1 z *Saccharomyces cerevisiae*, SpG1 z *Schizosaccharomyces pombe*, AtG1 z *Arabidopsis thaliana* oraz ToG1 z *Lycopersicon esculentum* (na podstawie [56], zmodyfikowane)

z wpływu toksyn produkowanych przez te bakterie na białka G występujące w komórkach jelit oraz układu oddechowego. Przypuszcza się również, że trwałe modyfikacje białek G (np. ich permanentna aktywacja) mogą prowadzić do powstawania cukrzycy oraz pewnej grupy nowotworów złośliwych [53]. Odkrycia te mogą mieć wielkie znaczenie kliniczne w zwalczaniu wymienionych powyżej chorób.

LITERATURA

- [1] ADLER G. Białka wiążące GTP jako uniwersalny przekaznik sygnałów. *Post Biol Kom* 1995; 22: 103–111.

- [2] ALLAN EA, DAWSON B, DRBAK K, ROBERTS K. GTP causes calcium release from plant microsomal fraction. *Cell Signal* 1989; **1**: 23–29.
- [3] ANAI T, HASEGAWA K, WATANABE Y, UCHIMIYA H, ISHIZAKI R, MATSUI M. Isolation and analysis of cDNA encoding small GTP-binding proteins of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 1991; **108**: 259–264.
- [4] ANUNTALABHOCHAI S, TERRY N, VAN MONTAGU M, INZÉ D. Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a small GTP-binding protein, Rha1. *Plant J* 1991; **1**: 67–174.
- [5] BALCH WE. Small GTP-binding proteins in vesicular transport. *Trends Biochem Sci* 1990; **15**: 473–477.
- [6] BARAŃSKA J. Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce. Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Warszawa, 1992.
- [7] BARAŃSKA J. Białka G – Nagroda Nobla 1994. *Post Biol Kom* **21**: 479–488.
- [8] BARAŃSKA J, CZARNY M. Indukowany przez substancje sygnałowe rozpad fosfatydylocholino a przekazywanie informacji w komórce. *Post Biochem* 1991; **37**: 129–132.
- [9] BARBACID M. *ras* genes. *Annu Rev Biochem* 1987; **56**: 779–827.
- [10] BERRIDGE MJ. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; **361**: 315–325.
- [11] BILUSHI SV, SHEBUNIN AG, BABKOV BV. Purification and subunit composition of a GTP-binding protein from maize root plasma membranes. *FEBS Lett* 1991; **291**: 219–221.
- [12] BIRNBAUMER L. Receptor-to-effector signaling through G proteins: Roles for dimers as well as subunits. *Cell* 1992; **71**: 1069–1072.
- [13] BLUM W, HIRSCH K-D, SCHULTZ EW, WEILER EW. Identification of GTP-binding proteins in the plasma membrane of higher plants. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **156**: 954–959.
- [14] BOEGE F, NEUMANN E, HELMREICH JM. Structural heterogeneity of membrane receptors and GTP-binding proteins and its functional consequence for signal transduction. *Eur J Biochem* 1991; **199**: 1–15.
- [15] BOKOCH GM. Biology of the Rap proteins, members of the *ras* superfamily of GTP-binding proteins. *Biochem J* 1993; **289**: 17–24.
- [16] BOROCHOV A, SPIEGELSTAIN H, HALEVY A.H. Involvement of signal transduction pathway components in photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Physiol Plant* 1995; **95**: 393–398.
- [17] BOSSEN ME, KENDRICK RE, VREDENBERG WJ. The involvement of a G-protein in phytochrome-regulated, Ca^{2+} -dependent swelling of etiolated wheat protoplasts. *Physiol Plant* 1990; 55–62.
- [18] BOSSEN ME, TRETYN A, KENDRICK RE, VREDENBERG WJ. Comparison between swelling of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplasts induced by phytochrome and α -naphthaleneacetic acid, benzylaminopurine, gibberellic acid, abscisic acid and acetylcholine. *J Plant Physiol* 1991; **137**: 706–710.
- [19] BOURNE HR. The importance of being GTP. *Nature* 1994; **369**: 611–612.
- [20] BOURNE HR, SANDERS DA, MCCORMICK F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990; **348**: 125–132.
- [21] BOURNE HR, SANDERS DA, MCCORMICK F. GTPase superfamily: a conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991; **349**: 117–127.
- [22] BOWLER C, CHUA N-H. Emerging themes of plant signal transduction. *Plant Cell* 1994; **6**: 1529–1541.
- [23] BROWN AM. Membrane-delimited cell signaling complexes: Direct ion channel regulation by G proteins. *J Membrane Biol* 1993; **131**: 93–104.
- [24] BROWN AM, BIRNBAUMER L. Ionic channels and their regulation by G protein subunits. *Ann Rev Physiol* 1990; **52**: 197–213.

- [25] BUSH DS. Calcium regulation in plant cell and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1995; **46**: 95–122.
- [26] CLAPHAM DE, NEER EJ. New roles for G-protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* 1993; **365**: 403–406.
- [27] COCKCROFT S. G-protein-regulated phospholipases C, D and A_2 -mediated signalling in neurotrophils. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1113**: 135–160.
- [28] CONKLIN BR, BOURNE HR. Structural elements of G_α subunits that interact with G_β , receptors, and effectors. *Cell* 1993; **73**: 631–641.
- [29] DALLMANN G, STICHER L, MARSHALLSAY C, NPGY F. Molecular characterization of tobacco cDNA encoding two small GTP-binding proteins. *Plant Mol Biol* 1992; **19**: 847–857.
- [30] DELMER DP, PEAR JR, ANDRAWIS A, STALKER DM. Genes encoding small GTP-binding proteins analogous to mammalian rac are preferentially expressed in developing cotton fibres. *Mol Gen Genet* 1995; **248**: 43–51.
- [31] DENG Z-W, MATSUI M, WEIN, WAGNER D, CHU AM, FELDMANN KA, QUAIL, PH. COP1, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both zinc-binding motif and a G homologous domain. *Cell* 1992; **71**: 791–801.
- [32] DILLENSCHNEIDER M, HETHERINGTON AM, GRAZIANA A, ALIBERT G, BERTA P, HAIECH J, RANJEVA R. The formation of inositol phosphate derivatives by isolated membranes from *Acer pseudoplatanus* is stimulated by guanine nucleotides. *FEBS Lett* 1986; **208**: 413–417.
- [33] DRØBAK BK. The plant phosphoinositide system. *Biochem J* 1992; **288**: 697–712.
- [34] DRØBAK BK, ALLAN EF, COMERFOLD JG, ROBERTS K, DAWSON AP. Presensence of guanine nucleotide-binding proteins in a plant hypocotyl microsomal fraction. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **150**: 899–903.
- [35] DRØBAK BK, WATKINS PAC, BUNNEY TD, DOVE SK, SHAW PJ, WHITE IR, MILLNER PA. Association of multiple GTP-binding proteins with the plant cytoskeleton and nuclear matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **210**: 7–13.
- [36] FABRY S, NASS N, HUBER H, PALME K, JAENICKE L, SCHMITT R. The *yptV1* gene encodes a small G-protein in the green alga *Volvox carteri*: gene structure and properties of the gene product. *Gene* 1992; **118**: 153–162.
- [37] FABRY S, BEYSER K. YptV2p, a membrane-associated small G protein abundant during embryogenesis in the green alga *Volvox carteri*. *Protoplasma* 1996; **190**: 79–87.
- [38] FUNG BK-K. The light-activated cyclic GMP phosphodiesterase system in retinal rods. [w] Cohen P, Houslay MD [red.] *Molecular Mechanism of Transmembrane Signalling*. Amsterdam, Elsevier, 1985: 181–214.
- [39] GILMAN AG. G Protein: transducers of receptor-generated signals. *Ann Rev Biochem* 1987; **56**: 615–649.
- [40] HALL A. *Ras* and *ras*-regulated guanine nucleotide binding proteins. [w] Houslay MD, Milligan G [red] *G-Proteins as Mediators of Cellular Signalling Processes*. John Wiley & Sons Ltd, 1990.
- [41] HALL A. Signal transduction through small GTPases – a tale of two GAPs. *Cell* 1992; **69**: 389–391.
- [42] HASUNUMA K, FUNADERA K. GTP-binding protein(s) in green plant, *Lemna paucicostata*. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **143**: 980–912.
- [43] HASUNUMA K, FURUKAWA K, FUNADERA K, KUBATA M, WATANABE M. Partial characterization and light-induced regulation of GTP-binding protein in *Lemna paucicostata*. *Photochem Photobiol* 1987; **46**: 531–535.
- [44] HEPLER JR, GILMAN AG. G proteins. *TIBS* 1992; **17**: 383–387.
- [45] HILSON P, DEWULF J, DELPORTE F, INSTALLW P, JACQUEMIN J-M, JACOBS M, NEGRUTIU I. Yeast RAS2 affects cell viability, mitotic division and transient gene expression in *Nicotiana* species. *Plant Mol Biol* 1990; **14**: 669–685.

- [46] HOUSLEY MD, MILLIGAN G. G-Proteins as Mediators of Cellular Signalling Processes. , John Wiley & Sons Ltd. 1990.
- [47] JACOBS M, THELEN MP, FARNDAL RW, ASTLE MC, RUBERY PH. Specific guanine nucleotide binding by membranes from *Cucurbita pepo* seedlings. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **155**: 1478–1488.
- [48] JANS DA. The mobile receptor hypothesis revisited: a mechanistic role for hormone receptor lateral mobility in signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1113**: 271–276.
- [49] KAMADA I, YAMAUCHI S, YOUSSENFAN S, SANO H. Transgenic tobacco plants expressing *rpg1*, a gene encoding a *ras*-related GTP-binding protein from rice, show distinct morphological characteristics. *Plant J* 1992; **2**: 799–807.
- [50] KAZIRO Y, ITOH H, KOZASA T, NAKAFUKU M, SATOH T. Structure and function of signaltransducing GTP-binding proteins. *Ann Rev Biochem* 1991; **60**: 349–400.
- [51] KOROLKOV SN, GARNPVSKAYA MN, BASOV AS, CHUNAEV AS, DUMLER IL. The detection and characterization of G-proteins in the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 1990; **270**: 132–134.
- [52] KURLANDZKA A, FRONK J. Nobel 1994 za białka G z medycyny i fizjologii. *Post Biochem* 1995; **41**: 3–4.
- [53] KWIATKOWSKA-KORCZAK J. Białka G – budowa i rola w przekazywaniu sygnałów. [w] Konarska L [red] Molekularne Mechanizmy Przekazywania Sygnałów w Komórce. Warszawa, PWN 1995: 104–116.
- [54] LAMBRIGHT DG, NOEL JP, HAMM HE, SIGLER P. Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* 1994; **369**: 621–628.
- [55] LINDER ME, GILMAN AG. G Proteins. *Sci Amer* 1992; **7**: 36–43.
- [56] MA H. GTP-binding proteins in plant: new members of an old family. *Plant Molec Biol* 1994; **26**: 1611–1636.
- [57] MA H, YANOFSKY MF, MEYEROWITZ EM. Molecular cloning and characterization of *GPA1*, a G protein α subunit gene from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3821–3825.
- [58] MA H, YANOFSKY MF, HUANG H. Isolation and sequence analysis of *TGA1* cDNA encoding a tomato G protein α subunit. *Gene* 1991; **107**: 189–195.
- [59] MILLAR AJ, MCGRATH RB, CHUA N-H. Phytochrome phototransduction pathways. *Annu Rev Genet* 1994; **28**: 325–349.
- [60] NEER EJ. G proteins: Critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci* 1994; **3**: 3–14.
- [61] RODRIGEZ-ROSALES MP, HERRIN DL, HOMPSON GS Jr. Identification of low molecular mass GTP-binding proteins in membranes of the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* 1992; **98**: 446–451.
- [62] ROMERO LC, SOMMER D, GOTOR C, SONG P-S. G-protein in etiolated *Avena* seedlings. Possible phytochrome regulation. *FEBS Lett* 1991; **282**: 341–346.
- [63] ROMERO LC, BISWAL B, SONG P-S. Protein phosphorylation in isolated nuclei from etiolated *Avena* seedlings. Effects of red/far-red light and cholera toxin. *FEBS Lett* 1991; **282**: 347–350.
- [64] SAVARESE TM, FRASER CM. *In vitro* mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem J* 1992; **283**: 1–19.
- [65] SCHLOSS JA. A *Chlamydomonas* genes encodes a G protein β subunit-like polipeptyde. *Mol Gen Genet* 1990; **221**: 443–452.
- [66] SCHMITT HD, WAGNER P, PFAFF E, GALLWITZ D. The *ras*-related *YPT1* gene product in yeast: a GTP-binding protein that might be involved in microtubule organization. *Cell* 1986; **47**: 401–412.
- [67] SIMON MI, STRATHMANN MP, GAUTMAN N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 1991; **252**: 802–808.

- [68] SKANGIEL-KRAMSKA J. Receptory błonowe: klasyfikacja, struktura, funkcje. [w] Konarska L [red] *Molekularne Mechanizmy Przekazywania Sygnałów w Komórce*. Warszawa, PWN 1995: 45–61.
- [69] STERNWEIS PC, SMRCKA AV. Regulation of phospholipase C by G proteins. *TIBS* 1992; **17**: 502–506.
- [70] STRADER CD, FONG TM, TOTA MR, UNERWOOD D, DIXON RAF. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 1994; **63**: 101–132.
- [71] STRYER L, BOURNE HR. G Protein: a family of signal transducers. *Ann Rev Cell Biol* 1986; **2**: 391–419.
- [72] TAYLOR CW. The role of G proteins in transmembrane signalling. *Biochem J* 1990; **272**: 1–13.
- [73] TAYLOR CW, MARSHALL ICB. Calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: a complex relationship. *TIBS* 1992; **17**: 403–407.
- [74] TERRY N, VAN MONTAGU M, INZE D. GTP-binding proteins in plants. *Plant Molec Biol* 1993; **22**: 143–152.
- [75] TERRY N, ANUNTALALABHOCHAI S, VAN MONTAGU M, INZW D. Analysis of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA encoding a novel small GTP-binding protein. *FEBS Lett* 1992; **299**: 287–290.
- [76] TRAUTWEIN W, HESCHLER J. Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G proteins. *Ann Rev Physiol* 1990; **52**: 257–274.
- [77] TRETYN A. Wapń w Komórkach Eukariotycznych: Występowanie, Transport i Komórkowy Mechanizm Działania. Warszawa, PWN 1994.
- [78] TRETYN A. Transport Ca^{2+} przez błony eukariotyczne. I. Kanały wapniowe. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 319–340.
- [79] TRETYN A, BOSSEN ME, KENDRICK RE. Evidence for different types of acetylcholine receptors in plants. [w] Karssen CM, van Loon LC, Vreugdenhil D (red) *Progress in Plant Growth Regulation*, Dordrecht, Kluwer Acad Publ, 1992: 306–311.
- [80] TRETYN A, KENDRICK RE, WAGNER G. The role(s) of calcium ions in phytochrome action. *Photochem Photobiol* 1991; **54**: 1135–1155.
- [81] TSUNODA Y. Receptor-operated Ca^{2+} signalling and crosstalk in stimulus secretion coupling. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1154**: 105–156.
- [82] TYBURSKI J, TRETYN A. Fosfolipidy błonowe: metabolizm i mechanizm działania. *Post Biol Kom*, wysłane do redakcji.
- [83] WEISS CA, GARNAAT CW, MUKAI K, HU Y, MA H. Isolation of cDNAs encoding G protein β subunit homologues from maize (*ZGB1*) and *Arabidopsis* (*AGB1*). *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 9554–9558.
- [84] ZBELL B, PAULIK M, MORRE DJ. Comparison of [35 S]GTP γ S binding to plasma membranes and endomembranes prepared from soybean and rat. *Protoplasma* 1990; **154**: 74–79.
- [85] YANG Z, WATSON JC. Molecular cloning and characterization of *rho*, a *ras*-related small GTP-binding protein from the garden pea. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8732–8736.

Otrzymano: 14.12.1994 r.

Przyjęto: 19.03.1996 r.

Adres autora: Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet M. Kopernika
87-100 Toruń 12, ul. Gagarina 9

APOPTOZA DOŚWIADCZALNA: MODELE INDUKCJI IN VITRO I ZASTOSOWANIA

EXPERIMENTAL APOPTOSIS. MODELS OF IN VITRO INDUCTION AND IMPLICATIONS

Danuta ROŻYŃKOWA

Zakład Genetyki Człowieka AM w Lublinie

Streszczenie: W nawiązaniu do wrodzonych i nabytych zespołów zaburzeń apoptozy u myszy przegląd skupia się nad modelami doświadczalnej indukcji apoptozy w układzie komórek krwiotwórczych, szczególnie limfocytach T i B w centrach rozrodczych i we krwi obwodowej. Obejmuje też apoptozę komórek docelowych dla cytotoksycznych limfocytów T, apoptozę komórek T w AIDS, oraz komórek linii Jurkat, HL-60 i komórek białaczkowych, głównie z CLL. Podkreślona została rola mediatorów sygnalizacji APO-1/FAS i ich ligandów, rola cyklu komórkowego i czynników wzrostowych. Opisano możliwy wpływ genów z rodziny *bcl-2*. Przytoczono argumenty na rolę proteaz typu ICE/CED-3 w terminalnej fazie wykonawczej apoptozy.

Słowa kluczowe: apoptoza, mutacja *lpr* i *gld*, limfocyty T, limfocyty B, receptory APO-1, TCR, CD40, *bcl-2*, cykl komórkowy, białaczki, HIV.

Summary: Several proposed models for in vitro cytotoxic or activation induced apoptosis of normal T and B human and mouse lymphocytes, leukemic cells and leukemic cell lines Jurkat and HL-60 have been reviewed with reference to aberrant apoptotic processes in inborn lymphoproliferative disorders in mice explained by FAS and FASL mutation. The role of cell cycle control and the presence of growth factors for survival or onset of apoptosis was discussed. Possible influence of *bcl-2* family genes has been demonstrated. The terminal executive phase of suicidal process in described models seems to use the specific ICE/CED-3 like protease and endonuclease.

Key words: apoptosis, *lpr* and *gld* mutation, T lymphocytes, B lymphocytes, APO-1 receptor, TCR, CD40, *bcl-2*, cell cycle, leukemic cells, HIV

W poprzednim artykule omawiałam zagadnienie apoptozy – programowanej śmierci komórki – jako procesu genetycznie kontrolowanego i rozpoznawanego przez charakterystyczne zmiany morfologiczne i chemiczne [96, 100, 101]. Wiele

czynników indukcji i modulacji apoptozy wskazuje na mnogość przekazników i wewnątrzkomórkowych sygnałów do planowanej śmierci komórki. Pomimo wspólnej dla wszystkich dróg apoptozy ostatecznej fazy wykonawczej – typowego gwałtownego niszczenia chromatyny – za sprawą uaktywnionych swoistych proteaz [46, 77], nie można nie zauważyć, że motywacja realizacji planu śmierci jest zdeterminowana okolicznościami wynikającymi z programu życia. Świadczą o tym m.in. wrodzone i nabyte zaburzenia regulacji procesu apoptozy. W związku z tym ograniczę niniejszy artykuł głównie do apoptozy komórek układu limfocytowego.

WRODZONE I NABYTE ZESPOŁY ZABURZEŃ APOPTOZY U MYSZY

Najwcześniejsze obserwacje dotyczą nadmiernej proliferacji komórek limfoidalnych lub odwrotnie – rychłego zaniku komórek układu immunologicznego. U myszy z mutacją *lpr* (od *lymphoproliferation*) wykryto defekt genu strukturalnego, kodującego białko powierzchni komórki nazwane antygenem FAS [93]. Antygen ten, wielkości 35 kDa ma wspólną część homologiczną z innymi białkami błonowymi jak receptory TNF – czynnika martwicy nowotworu i NGF – czynnika wzrostu nerwu. Ekspresja FAS nie jest ograniczona do tkanki grasicy; została ona opisana w wątrobie, płucach, sercu i jajnikach [59]. Wstrzyknięte dootrzewnowo mysie monoklonalne przeciwciała anty FAS było letalne dla młodych myszek; dramatyczne objawy chorobowe wynikały z wybuchu nagłego zapalenia wątroby (*hepatitis fulminans*) [18]. Rolę FAS w apoptozie i jego ekspresję w tymocytach grasicy wyjaśnia fenotyp myszy *lpr*, polegający na deregulacji dojrzewania tymocytów i nie realizowania apoptozy tych komórek, które rozpoznają własne antygeny (defekt selekcji negatywnej). Autoimmunogeny fenotyp mutacji *lpr* cechuje hiperglobulinemia z krążącymi kompleksami autoreaktywnych przeciwciał, także przeciw DNA, oraz gromadzenie limfocytów T CD4⁺, CD8⁻ w węzłach chłonnych i w śledzionie, zapalenie stawów i zapalenie kłębkowe nerek. U myszy *lpr* opisano 2 mutacje genu *fas*: polimorficzną rearanżację między drugim intronem a trzecim egzonom oraz mutację punktową T-A w nukleotydzie 786 genu chromosomu 19, skutek której w domenie cytoplazmatycznej antygeny FAS asparagina zajmuje miejsce izoleucyny [59]. Odpowiednik ludzkiego antygeny FAS został sklonowany [26].

Drugą mutację spontaniczną o prawie identycznych objawach klinicznych opisano u myszy jako zespół *gld* (od *generalized lymphoproliferative disease*) [82]. Badania molekularne w tym uogólnionym zespole rozrostowym limfocytów wskazały na defekt innej cząsteczki, wszak dopełniającej wiązania z receptorem FAS. Gen strukturalny *gld* koduje liganda antygeny FAS (FASL). Jego obecność na aktywnym limfocycie T określa interakcję między komórką T i B lub inną komórką docelową z receptorem FAS.

Obecnie wiadomo, że antygen FAS jest równoznaczny z antygenem APO-1 i antygenem różnicowania CD95. Badania pracowni Nagata'y w Osace zbiegły się w czasie z próbami immunoterapii doświadczalnej w grupie Krammera w Heidelbergu [87]. Mianowicie jedno z wytworzonych przeciwciał, nazwane anty APO-1 indukowało apoptozę nowotworowych limfoblastów B linii SKW 6.4. W wyniku wstrzyknięcia przeciwciała anty APO-1 do komórek ludzkiego guza B-limfocytowego, umieszczonego u bezgraniczej myszy, nastąpiła regresja guza w ciągu kilku dni. Autorzy potwierdzili charakterystyczne oznaki apoptozy (segmentacja jąder komórkowych, zagęszczenie cytoplazmy i fragmentacja DNA). Praca Trautha i wsp. [87] przedstawia też po raz pierwszy ekspresję APO-1 na komórkach różnych linii hemopoetycznych, limfocytach T i B człowieka i zwierząt doświadczalnych oraz na komórkach białaczkowych T i B u chorych. Nieobecność antygeny sugerowała istnienie różnych subpopulacji (tylko aktywne limfocyty miały ten receptor powierzchni). Obecności receptora APO-1 towarzyszyła apoptoza komórek pod wpływem przeciwciała anty APO-1 i zahamowanie wzrostu z zahamowaniem syntezy DNA i zwiększeniem częstości apoptotycznych jąder komórkowych.

Od wrodzonych spontanicznych mutacji u myszy przechodzimy do wymuszonych manipulacją genetyczną zaburzeń apoptozy. U myszy transgenicznych wywołano wymuszoną stałą ekspresję genu *bcl-2* [81], genu uczestniczącego w regulacji programowanej śmierci komórki limfohemopoetycznej [1, 35]. U myszek tych, podobnie jak w zespołach *lpr* i *gld* doszło do zatrzymania ujemnej selekcji limfocytów B dojrzewających w centrach rozrodczych grudek chłonnych i do ich gromadzenia. Doświadczenie to stanowi imitację nadmiernej ekspresji genu *bcl-2* w chłoniaku grudkowym z translokacją chromosomową 14; 18, którą to sytuację omówiliśmy wcześniej [33, 69].

Przeciwny obraz zaburzeń apoptozy przedstawili Nakayama i wsp. [54] u myszy, które w okresie embrionalnym pozbawiono genu *bcl-2* w komórkach macierzystych krwiotworzenia. Po dokonaniu podwójnej amputacji (*double knockout*) genu *bcl-2*, został on wprowadzony do komórek embrionalnych (ES: *embryonic stem cells*) w wyniku następujących po sobie homologicznych rekombinacji. Na koniec wprowadzono taką linię komórek *bcl-2*^{-/-} do blastocysty myszek *bcl-2*^{+/+} szczepu C57Bl/6 i wyhodowano mieszańce z amputowanym genem. U myszek pozbawionych genu *bcl-2* w krwiotwórczych komórkach macierzystych stwierdzono po ich urodzeniu początkowo prawidłowy rozdział subpopulacji tymocytów i populacji limfocytów T i B w szpiku i węzłach chłonnych. Jednakże między drugim a czwartym tygodniem życia doszło do gwałtownego obniżenia limfocytów Bcl-2^{-/-} we krwi obwodowej. Zniknęły nie tylko dojrzałe komórki T i B, ale także niedojrzałe tymocyty z grasicy i komórki pre-B z centrów rozrodczych.

Myszki homozygotyczne z amputowanym genem *bcl-2*, wyhodowane z linii zarodkowej homozygotycznej *bcl-2*^{-/-}/*bcl-2*^{-/-} [92], wykazywały początkowo prawidłowy rozwój, były jednak mniejsze, a głowy ich cechowało zmienione ukształtowanie. W dalszym rozwoju zmniejszała się stopniowo liczba limfocytów we krwi, dojrzałe

limfocyty objawiały *in vitro* zwiększoną skłonność do apoptozy. Różnicowanie limfocytów, początkowo prawidłowe, było zakłócone w miarę masywnej inwolucji grasicy i śledziony komórek w drodze spontanicznej apoptozy komórek. U myszek dochodziło do groźnej torbielowatości nerek. Siwienie sierści z powodu anomalii syntezy melaniny dopełniało charakterystycznego fenotypu mutantów defektywnych genu *bcl-2*.

Podsumowując tę część artykułu trzeba zaznaczyć, że spontaniczne mutacje autosomalne recesywne u myszy *lpr* i *gld* są mutacjami FAS i FASL odpowiednio. Rozwój limfadenopatii i splenomegalii oraz zaburzeń autoimmunologicznych potwierdza, że system FAS/APO-1 bierze też udział w apoptozie komórek T w grasicy i klonalnej delecji autoreaktywnych komórek T na obwodzie. Manipulacje genowe mające na celu uzyskanie nadmiernej lub braku ekspresji genu *bcl-2*, doprowadzały do hamowania apoptozy limfocytów B lub odwrotnie – do jej gwałtownego nasilenia.

APOPTOZA W DOŚWIADCZENIACH NA KOMÓRKACH LIMFOIDALNYCH *IN VITRO*

Na pierwsze miejsce w sygnalizacji apoptozy wysuwają się następujące cząsteczki powierzchni:

Antygen-receptor FAS/APO(CD 95),
jego ligand, FASL, zwany także ligandem, APOL;
receptor limfocyta T: TCR/ CD3 i CD4;
receptory limfocyta B: CD40 i jego ligand CD40L,
receptory Ig.

Doświadczenia nad indukcją apoptozy w układach komórkowych *in vitro* są nacelowane na te cząsteczki, chociaż, jak się okaże, układ cytolityczny z perforyną ma także i tutaj swój znaczący udział. Eksperymentator musi zważać na zmiany martwicze, niezależnie od uzyskania dowodów na proces apoptozy. W tej myśli przedstawiam metody ją demonstrujące.

Metody badań. Szereg różnych technik stosowano dawniej i proponuje się dziś dla wykrycia i oceny ilościowej komórek ginących w drodze apoptozy. Śmierć fizjologiczna programowana w czasie rozwoju narządów przebiega często niepostreżenie i zmiany morfologiczne *in situ* najdokładniej są uwidocznione w mikroskopie elektronowym [101]. Metodą orientacyjną dla izolowanych komórek krwi jest analiza ciałek apoptotycznych w preparacie z wirówki komórkowej, tzw. cytospinie, wybarwionym wg metody May-Grunwalda i Giemsy i oglądanym pod powiększeniem 1000 x. Kolejną metodą jest elektroforeza w żelu agarozowym, demonstrująca charakterystyczną drabinkę DNA, która obrazuje degradację DNA do makrofragmentów 50 kbp, następnie do mono- i oligomerów nukleosomalnych o wielkości około 200 bp [14, 100]. Duże zastosowanie znalazła wieloparametrowa cytometria przepływowa, określająca hipodiploidię DNA, jego ubytki i fragmenty [84]. Złamania i

przerwy w DNA można udokumentować badaniami enzymatycznymi, ponieważ stwarzają one miejsca akceptorowe dla polimerazy DNA lub końcowej transferazy deoksyrybonukleotydydowej [52]. Niezależnie od zastosowania tych technik w mikroskopii przepływowej lub obrazowej, na takich samych zasadach enzymatycznych opierają się metody wykrycia apoptozy poszczególnych komórek w metodach *in situ*. Jest to o tyle korzystne, że pozwala ocenić jednocześnie morfologię komórek co jest szczególnie ważne w badaniach tkanek o znacznej heterogenności jak np. szpiku [52]. Te metody wykrycia apoptozy *in situ* nazwano TUNEL (od *TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling*) [19], ISNT (od *in situ nick translation*) [20] lub ISNL (od *in situ end labeling*) [95]. W domyśle tych skrótów pozostaje "sfragmentowanego DNA". Ogólna zasada metod TUNEL opiera się na reakcji wiązania się TdT-terminalnej transferazy deoksynukleotydydowej do końców 3'OH DNA i wbudowaniu deoksyurydyny znakowanej biotyną lub digoksygeniną w miejscu złamań, które z kolei można wykryć awidyną/peroksydazą. Modyfikacja tej metody zwana FISEL opiera się na reakcji z terminalną transferazą nukleotydydową, która bezpośrednio inkorporuje dCTP znakowany fluorochromem [105]. Ilościowe oznaczenie pofragmentowanego DNA jest też możliwe w aparacie typu ELISA na podstawie fluorometrii lub innej barwnej reakcji z fragmentami DNA obecnymi w supernatancie hodowanych komórek.

W dalszej części omawiam piśmiennictwo w zależności od tego, czy zajmuje się ono procesem apoptozy w interakcji międzykomórkowej działaniem cytotoksycznym limfocyta T, czy też chodzi o procesy autodestrukcji w wyniku innych działań wewnętrznych i zewnętrznych.

a. Właściwości cytotoksyczne limfocytów T realizują się drogą zależną od perforyny i drogą zależną od interakcji FAS/FASL [15, 102]. Perforyny uwalniają się z wewnątrzkomórkowych ziarnistości komórki atakującej, w czasie kontaktu komórek wnikają do warstwy lipidowej błony cytoplazmatycznej komórki docelowej i w zależności od napływu jonów Ca^{2+} tworzą pory i kanaliki. Gwałtownej zmianie przepuszczalności błony i obrzękowi towarzyszy liza komórki [24, 15]. Zdaniem Shi i wsp. [73] w działaniu cytotoksycznym limfocytów NK i CTL może dodatkowo dojść do fragmentacji DNA działaniem tzw. fragmentyny, składającej się z granzymu A, granzymu B i leukaleksyny, spowinowaczonej antygenowo z czynnikiem martwicy nowotworów TNF α . Udowodniono ostatecznie [64], że indukcja śmierci przez apoptozę jest częścią składową komórkowej cytotoksyczności wywieranej przez limfocyty $CD4^+$ i $CD8^+$, a wcześniej wykazano [67], że w apoptozie komórki docelowej uczestniczy receptor jej powierzchni – antygen APO/FAS. Pewne rozbieżności zostały rozwiane, po udokumentowaniu [2, 44], że niezależnie od mechanizmu realizacji cytotoksyczności, z udziałem perforyny lub bez niej, na powierzchni cytotoksycznych limfocytów T dochodzi do ekspresji ligandu FAS (FASL). Jego ekspresję kontroluje białkowa kinaza tyrozynowa PTK. Tanaka i wsp. [83] indukowali toksyczność ludzkich limfocytów T przez aktywację mitogenem, następnie ekspansję ich w hodowli z interleukiną 2 przez 2 tygodnie, po czym dodanie na ostatnią dobę

jonoforu wapnia i estrów forbolu. Następnego dnia stwierdzono apoptozę komórek docelowych z ekspresją FAS. Komórki T nie tylko na powierzchni miały ligand FAS ale również wydalają FASL do supernatantu hodowli.

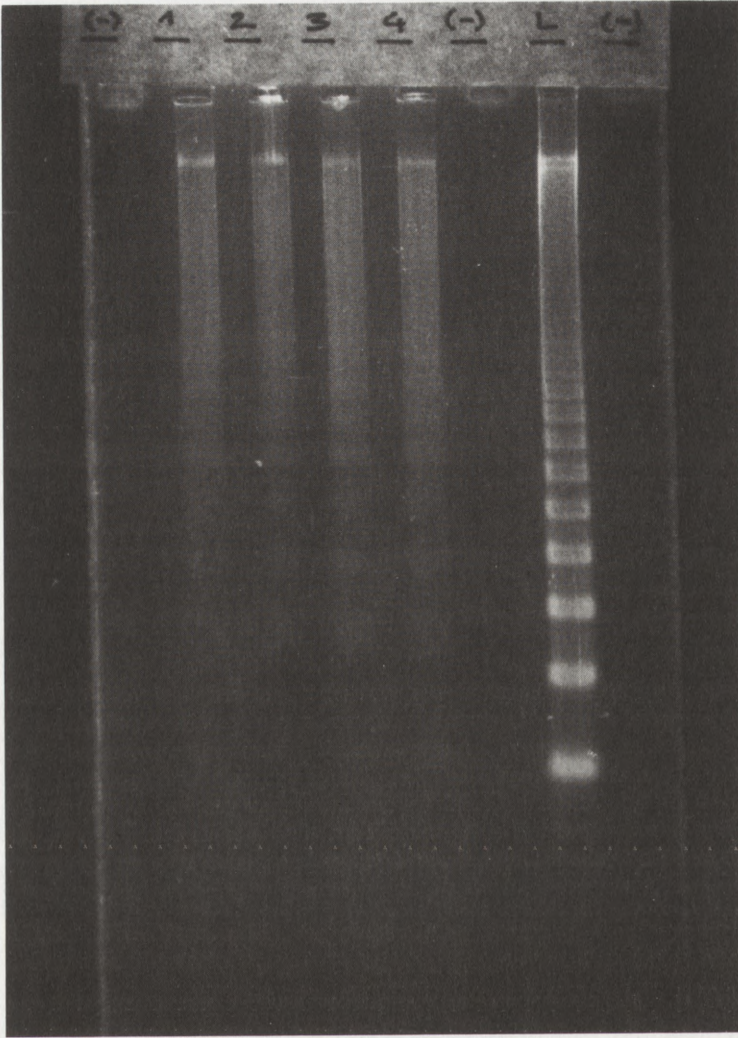
Inne szczegóły doświadczalnej apoptozy cytotoksycznej zawiera praca Ju [27]. Zdolność komórek CD4⁺ i CD8⁺ do indukcji fragmentacji DNA komórki docelowej nie była zależna od obecności inhibitorów syntezy RNA (aktynomycyny) ani od zahamowania syntezy białka (cykloheksimid), była natomiast hamowana przez toksynę cholery. Natomiast jony cynku, hamujące napływ Ca²⁺ i hamowanie aktywności endonukleazy w komórkach docelowych blokowały ich śmierć. Te fakty sprawdziły się dla innych komórek docelowej apoptozy, komórkach HeLa [23].

Praca Kāgi i wsp. [31] miała odpowiedzieć na pytanie, czy cytotoksyczność komórki T, zależna od kontaktu z antygenem przez TCR i indukowana za pośrednictwem ekspresji FAS (opisana powyżej), jest też realizowana podczas usuwania wewnątrzkomórkowych wirusów chorobotwórczych i niepatogennych. Badania wykonano u myszy wsobnych C57BL/6, wśród których wyhodowano szczepy mutantów z defektami receptora TCR lub u myszy z defektem FAS – C57BL/6 *lpr* i z defektem FASL - C57BL/6 *gld*. Ostre infekcje wirusowe myszy zostały wywołane przez wirus LCMV (*lymphocytic choriomenigitis virus*), VSV (*vesicular stomatitis virus*), SFV (*Semliki forest virus*) i wirus krowianki VV. Tylko wirus niepatogenny LCMV był usuwany za pomocą perforyny, lecz bez udziału FAS limfocyta T. Natomiast wirusy cytopatyczne były kontrolowane mechanizmami odporności przeciwwirusowej przez cytokiny w bezpośrednim sąsiedztwie zakażonej komórki i przez wytwarzanie neutralizujących przeciwciał. Myszy *gld* i myszy z amputowanym genem perforyny były całkowicie niezdolne do zwalczania wirusowego zapalenia opon mózgowych także w badaniach Lowina i wsp. [44].

Dalsze pytanie było związane z antyapoptotycznym działaniem genu *bcl-2*: czy dotyczy śmierci komórek docelowych drogą przez receptor FAS/FASL, czy drogą za pośrednictwem perforyny z uwolnieniem proteolitycznych granzymów. Do tych badań cytotoksycznych służyły Schröterowi i wsp. [72] limfocyty T z 5-dniowej hodowli mieszanej allospecyficznej lub aktywowane mitogenem. Jako komórki efektorowe odpowiedzi immunologicznej posłużyły mysie limfocyty śledzionowe, pochodzące od myszy z amputowanym genem perforyny lub od myszy *gld* z defektem ligandu FAS. Inne komórki docelowe pochodziły z linii komórkowej mysiego mastocytoma (guz z komórek tucznych) P815 z mysim transgenem cDNA *bcl-2* oraz komórki śledzionowe z transgenem *bcl-2*, aktywowane przez ConA. Uwalnianie chromianu Cr⁵¹ znakowało uszkodzenie błony komórkowej jako wstęp do martwicy, podczas gdy uwalnianie I¹²⁵-Urd znakowało degradację DNA. Obydwie drogi cytotoxiczne prowadziły do śmierci komórek w warunkach kontrolnych i obydwu mechanizmom przeciwdziałał, przynajmniej częściowo, transgen *bcl-2*. Autorzy spekulują, że interakcja genu *bcl-2* mogłaby zachodzić na etapie proteolitycznego działania proteaz ICE (w przypadku śmierci komórkowej przez FAS) lub proteaz granzymu B (w przypadku drogi do martwicy przez perforynę).

b. Dhein i wsp. ustalili tzw. minimalny model **autodestrukcji przez apoptozę dla ludzkich obwodowych limfocytów T** [13]. Model ten polega na poddaniu różnych limfocytów T, takich jak: linie Jurkat-komórek CD4⁺ z ostrej białaczki T-komórkowej, komórki klonu S13 (alloreaktywne limfocyty T) lub limfocyty T pomocnicze z krwi obwodowej, aktywacji antygenem lub przeciwciałem monoklonalnym anty TCR/CD3. Model ten nazwano AICD (od *activation induced cell death*). Zauważono, że już w kilka godzin po aktywacji receptora antygenem dochodzi do ekspresji mRNA ligandu APO-1, a w krótki czas później zaczyna się apoptoza, co uchwycono pobieraniem do komórek jodku propidyny (PI) lub fragmentacją DNA w cytofluorymetrze przepływowym. Dotyczyło to komórek linii Jurkat i S13. Natomiast obwodowe limfocyty T były aktywowane superantygenem SEB (od *Staphylococcus enterotoxin B*) przez 5–10 dni lub bezpośrednio przez swoiste przeciwciała przeciw CD3. We wszystkich hodowlach apoptoza była blokowana przez dodanie do podłoża swoistego przeciwciała – blokera wiążącego APO-1: (F/ab)₂ anty APO-1). Autorzy uważają, że w modelu AICD podstawą apoptozy jest interakcja cząsteczek TCR (CD3 i APOR/APOL). Aktywowana przez TCR komórka T, jak komentują autorzy, wytwarza sama wszystkie elementy potrzebne do własnej destrukcji, a jej śmierci można zapobiec przez interakcję między receptorem/antygenem APO a jego ligandem. W opisanym przez Dheina i wsp. [13] minimalnym modelu endogennej apoptozy kryje się autokryjne samobójstwo z receptorem FAS jako czynnikiem śmierci. Ten pogląd został potwierdzony przez Brunnera i wsp. [7], którzy pracowali na doświadczalnym modelu mieszańców somatycznych (hybrydoma) limfocytów T oraz przez Ju i wsp., którzy stwierdzili jednoczesną ekspresję mRNA FAS i FASL w hybrydowych komórkach T aktywowanych przeciwciałem anty TCR/CD3. Cyklosporyna A i pochodna kwasu retinowego 9-cis hamowały proces AICD [28, 75].

W opisanym modelu apoptoza obwodowych limfocytów T rozwijała się stopniowo i towarzyszyło jej pobudzenie receptorów powierzchni CD95 i jego ligandu; proces apoptozy był przy tym niezależny od fazy cyklu komórkowego, ale zależny od syntezy białek. Inny model, o którym będzie mowa poniżej, dotyczy fazy Go/G1, sprzyja mu blok syntezy białek, a apoptoza rozwija się spontanicznie w pewnych okolicznościach hodowli lub w wyniku zadziałania glukokortykosterydami. Brunetti i wsp. [6] wykazali, że jeden i drugi typ apoptozy wymaga pozbawienia mikrośrodowiska czynników wzrostowych, IL-2, IL-4 i IL-10 oraz komórek nie-T. Dla przebiegu drugiej apoptozy należało dodać dexaven, glikokortykosteryd – nie wcześniej niż po ustaniu proliferacji w krótkoczasowej hodowli komórkowej, gdy limfocyty powrócą do fazy Go/G1. Hodowane limfocyty nie są wrażliwe na dexaven w fazie S/M cyklu komórkowego. W tym modelu apoptozy autorzy upatrują imitację wczesnego mechanizmu negatywnej selekcji lub jej regulacji krótko po ustaniu odpowiedzi immunologicznej. Zdaniem Shi i wsp. [74] zrozumiałą jest regulacja apoptozy w zależności od fazy cyklu komórkowego. Autorzy ci obserwowali zmiany morfologiczne i biochemiczne przypominające apoptozę w komórkach chłoniaka YAC-1 w wyniku aktywacji kinazy seryno-treoninowej p34^{cdc2} indukowanej przedwcześnie i w niewłaściwym czasie



Fot. 1. Fragmentacja DNA w komórkach z ostrej białaczki limfoblastycznej poddanych w hodowli 24 godz. w temp. 37°C działaniu deksametazonu 10^{-6} M (ścieżka 1), kamptotecyny 0,15 μ m (ścieżka 2) i metotreksatu 10 μ m (ścieżka 3, bez leku *in vitro* (ścieżka 4); chory był uprzednio leczony glikokortykoidem dexaven; ścieżka L: marker DNA (DNA Ladder, Serva), najdalej wędrujący prążek odpowiada monomerowi 142 pz; elektroforeza w żelu wg Gorczycki i wsp. [21]; autor dziękuje pani dr Agacie Filip za udostępnienie wymienionych badań

cyklu komórkowego w obecności proteaz fragmentyny-2 i perforyny [74]. Obraz zniszczeń nasuwa podobieństwo apoptozy do katastrofy mitotycznej [22, 74]. Jak wiadomo, kinaza p34^{cdc2} w kompleksie z cykliną B ma podstawowe znaczenie dla regulacji przejścia komórek z fazy G2 do M [99].

Model endogennej apoptozy autoreaktywnych tymocytów metodą hodowli *in vitro* przedstawili Smith i wsp. [78]. Hodowle tymocytów prowadzono w płatach grasicy u myszy BALB/C z dodatkiem przeciwciał anty TCR/CD3 i zabezpieczeniem napływu jonów Ca^{2+} przez jonomycynę. Ta apoptoza była blokowana dodatkiem cyklosporyny do podłoża [78]. Autorzy nie badali wówczas interakcji FASL i zdaje się, że taki mechanizm nie został dotychczas udowodniony w negatywnej selekcji tymocytów i ich śmierci w grasicy [7, 13].

Przegląd cytowanych prac wzbudza refleksję, że aktywacja dojrzałych limfocytów T antygenem lub przeciwciałem przeciw TCR z udziałem ekspresji FAS i jego ligandu wywala nie tylko proliferację z mitogenezą, ale także kryje potencjalny plan śmierci i mechanizm delecji obwodowych limfocytów T w drodze apoptozy [30, 42].

W dalszym ciągu doświadczeń z obwodowymi limfocytami $CD4^+$ powzięto plan zbadania śmierci tych komórek w zespole nabytego braku odporności – AIDS. Jak wiadomo, antygen CD4 jest receptorem HIV. W pracy Westendorpa i wsp. [94] znajdujemy dane na ten temat. Autorzy pracowali na komórkach Jurkat oraz kontrolnych limfocytach T pomocniczych, aktywowanych przez przeciwciała anty CD3, CD4, anty CD95/APO/FAS i przez superantygen SEB. Do hodowanych komórek dodano białek wirusa HIV: Tat i gp 120. Okazało się że dodatek białka HIV Tat wzmacniał ekspresję mRNA ligandu CD95/FAS tak w komórkach T linii Jurkat, jak i w obwodowych komórkach T od zdrowych dawców, stymulowanych przeciwciałem anty CD4. Z tego wynika, że w apoptozie limfocytów zakażonych przez HIV też dochodzi do zwiększonej ekspresji tego ligandu. Przeciwciała blokujące ekspresję ligandu FAS/APO(CD 95) hamowały też apoptozę. Należy zauważyć, że w opisanych doświadczeniach stosowano stężenie białek wirusa HIV na podobnym poziomie, w jakim występują one w surowicy krwi osób zakażonych wirusem HIV-1. Wydaje się wysoce prawdopodobne, że przyspieszenie apoptozy przez białka wirusa HIV jest tym mechanizmem, który przyczynia się do utraty limfocytów typu pomocniczych u chorych z AIDS [50]. Przedłużenie przetrwania limfocytów T zakażonych HIV jest możliwe w drodze endogennego uruchomienia zwiększonej ekspresji genu *bcl-2* [104].

APOPTOZA LIMFOCYTÓW B

Aktywacja limfocytów B jest, jak wiadomo, zależna od obecności swoistego antygeny, komórek go prezentujących (APC) i komórek T pomocniczych, antygenoswoistych. Tą samą drogą odbywa się hamowanie i blokowanie apoptozy limfocytów B, indukowanej za pośrednictwem SIg – stymulowania powierzchniowych receptorów immunoglobulinowych. Zdaniem Tsubaty i wsp. [88] autoreaktywne limfocyty B są usuwane, jeśli nie ma autoreaktywnych limfocytów T. W przeciwnym razie, gdy tolerancja limfocytów T ulegnie załamaniu, autoreaktywne limfocyty T mogą zapoczątkować patogenezę zespołu autoimmunologicznego z udziałem autoreaktywnych komórek B, jak to się dzieje w zespole *glp* u myszy. Mechanizm apoptozy dojrzałych

obwodowych limfocytów B jest imitowany *in vitro* w drodze usieciowania krzyżowego (*crosslinking*) powierzchniowych receptorów immunoglobulinowych przez przeciwciała anty IgM (t.zw. *SIg B cell apoptosis*) [53]. O tym czy stymulowane przez antygen limfocyty B ulegną aktywacji, czy poniosą śmierć, może zadecydować sygnał pojawiający się w cząsteczce CD40, obecnej na wszystkich limfocytach B, której ligand, CD40L, w komórkach T dopełnia sygnalizację immunologiczną. Taki wniosek sformułowali Tsubata i wsp. na podstawie obserwacji, że jeżeli komórki B (linia WEHI) potraktować przeciwciałem anty CD40, to zwiększa się ekspresja genu *bcl-2*, pojawia się jego produkt, apoptoza jest zablokowana, postępuje proliferacja i rozwój komórek pamięci. Ligand CD40 obecny jest na aktywnych limfocytach T, komórkach nabłonkowych, monocytach, makrofagach i ukierunkowanych prekursorowych komórkach krwiotworzenia. We współpracy T-B zasadniczym ogniwem jest sygnalizacja przez CD40/CD40L tak, jak bezpośredni kontakt komórek dotyczy interakcji CD72/CD72L. Rezultatem jest dojrzewanie komórki B z przełączeniem izotypu klasy IgM na inne [3, 36].

Podobnie jak limfocyty T, także i limfocyty B mogą uczestniczyć w regulacji własnej zagłady [66]. Limfocyty B ze śledziona myszy o prawidłowej ekspresji FAS lub z defektem FAS (zespół *lpr*) poddano testowi cytotoksyczności z efektorowymi komórkami Th-1. Komórki B były uprzednio stymulowane przez LPS, przez CD40L lub przeciwciała przeciw IgM. Białko CD40L uzyskano z płynu hodowlanego komórek J558L. Sposób aktywacji komórek B przesądził o ich wrażliwości na cytotoksyczny atak komórek T. Mianowicie stymulacja przez ligand CD40 sprawiła, że stały się one niezwykle podatne na apoptozę za pośrednictwem FAS; w przeciwnieństwie, po stymulacji anty IgM, czyli przez receptor antygeny, komórki B były odporne na proces zagłady [66]. Jeżeli zaś stymulowano je obydwiema drogami, komórki B były odporne na apoptozę, co świadczy, że protekcja przez receptor antygeny bierze górę. Mechanizm regulacji apoptozy przez cząsteczki powierzchni CD40L/IgR mógłby zatem stanowić zawór bezpieczeństwa, dzięki któremu przeżywają limfocyty B z odpowiedzią antygeno-swoistą nawet mimo uruchomienia sygnalizacji FASL/FAS. Sprawa jest jednak bardziej skomplikowana, jeśli wrócimy do pracy Tsubaty i wsp. [88] według której ligand CD40 stanowi drogę zabezpieczenia żywotności komórek B (str. 12). Trzeba jednak zwrócić uwagę, że indukcja wrażliwości docelowych komórek B na cytotoksyczne działanie limfocytów T poprzez receptor FAS w doświadczeniach Rothsteina i wsp. [66] dotyczyła tylko takich warunków, gdy nie zachodziła jednoczesna sygnalizacja przez SIg. Izolowane z centrum rozrodczego grudki chłonnej limfocyty B giną w hodowli, jeżeli nie dokonać usieciowania (*crosslinking*) SIg [40, 41]. W wyniku takiego sygnału dochodzi do wzmożonej ekspresji genu *bcl-2* oraz białka powierzchni CD40.

Antygen CD40 jest więc cząsteczką krytyczną dla proliferacji limfocytów B, przełączenia klasy Ig i umknienia przed apoptozą tych komórek B w centrach rozrodczych, które przeszły somatyczną mutację. CD40 też należy do rodziny receptorów TNF i NGF. Nie ma on aktywności kinazowej, a przekazywanie sygnału

odbywa się za sprawą innej cząsteczki sprzężonej i współdziałającej, nazwanej przez Hu i wsp. CD40bp (od *CD40 binding protein*) [25]. To białko wiąże się z N-terminalną częścią cytoplazmatyczną receptora CD40 i cechuje się strukturalnym motywem palca pierścieniowego (*RING finger*).

Przy wykorzystaniu systemu CD40 rozwinięto techniki długodystansowej hodowli limfocytów B, niejako urągające apoptozie *in vitro*. Aktywacja CD40 przez rozpuszczalne monoklonalne przeciwciała i przez anty IgR pozwala na ekspansję *in vitro* przez ponad 10 tygodni limfocytów B z migdałków, śledziony, krwi obwodowej i krwi pępowinowej. Hodowla limfocytów B przy wykorzystaniu antygeny CD40 była porównywana z centrum rozrodczym *in vitro* [4].

W pracowni Nossala opracowano myszy model apoptozy komórek B *in situ* [63]. Naśladuje on sytuację uczulonych i nadmiernie zmutowanych w loci Ig limfocytów B grudek śledzionowych. Antygenem uczulającym był związek nitrofenylowy (NP) zawierający hapten w sprzężeniu z albuminą ludzkiej surowicy, podany dootrzewno. Limfocyty B ulegały gwałtownej apoptozie *in situ* (met. TUNEL w skrawkach parafinowych tkanki śledziony) jeśli po 6 dniach podano przypominającą dawkę rozpuszczalnego antygeny, która dotarła do sieci komórek dendrytycznych grudki. Rozległe obszary apoptozy były widoczne w miazdze jasnej i ciemnej śledziony myszek C57Bl/6, szczyt zmian był po 4 godzinach od drugiego wstrzyknięcia antygeny. Prawie jednocześnie Shokat i Goodnow [76] przedstawili przy pomocy tej samej metody TUNEL *in situ* dwie fale apoptozy komórek B w grudkach chłonnych śledziony po podaniu przypominającej dawki rozpuszczalnego antygeny DEL lub HEL (od *duck egg lysozyme* i *hen egg lysozyme*) dootrzewnowo myszkom C57Bl/6. Pierwsza fala apoptozy pojawiła się w centrum rozrodczym grudki chłonnej a druga w strefie obwodowej bogatej w komórki T. Wymuszona ekspresja genu *bcl-2* u myszek transgenicznych zahamowała eliminację immunoreaktywnych komórek B, zależną od komórek T.

Przytoczone powyżej przykłady dowodzą czynnej kontroli komórkowej w sytuacji hiperimmunizacji limfocytów B. Wybór apoptozy w tych okolicznościach może być sposobem na regulację proliferowania klonów nowotworowych.

PROCESY APOPTOZY W BIAŁACZKACH I ROLA CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH

Dalszym użytecznym modelem do badań apoptozy jest linia promielocytów HL-60, wyprowadzona z komórek szpiku chorej na białaczkę promielocytową [10]. Komórki tej linii oscylują, w zależności od indukcyjnego mikrośrodowiska farmakologicznego, pomiędzy fenotypem stransformowanych promielocytów a różnicujących granulocytów lub monocytów i makrofałów. Pierwszemu kierunkowi sprzyja dodatek do podłoża pochodnych kwasu retinowego, drugiemu – dodatek estrów forbolu [10]. Różnicowaniu komórek HL-60 w hodowli towarzyszy nieuchronnie apoptoza niezależnie od sposobu różnicowania. Komórki HL-60 cechuje brak obydwu

kopii protoonkogenu p53 i znaczna amplifikacja protoonkogenu c-myc [10, 98]. Insercja genu p53 wspomaga proces różnicowania i opóźnia apoptozę [79]. W podobnym kierunku wpływa wymuszona ekspresja genu *bcl-2* w wyniku jego insercji z retrowirusem do komórek HL-60 [12, 55]. W badaniach Gorczyca i wsp. apoptoza oraz endonukleoliza zachodziła w komórkach HL-60 już w trzy godziny po zastosowaniu wielu różnych leków używanych w klinicznej chemioterapii i wielokrotnie była zależna od fazy cyklu komórkowego i zdolności naprawczej [21].

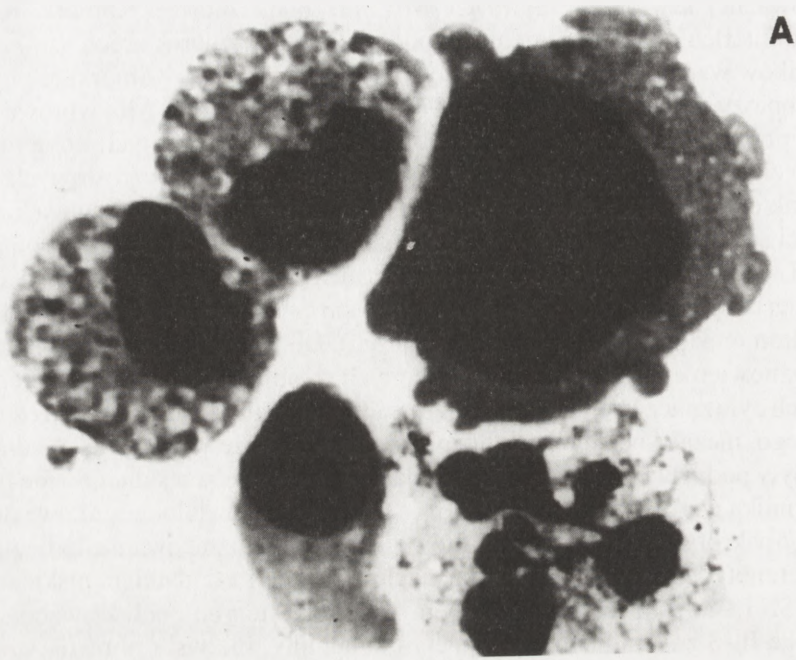
Przytoczone doświadczenia zwracają uwagę, że wrażliwość lub oporność na apoptozę zależy od fazy cyklu komórkowego. Mówią o tym także wyniki doświadczeń Komady i wsp. [34], którzy indukowali proces apoptozy za pośrednictwem receptora FAS (CD95) w komórkach z ostrej białaczki szpikowej. Analizując równocześnie stan cyklu komórkowego w cytometrze przepływowym i zdolność syntezy DNA na podstawie wbudowywania trytowanej trymidyny autorzy wykazali, że komórki odporne na apoptozę za pośrednictwem FAS stawały się wrażliwe, gdy przed dodaniem monoklonalnego przeciwciała anty FAS dodano do hodowli czynników wzrostowych: interleukiny-3 lub GM-CSF-czynnik stymulującego kolonie granulocytowo-makrofagowe. W wyniku aktywacji przejścia wczesnej fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego zwiększyła się liczba komórek w fazie S i jednocześnie zwiększyła się ich podatność na apoptozę. Od jednego z chorych ustalono linię komórkową MML-1 o dużej wrażliwości na indukcję śmierci programowanej za pośrednictwem receptora FAS. Na podstawie obserwacji tej linii wysunięto hipotezę, że sygnały hamujące wzrost i indukujące apoptozę za pośrednictwem receptora FAS/APO są przekazywane w czasie, gdy komórki wchodzi w przedział cyklu komórkowego G1B. Zjawisko to może zostać zakłócone w wyniku np. dodania estrów forbolu i zahamowania przejścia G1A do G1B z szybkim ubytkiem komórek w fazie S.

Manabe i wsp. [45] przedstawili pierwszy eksperymentalny dowód na indukcję apoptozy komórki krwiotwórczej przez cytokinę. Komórki pochodziły ze szpiku dzieci z ostrą białaczką B-limfoblastyczną. Te limfoblasty ginęły *in vitro* w procesie apoptozy z jednoczesnym blokiem proliferacji przed fazą S w wyniku 48 godzinnej inkubacji z interleukiną 4. Wpływ tej cytokiny na kontrolne limfoblasty populacji B był różny i zależał od stadium ich różnicowania, im młodsze były komórki, tym bardziej był zaznaczony. Autorzy wskazują w dyskusji na możliwości biologicznej chemioterapii pacjentów wysokiego ryzyka z tego typu białaczką.

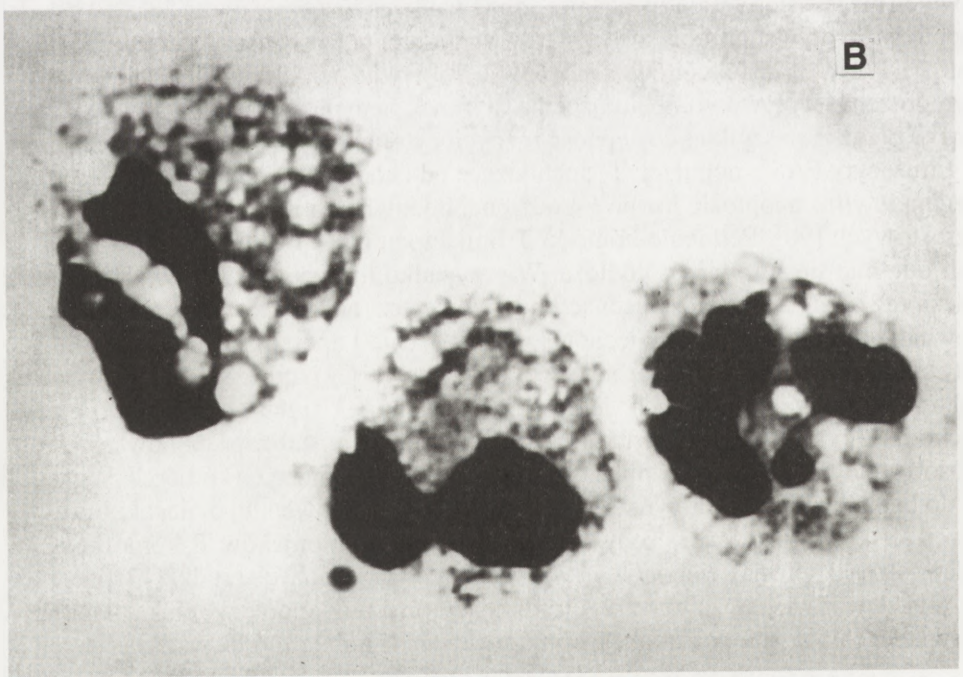
Rola czynników wzrostowych hemopoety w modulacji apoptozy zdaje się polegać na zmianie w cyklu komórkowym. Dotychczas było wiadomo, że czynniki wzrostowe są sygnałami przeżycia oraz mitogenezy i sprawiają, że namnożeniu określonej populacji towarzyszy różnicowanie i dalszy rozwój. Przeżycie komórek macierzystych wieloważnych i ukierunkowanych krwiotworzenia wymaga stałej obecności czynników wzrostowych [38] niezależnie od determinacji różnicowania w myśl modelu stochastycznego [86] czy indukcyjnego [11, 49, 70]. Badaniom proliferacji i różnicowania dawniej nie towarzyszyły regularne pomiary programowanej śmierci. Wyjaśnienie tych zależności podjęto drogą hodowli *in vitro* komórek linii macierzy-

stej wieloważnej krwiotwórczej FDCP-Mix, nie białaczkowej. Komórki te były zależne od interleukiny-3 i różnicowały pod wpływem komórek zrębu szpikowego lub czynników wzrostowych, rozpuszczonych w podłożu [17]. Komórki te ginęły w drodze apoptozy po usunięciu IL-3 [17, 96]. Do komórek FDCP-Mix wprowadzono gen *bcl-2* przy pomocy wektora plazmidowego i po preselekcji tych komórek pod względem ekspresji genu *bcl-2* w podłożach z i bez czynników wzrostowych dokonano charakterystyki molekularnej ekspresji i produktu genu *bcl-2*. Analiza kinetyki żywotności i apoptozy w obu typach komórek w odpowiedzi na usunięcie i ponowne dodanie IL-3 była prowadzona metodą cytometrii przepływowej. Okazało się, że zwiększonej ekspresji genu *bcl-2* towarzyszyło znaczne opóźnienie apoptozy komórek (80% komórek przesunęło się do fazy Go-G1). Dodanie po 8 dniach IL-3 spowodowało wznowienie proliferacji po następnych 4 dniach. Śmiertelność komórek kontrolnych była znacznie wyższa. Ustanie proliferacji było zależne od braku czynnika wzrostowego, niezależne od ekspresji genu *bcl-2*. Jednakże w tym czasie 8 dni, gdy komórki były pod wpływem wymuszonej ekspresji genu *bcl-2* a jednocześnie pozbawione czynnika wzrostowego, odbywało się różnicowanie wielokierunkowe do granulocytów/makrofagów lub erytroblastów. Te profile różnicowania były porównywalne z fenotypem komórek pozostających w hodowli z dodatkiem niskiej dawki IL-3, G-CSF i GM-CSF oraz z fenotypem komórek, których podłoże wzbogacono niską dawką IL-3 z dodatkiem erytropoetyny i heminy. Pierwsze obrazują różnicowanie do granulocytów/makrofagów, drugie do erytroblastów. Z przebiegu tego doświadczenia autorzy wysunęli wniosek, że rola hemopoetycznych czynników wzrostowych nie jest pierwotnie związana z dojrzewaniem i różnicowaniem, lecz z supresją apoptozy i wpływem mitogennym. Te dwa ostatnie procesy zostały rozprzęgnięte w linii FDPC w transfektantów genu *bcl-2*. Taki wniosek oczywiście nie przeczy wybiórczemu wpływowi modulującemu kierunek hemopoezy, jaki jest wywierany *in vivo* przez zrąb szpiku i dostępność różnych cytokin i surowic *in vitro* [80].

Limfocyty FAS⁺ populacji T, pochodzące od chorych z mononukleozą zakaźną, ulegają *in vitro* apoptozie już po 6-godzinnej hodowli, jeśli nie doda się czynników wzrostowych [90]. Podobnie komórki T linii Jurkat CD4⁺ są podatne na apoptozę, jeśli odejmie się surowicę z podłoża. W przypadku limfocytów T cytotoksycznych zależnych od IL-2 wystarczy usunąć z hodowli ten czynnik wzrostowy, aby nastąpiło wewnątrzkomórkowe przesunięcie pH, zakwaszenie i apoptoza [39]. Nawet limfocyty białaczkowe z przewlekłej białaczki limfocytowej CLL udaje się dłużej utrzymać w hodowli *in vitro*, jeśli doda się do pożywki komórek zrębu szpiku. Wniosek ten pochodzi z pracowni Hoffbranda i na jego podstawie został zaproponowany nowy sposób hodowli, naśladujący mikrośrodowisko fizjologiczne tych komórek i użyteczny do badań wzrostu i lekowrażliwości limfocytów z przewlekłej białaczki limfocytowej [60]. Do znaczącej cechy limfocytów CLL i chłoniaków B-komórkowych należy stała ekspresja genu *bcl-2*, nawet w centrach rozrodczych grudki chłonnej [40, 58, 91]. Uważa się ją za czynnik utrudniający przebieg apoptozy, co potwierdziły doświadczenia ze stabilną infekcją komórek mysich i linii komórek ludzkich retrowi-



A



B

rusem zawierający rekombinowany *bcl-2* [58, 89]. Ponnathpur i wsp. w pracowni Reeda przenieśli gen *bcl-2* do komórek linii 697 ludzkiego chłoniaka i obserwowali wpływ tej wymuszonej ekspresji na fragmentację DNA i apoptozę komórek chłoniaka pod wpływem taxolu. Lek ten powoduje przedłużoną blokadę metafazy co może stworzyć warunki sprzyjające endonukleolizie i fragmentacji DNA wobec długoczasowego wymieszania przedziałów jądra i cytoplazmy. Transfer genu *bcl-2* wpływał na obniżenie tego zjawiska [61].

Rozległy jest dział chemioterapii i badań apoptozy komórek białaczkowych. Aktywacja programu śmierci jest zależna od napływu Ca^{2+} do cytosolu, stanu pobudzenia komórki i stanu kinazy proteinowej C. McConkey i wsp. potwierdzili, że hormon glikokortykosterydowy, jonofor jonów wapniowych i przeciwciała anty IgM indukują śmierć programowaną limfocytów B białaczkowych CLL, a estry forbolowe blokują ten proces [47]. Podobne wyniki otrzymano dla niebiałaczkowych limfocytów kontrolnych z migdałków. To sugeruje, że stan aktywacji kinazy białkowej C zmniejsza podatność komórek na śmierć.

Udział napływu do cytosolu jonów wapniowych w spontanicznej i polekowej apoptozie potwierdził Robertson i wsp. [65]. Wewnątrzkomórkowa chelacja wapnia udaremniała fragmentację DNA do nukleosomalnych multimerów w komórkach białaczkowych B z CLL. Obserwowano jednocześnie pewną zależność rozmiarów fragmentacji DNA od stanu klinicznego pacjenta. Niższy rozmiar fragmentacji był odnotowany u chorych wysokiego ryzyka, opornych na leczenie. W dyskusji poruszono także rolę komórkowego białka Bcl-2 modulującego wapń $^{2+}$ w cytosolu. O podobnej zależności między intensywnością apoptozy *in vitro* a stanem klinicznym pacjenta wspomina praca Begleitera i wsp. [5]. Autorzy analizowali proces fragmentacji DNA w komórkach z CLL, pobieranych *ex vivo* w przerwie terapii chlorambucylem i inkubowanych *in vitro* przez 72 godziny z tym lekiem. Zmian apoptotycznych DNA *in vitro* nie było ani przed leczeniem, ani tuż po leczeniu, jednak wyraźna apoptoza wystąpiła *in vitro* po terapii *in vitro* i była zbieżna ze spadkiem liczby limfocytów we krwi chorego. Wynika z tego wniosek, że pomiary zdolności fragmentacji DNA w komórkach białaczkowych w określonych warunkach *in vitro* mogą mieć pewne znaczenie w monitorowaniu leko-wrażliwości i prognozy leczenia.

Jednak badania *in situ* węzłów chłonnych w chłoniakach nie-Hodgkinowskich nie uchwyciły różnic w intensywności apoptozy zależnie od histologicznego stopnia oceny złośliwości. Apoptoza była niewielka lub znikoma. Natomiast badania tą samą metodą ISEL w skrawkach parafinowych komórek pochodzących z utkania szpiku w zespole myelodysplastycznym, wykryły oznaki znacznej apoptozy i to nie tylko w jądrach komórek myelopoetycznych i myeloidalnych, ale także w erytroblastach,

Fot. 2. Mikrofotografia komórek mieloidalnych z krwi obwodowej chorego na przewlekłą białaczkę szpikową (CML) leczonego hydroksymocznikiem: A – w trakcie leczenia, B – po podaniu komórek *in vitro* działaniu hydroksymocznika ($1,3 \times 10^{-6}$ M) przez 2 godz.; obraz apoptozy komórek z fragmentacją jąder i zagęszczeniem chromatyny w B; preparaty z cytowirówki, barwienie May-Grünwald-Giemsa, fotografia w mikroskopie, powiększenie x 1250; fotografia ze zbioru pani dr Agaty Filip

jądrach dojrzałych megakariocytów oraz komórek zrębu szpiku łącznie z komórkami śródbłonna, fibroblastami i komórkami beleczkowatymi [52].

MOLEKULARNE BADANIA W FAZIE WYKONAWCZEJ APOPTOZY

Pozostał do omówienia etap prowadzący od sygnałów śmierci do aktywacji swoistych proteaz i endonukleaz, dokonujących ostatecznego pocięcia białek chromatyny i proteolizy innych białek cytoszkieletu i cytoplazmy. Jednym z najwcześniejszych argumentów na udział proteaz w immunologicznym procesie apoptozy było uwalnianie perforyny z ziarnistości cytoplazmatycznych limfocytów T i NK oraz proteaz serynowych z granzymem B i fragmentyną-2, nazwaną przez Shi i wsp. [73] pocałunkiem śmierci. Auto-apoptoza komórek T aktywowanych przez TCR też jest zależna, jak inne drogi śmierci fizjologicznej, od proteazy serynowej lub cysteinowej [71]. Podobnie w wyniku sygnalizacji przez FAS w apoptozie komórki docelowej uczestniczy proteaza ICE (od *interleukin-1 β -converting enzyme*) [43] opisana w pracach Kaufmana i wsp. oraz Wilsona i wsp. [29, 97] i Nicholsona i wsp. [57]. Cysteinowa proteaza ICE katalizuje przekształcenie formy prekursorowej interleukiny 1 β do formy biologicznie aktywnej i to jej działanie jako konwertazy nie ma nic wspólnego z apoptozą.

Proteaza ICE cechuje się znaczną homologią z produktem genu CED-3, wspomnianym już genem śmierci nicienia *C.elegans* [16, 37, 103]. Z wyników tych autorów można przypuszczać, że cytotoksyczna aktywność wywierana przez czynnik martwicy nowotworów TNF przebiega wolniej niż przez receptor FAS/APO. Jednak receptor TNF i FAS mają podobną molekularną domenę zabójczą (*killing domain*) w części cytoplazmatycznej i te dwa receptory przekazują następnie sygnał do cząsteczki podobnej do ICE. To świadczy, że mechanizm apoptozy jest zabezpieczony od dawien dawna w czasie ewolucji od nicieni do ssaków [16, 103]. Do tego dołącza się fakt, że fizjologiczna śmierć pewnej puli komórek w rozwoju nicienia pod wpływem genu CED-3, kodującym proteazę CED, jest hamowana przez produkt genu CED-9 podczas gdy apoptoza limfocytów za pośrednictwem FAS dokonuje się działaniem proteazy ICE i jest hamowana przez produkt genu *bcl-2*, homologu genu CED-9 u ssaków [51]. Reasumując, aktywacja proteazy ICE i jej pokrewnych jest zdarzeniem krytycznym w śmierci komórek za pośrednictwem FAS/APO. Udział tych proteaz w programowanej śmierci komórek ssaków został potwierdzony przez działanie swoistych inhibitorów, które nieodwracalnie wiążą się do cysteiny-aktywnego miejsca enzymu. Należą do nich pewne metylo-ketono-peptydy i aldehydo-peptydy [57].

Ostatnio stwierdzono, że białko REAPER (RPR) mające pewną homologię w domenie zabójczej z FAS i TNFR-1 i kontrolujące apoptozę komórek *Drosophila melanogaster* w czasie rozwoju embrionalnego, też działa za pośrednictwem prote-

azy podobnej do konwertazy interleukiny-1 β (ICE), a więc tej, którą posługują się sygnały z FAS/APO-1 lub TNFR kręgowców. Indukowano ekspresję genu *reaper* stosując transfekcję cDNA RPR do komórek *Drosophila melanogaster* linii Schneider *in vitro* pod kontrolą genu metalotioneiny (Mt-RPR). Pod wpływem dodatku siarczynu miedzi doszło do gwałtownej, choć niejednoczesnej apoptozy komórek, poprzedzonej ekspresją mRNA *rpr*. Cytotoksyczne sygnały od małego wewnątrzkomórkowego peptydu RPR były zablokowane inhibitorem ICE (Z-VAD-fmk)-N-benzylloksykarbonylo-Val-Ala-Asp-fluorometylo-ketono-peptydem. Ten fakt posłużył za argument, że apoptotyczna proteaza muszki owocowej należy do tej samej grupy enzymatycznej co proteazy typu ICE kręgowców [62]. Praca ta zwraca jednocześnie uwagę na rolę ceramidów jako wtórnego przekaźnika w procesie apoptozy; prawdopodobnie związki te powstają w wyniku jednoczesnej aktywacji sfingomieliny lub syntezy *de novo* krótko po indukcji apoptozy.

Innym sposobem zahamowania apoptozy jest zastosowanie konstruktów antysensowego ICE lub wymuszona ekspresja genu kodującego inhibitor CrmA, produkt wirusa ospy bydłowej. Inhibitor CrmA należy do nadrodziny serpin tak, jak inhibitory aktywacji plazminogenu [85].

W latach 1994–1995 wykryto dalsze homologi ICE/CED-3, uczestniczące w egzekucji apoptozy: ICH-1/NEDD-2, CPP32/YAMA, Tx/icH-2, MCH-2 [46]. Mają one wspólny i ewolucyjnie stabilny pentamerowy peptyd QACR w miejscu aktywnym enzymu (Cys). Każdy z nich może wszcząć apoptozę po transfekcji. Nicholson i wsp. nadali nazwę apopainą oczyszczonej aktywnej formie CPP z proenzymu CPP32. Proteaza ta jest odpowiedzialna za rozkład poli (ADP-rybozo) polimerazy -PARP. Substrat PARP jest enzymem jądrowym uczestniczącym w naprawie DNA, kontroli integralności genomu w odpowiedzi na stres zakłóceń z zewnątrz. Rozkład proteolityczny przez apopainę w określonych miejscach PARP prowadzi do rozdzielenia 2 podczęści z motywem palca cynkowego w części aminokwasowej od domeny katalizującej poli (ADP-rybozylację) w części karboksyterminalnej. W wyniku rozkładu PARP staje się niezdolna do naprawy DNA i utrzymania genomu [57].

Nicholson i wsp. wykazali też, że znana dotąd jako główna oznaka apoptozy – aktywność endonukleazy [14, 100], zależnej od jonów wapnia i magnezu ulega negatywnej regulacji w wyniku poli (ADP-rybozylacji). Gdy brak działania PARP, endonukleaza staje się bardzo aktywna w umierających komórkach. Także inne proteazy, takie jak: trypsyna, chromotrypsyna, proteinaza K, granzym B, mogą indukować apoptozę [57].

Dokonanie aktywnej fazy apoptozy w układzie bezkomórkowym wniosło argumenty dla preaktywacji cytoplazmatycznych enzymów proteolitycznych w określonym etapie cyklu komórkowego. Lazebnik i wsp. [37] potraktowali izolowane jądra komórek HeLa (zawierające enzym PARP) lub oczyszczony enzym jądrowy PARP, wyciągiem z cytoplazmy komórek kury linii DU249, które były skazane na apoptozę w wyniku presynchronizacji cyklu komórkowego działaniem afidikoliny i następnie zgromadzone w fazie M. Ten wyciąg cytoplazmatyczny, zwany też ekstraktem S/M

dokonał fragmentacji jąder komórkowych HeLa lub oczyszczonego enzymu PARP w ciągu 3 minut. Inne białka pozostały nienaruszone. Natomiast Newmeyer i wsp. [56] w pracowni Reeda odtworzyli zjawiska destrukcji jąder wątroby szczura w kilka godzin po zadziałaniu na nie wyciągiem z cytoplazmy jaj żabich, złożonych po upływie 14 dni od wstrzyknięcia samicy gonadotropiny łożyskowej. Warunki autentyczności tego modelu potwierdziła kondensacja chromatyny, fragmentacja jąder, drabinki nukleosomalnych fragmentów DNA. Proces degradacji był hamowany jonami cynku i inhibitorem proteaz cysteinowych a blokowany przez białko Bcl-2. Autorzy zauważyli także, że pewna szczególna frakcja komórkowa, bogata w mitochondria jest potrzebna do wykonawczej fazy apoptozy. W uwarunkowaniu fizjologicznym tego zjawiska autorzy odwołują się do atrezji owocytów jako rodzaju śmierci haploidalnej gamety. Wspólną cechą tych ostatnich doniesień jest zwrócenie uwagi na cytoplazmatyczną gotowość do wykonania apoptozy, gotowość zależną od cyklu komórkowego komórki. Punkt S/M cyklu zastrzeżony dla ostatniego doświadczenia może sugerować, że geny znaczące dla mitozy są krytyczne dla apoptozy.

Stan aparatu mitochondrialnego w okresie poprzedzającym doświadczalną apoptozę był badany w pracy Castedo i wsp. [8]. Zauważono dyskretne zmiany potencjału wewnątrzblonowego mitochondrium jeszcze przed wystąpieniem oznak jądrowych apoptozy w limfocytach T pod wpływem różnych czynników antygenowych, hydrokortyzonu i wirusa HIV w warunkach *in vitro*.

W niekończącym się repertuarze nowych cząsteczek związanych z apoptozą należy wspomnieć o nowym członku rodziny *bcl-2*, genie *bak* (od *bcl-2 homologous antagonist/killer*) [9]. Hamowaniu apoptozy działaniem genu *bcl-2* przeciwstawia się produkt genu *bak* [32]. Przypomina to wpływ onkogenów *myc* i *abl* mających alternatywne funkcje na wzrost i apoptozę [48].

W podsumowaniu nasuwają się refleksje:

Los komórek limfopoetycznych spoczywa w delikatnych wahaniach równowagi pomiędzy sygnalizacją immunologiczną, nadrzędnym mechanizmem regulacyjnym przy udziale mechanizmów cyklu komórkowego, poziomu i aktywacji kinaz cyklu, produktami onkogenów, szczególnie rodziny *bcl-2*, *myc* i *p53* a aktywacją proteaz typu ICE(CED-3)CPP. Dwa ostatnie protoonkogeny kodują czynniki transkrypcyjne. Rola produktów genów *bcl-2* i *bak* jest, jak dotąd, nierozszyfrowana. Może tu leży rozwiązanie kaskady aktywowanych proteaz?

Niektóre tu przedstawione metody indukcji apoptozy limfocytów zdają się naśladować drogi fizjologicznej, planowanej *a priori*, śmierci komórki. Mogą zatem stanowić pretekst do myślenia, jak wykształciły się takie formy kontroli homeostazy i jak je wykorzystać do niszczenia komórek nowotworowych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALLEN PO, BUSTIN SA, NEWLAND AC. The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. *Blood Rev* 1993; **7**: 63–73.
- [2] ANEL A, SIMON AK, AUPHAN N, BUFERNE M, BOYER C, GOLDSTEIN P, SCHMITT-VERHULST AM. Two signalling pathways can lead to FAS ligand expression in CD8 – cytotoxic T lymphocyte clones. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 3381–3387.
- [3] ARMITAGE RJ, FANSLAW WC, STROCKBINE L, SATO AT, CLIFFORD KN, MCDUFF BM, ANDERSON DM, GIMPEL SD, DAVIS SMITH T, MALISZEWSKI CR, CLARK EA, SMITH CA, GRABSTEIN KH, COSMON D, SPRIGGS MK. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 1992; **357**: 80–83
- [4] BANCHERAU J, ROUSSET F. Growing human B lymphocytes in the CD40 system. *Nature* 1991; **353**: 678–679.
- [5] BEGLEITER A, LEE K, ISRAELS LG, MOWAT MRA, JOHNSTON JB. Chlorambucil induced apoptosis in chronic lymphocytis leukemia (CLL) and its relationship to clinical efficacy. *Leukemia* 1994; **Suppl 8**: 103–106.
- [6] BRUNETTI M, MARTELLI N, COLASANTE A, PIANTELLI M, MUSIAMI P, AJELLO FB. Spontaneous and glucocortikoid-induced apoptosis in human mature T lymphocytes. *Blood* 1995; **86**: 4199–4205.
- [7] BRUNNER T, MOGLIRJ, LAFACED, YOO NJ, MAHBOUBI A, ECHEVERRIF, MARTIN SJ, FORCE WR, LYNCH DH, WARE CF, GREEN DR. Cell-autonomous Fas (CD95) / Fas-ligand interaction mediates activation induced apoptosis in T cell hybridoma. *Nature* 1995; **373**: 441–444.
- [8] CASTEDO M, MACHO A, ZAMZAMI N, HIRSCH T, MARCHETTI P, URIEL J, KROEMER G. Mitochondrial perturbations define lymphocytes undergoing apoptotic depletion *in vitro*. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 3277–3284.
- [9] CHITTENDENT T, HARRINGTON EA, OCONNOR R, FLEMINGTON C, LUTZ RJ, EVANGI, GUILD BC. Induction of apoptosis by the *Bcl-2* homologue Bak. *Nature* 1995; **374**: 733–736.
- [10] COLLINS SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation and cellular oncogene expression. *Blood* 1987; **70**: 1233–1244.
- [11] CURRY JL, TRENTIN JJ. Hemopoietic spleen colony studies. I. Growth and differentiation. *Develop Biol* 1967; **15**: 395–413.
- [12] DELIA D, AJELLO A, SOLIGO D, FONTANELLA E, MELANIC, PEZZELLA F, PIEROTTI M, DELLA PORTA G. *Bcl-2* protooncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells. *Blood* 1992; **79**: 1291–1298.
- [13] DHEIN J, WALCZAK H, BÄUMLER C, DEBATIN KM, KRAMMER PH. Autocrine T cell suicide mediated by APO-1/FAS (CD95). *Nature* 1995; **373**: 438–441.
- [14] DUKE RC, CHERVENAK R, COHEN JJ. Endogenous endonuclease induced DNA fragmentation: an early event in cell mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **80**: 6361–6365.
- [15] DUKE RC, PERSECHINI PM, CHANG S. Purified perforin unduces target cell lysis but not DNA fragmentation. *J Exp Med* 1989; **170**: 1451–1456.
- [16] ENARI M, HUG H, NAGATA S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1995; **375**: 78–81.
- [17] FAIRBAIRN LJ, COWLING CJ, REIPERT BM, DEXTER TM. Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell* 1993; **74**: 823–832.
- [18] FRIZZERRA G, KANEKO Y, SAKURAI M. *Leukaemia* 1989; **3**: 1–5. ref. wg WATANABE FUKUNAGA R et al. *Nature* 1992; **356**: 314–317.

- [19] GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 493–501.
- [20] GOLD R, SCHMIED M, ROTHE G, ZISCHLER H, BREITSCHOPF H, WEKERLE H, LASSMAN H. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: Application of *in situ* nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1993; **41**: 1023–1030.
- [21] GORCZYCA W, GONG J, ARDELT B, TRAGANOS F, DARZYŃKIEWICZ Z. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced in various antitumor agents. *Canc Res* 1993; **53**: 3186–3192.
- [22] GOULD KL, NURSE P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2⁺ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* 1989; **342**: 39–45.
- [23] GUANO P, BERNARDI R, NEGRI C, DONZELLI M, PROSPERI E, ASTALDI-RICOTTI G, SCOVASSI I. Dose dependent zink inhibition of DNA ladder in apoptotic HeLa cells regulated the activity of poly (ADP-ribose) polymerase and does not protect from death induced by VP-16. *Cell Death Differentiation* 1994; **1**: 101–107.
- [24] HAYES MP, BERREBI GA, HENKART PA. Induction of cell DNA release by the cytotoxic T lymphocyte granule protease granzyme A. *J Exp Med* 1989; **170**: 933–946.
- [25] HU HM, OROURKE K, BOGUSKI MS, DIXIT VM. A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30069–30072.
- [26] ITOH N, YONEHARA S, ISHII A, YONEHARA M, MIZUSHIMA S-I, SAMESHIMA M, HASE A, SATO Y, NAGATA S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen FAS can mediate apoptosis. *Cell* 1991; **66**: 233–236.
- [27] JU S-T. Distinct pathways of CD4 and CD8 cells induce rapid target DNA fragmentation. *J Immunol* 1991; **146**: 812–818.
- [28] JU S-T, PANKA DJ, CUI H, ETTINGER R, EL-KHATIB M, SHERR DH, STANGER BZ, MARSHAK-ROTHSTEIN A. FAS (CD95)/FasL interaction required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995; **373**: 444–448.
- [29] KAUFMANN SH, DESNOYERS S, OTTAVIANO Y, DAVIDSON NE, POIRIER GG. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993; **53**: 3976–3985.
- [30] KAWABE Y, OCHI A. Programmed cell death and extrathymic reduction of VB8⁺ CD4⁺ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* 1991; **349**: 245–248.
- [31] KÄGI D, SEILER P, PAVLOVIC J, LEDERMANN B, BÜRKI K, ZINGERNAGEL RM, HENGARTNER H. The roles of perforin- and Fas - dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and noncytopathic viruses. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 3256–3262.
- [32] KIEFER MC, BRAUER MJ, POWERS VC, WU JJ, UMANSKY SR, TOMEL LD, BARR PJ. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995; **374**: 736–739.
- [33] KOCKIJ, ROŻYŃKOWA D. Gen bcl-2 w patofizjologii limfocytów B. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 169–182.
- [34] KOMADA Y, ZHOU X-L, XUE H-L, SAKAI H, TANAKA S, SAKATOKU H, SAKURAI M. Fas receptor (CD95)-mediated apoptosis is induced in leukemic cells entering G1B compartment of the cell cycle. *Blood* 1995; **86**: 3848–3860.
- [35] KORSMEYER S. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; **80**: 879–886.
- [36] LANE P. Soluble CD40 ligand can replace the normal T cell delivered CD40 ligand signal to B cells in T cell dependent activation. *J Exp Med* 1993; **177**: 1208–1213.
- [37] LAZEBNIK YA, KAUFMANN SH, DESNOYERS S, POIRIER GG, EARNSHOW WC. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994; **371**: 346–347.

- [38] LEARY AG, ZANG HQ, CLARK SC, OGAWA M. Growth factor requirements for survival in G₀ and entry into the cell cycle of primitive human haemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4013–4017.
- [39] LI J, EASTMAN A. Apoptosis in interleukin-2 dependent cytotoxic T lymphocyte cell line is associated with intercellular acidification. Role of the Na⁺/H⁺ - antiport. *J Biol Chem* 1995; **270**: 3203–3211.
- [40] LIU Y-J, MASON DDY, JOHNSON GD, ABBOT S, GREGORY CD, HARDIE DL, GORDON J, MACLENNAN JCM. Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 1905–1910
- [41] LIU Y-J, JOSHUA DE, WILLIAMS GT, SMITH CA, GORDON J, MCLENNAN JCM. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centers. *Nature* 1989; **342**: 929–934.
- [42] LIU Z-G, SMITH SW, MACLAUGHLIN KA, SCHWARTZ LM, OSBORNE BA. Apoptotic signals delivered through the T cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene *nur 77*. *Nature* 1994; **367**: 281–284.
- [43] LOS M, VAN DE CRAEN M, PENNING LC, SCHENK H, WESTENDORP M, BAUERLE PA, DRÖGE W, KRAMMER PH, FLERS W, SCHULZE-OSTHOFF K. Requirement of an ICE/CED-3 protease for FAS/APO-1 mediated apoptosis. *Nature* 1995; **375**: 81–83.
- [44] LOWIN B, HAHNEM, MATTMANN C, TSCHOPP J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 1994; **370**: 650–652.
- [45] MANABE A, COUSTAN SMITH E, KUMAGI M, BEHM FG, RAIMONDI SC, PUI C-H, CAMPANA D. Interleukine-4 induces programmed cell death (apoptosis) in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1994; **83**: 1731–1737.
- [46] MARTIN SJ, GREEN DR. Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts. *Cell* 1995; **82**: 349–352.
- [47] MCCONKEY DJ, AGUILLAR-SANTELISES M, HARTZELL P, ERIKSSON I, MEL-LSTEDT H, ORRENIUS S, JONDAL M. Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* 1991; 1072–1076.
- [48] MCGAHON AJ, COTTER TG, GREEN DR. The *abl* oncogene family and apoptosis. *Cell Death Differentiation* 1994; **1**: 77–83.
- [49] METCALF D. Lineage commitment of haemopoietic progenitor cells in developing blast cell colonies: influence of colony stimulating factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 11310–11314.
- [50] MEYAARD L, OTTO SA, JONKER RR, MIJNSTER MJ, KEET RPM, MIEDEMA F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 1992; **257**: 217–219.
- [51] MIURA M, ZHU H, ROTELLO R, HARTWIEG EA, YUAN J. Induction of apoptosis in fibroblasts by *Il-1b*-Converting Enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 1993; **75**: 653–660.
- [52] MUNDLE S, INFTIKHAR A, SHETTY V, ALVI S, DAMERON S, GREGORY S, MARCUS B, KHAN S, RAZA A. In situ end labeling of DNA to detect apoptotic cell death in a variety of human tumors. *Cell Death Differentiation* 1994; **1**: 117–122.
- [53] MURAKAMI M, TSUBATA T, OKAMOTO M, SHIMIZU A, KUMAGAI S, IMURA H, HONJO T. Antigen induced apoptotic death of *Ly-1* B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice. *Nature* 1992; **357**: 77–80.
- [54] NAKAYAMA K-I, NAKAYAMA K, NEGISHI I, KUIDA K, SHINKAI Y, LOUIE MC, FIELDS LE, LUCAS PJ, STEWART V, ALT FW, LOH DY. Disappearance of the lymphoid system in *Bcl-2* homozygous mutant chimeric mice. *Science* 1993; **261**: 1584–1587.
- [55] NAUMOVSKI L, CLEARY ML. *Bcl-2* inhibits apoptosis associated with terminal differentiation of *HL-60* myeloid leukemia cells. *Blood* 1994; **83**: 2261–2267.
- [56] NEWMAYER DD, FARSCHEON DM, REED JC. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by *BCL-2* and requirement for an organelle fraction in mitochondria. *Cell* 1994; **79**: 353–364.

- [57] NICHOLSON DW, ALI A, THORNBERRY NA, VAILLANTCOURT JP, DING CD, GALLANT M, GREAU Y, GRIFFIN PR, LABELLE M, LAZEBNIK YA, MUNDAY NA, RAJU SM, SMULSON ME, YAMIN TT, YU VL, MILLER DK. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; **376**: 37–43.
- [58] NUNEZ G, SATO M, SEREMETIS S, FERRERO D, GRIGNANI F, KORSMEYER SJ, DALLA-FAVERA R. Growth- and tumor- promoting effect of deregulated Bcl-2 in human B lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86** : 4589–4593.
- [59] OGASAWARA J, WATANABE-FUKUNAGA R, ADACHI M, MATUZAWA A, KASUGAI Y, ITOH N, SUDA T, NAGATA S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993; **364**: 806–809.
- [60] PANAYIOTIDIS P, JONES D, GANESHAGURU K, FORONI L, HOFFBRAND AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Br J Haematol* 1996; **92**: 97–103.
- [61] POUNATHPUR V, IBRADO AM, REED JC, RAY S, HUANG Y, SELF S, BULLOCK G, NAWABI A, BHALLA K. Effects of modulators of protein kinases on Taxol induced apoptosis of human leukemic cells possessing disparate levels of p26BCL-2 protein. *Clin Canc Res* 1995; **1**: 1399–1406.
- [62] PRONK GJ, RAMER K, AMIRI O, WILLIAMS LT. Requirement of an ICE-like protease for induction of apoptosis and generation by REAPER. *Science* 1996; **271**: 808–810.
- [63] PULENDRAM B, KANNOURAKIS G, NOURI S, SMITH KGC, NOSSAL GJV. Soluble antigen can cause enhanced apoptosis of germinal centre B cells. *Nature* 1995; **375**: 331–334.
- [64] RAHELUM, WILLIAMS GT, KUMARARATNE DS, EATON GC, GASTON JSH. Human CD4+ cytolytic T cells kill antigen-pulsed target T cells by inductions of apoptosis. *J Immunol* 1993; **150**: 4856–4866.
- [65] ROBERTSON LE, CHUBB S, MEYN RE, STORY M, FORD R, HITTELMAN WN, PLUNKETT W. Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9- β D-rabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood* 1993; **81**: 143–150.
- [66] ROTHSTEIN TL, WANG JKM, PAKA DJ, FOOTE LC, WANG Z, STANGER B, CUI H, JU S-T, MARSHAK-ROTHSTEIN A. Protection against Fas-dependent TH1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. *Nature* 1995; **374**: 163–165.
- [67] ROUVIER E, LUCIANI MF, GOLDSTEIN P. *J. Exp Med* 1993; **177**: 995-200 cyt wg DHEIN et al. *Nature* 1995; **373**: 438–441
- [68] ROŻYŃKOWA D. Genetyczne regulacje apoptozy, programowanej śmierci komórki. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 303–318.
- [69] ROŻYŃKOWA D, ANTOSZ H, KOCKI J, FILLIP A, KWIATKOWSKA-DRABIK B, KOCZKODAJ D, SURDACKA A, WACH M, RUPNIEWSKA ZM. Bcl-2 and c-myc gene expression in chronic B cell leukaemia and non-Hodgkin lymphoma. *Applied Biol Communications* 1994; **4**: 3–50.
- [70] RUPNIEWSKA ZM, ROŻYŃKOWA D. Genetyczne aspekty różnicowania i odnawiania się komórek macierzystych. *Post Biol Kom* 1984; **11**: 93–118.
- [71] SARIN A, ADAMS DH, HENKART PA. Protease inhibitors selectively block T cell receptor triggered programmed cell death in a murine T cell hybridoma and activated T cells. *J Exp Med* 1993; **179**: 1693–1700.
- [72] SCHRÖTER M, LOWIN B, BORNER C, TSCHOPPJ. Regulation of Fas/Apo-1 (CD95)-and perforin-mediated lytic pathways of primary cytotoxic T lymphocytes by the protooncogene bcl-2. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 3509–3519.
- [73] SHI L, KRAUT RP, AEBERSOLD R, GREENBERG A. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J Exp Med* 1992; **175**: 553–566.
- [74] SHI L, NISHIOKA WK, THNG J, BRADBURY EM, LICHTFIELD DW, GREENBERG AH. Premature p34^{cdc2} activation required for apoptosis. *Science* 1994; **263**: 1143–1145.

- [75] SHI Y, SAHAI BM, GREEN D. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 1989; **339**: 625–626.
- [76] SHOKAT KM, GOODNOW CC. Antigen induced B cell death and elimination during germinal centre immune response. *Nature* 1995; **375**: 334–338.
- [77] SIKORA E. Czy znamy już gen śmierci? *Post Biochem* 1995; **41**: 210–211.
- [78] SMITH CA, WILLIAMS GT, KINGSTON R, JENKINSON EJ, OWEN JJT. Antibodies to CD3/T cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 1989; **337**: 181–184.
- [79] SODDU S, BLANDIO G, CITRO G, SCARDIGLIR, PIAGGIO G, FERBER A, CALABRETTA G, SACCHI A. Wild type p53 expression induces granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Blood* 1994; **83**: 2230–2237.
- [80] SPOONECER E, HEYWORTH CM, DUNNA, DEXTER TM. Self renewal and differentiation of IL-3 dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation* 1986; **31**: 111–118.
- [81] STRASSER A, WHITTINGHAMO S, VAUX DL, BATH ML, ADAMS JM, CORY S, HARRIS AW. Enforced Bcl-2 expression in B lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8661–8665.
- [82] TAKAHASHI T, TANAKA M, BRANNAN C, JENKINS NA, COPELAND NG, SUDA T, NAGATA S. Generalized lymphoproliferative disease in mice caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994; **76**: 969–976.
- [83] TANAKA M, SUDA T, TAKAHASHI T, NAGATA S. Expression of the functional soluble form of human FAS ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 1995; 1129–1136.
- [84] TELEFORD WG, KING LE, FRAKER PJ. Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis. *Cytometry* 1992; **13**: 137–143.
- [85] TEWARI M, DIXIT VM. Fas- and tumor necrosis factor - induced apoptosis is inhibited by the Poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* 1995; **270**: 3255–3260.
- [86] TILL JE, MCCULLOCH EA. Homeotic stem cell differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1980; **605**: 431–459.
- [87] TRAUTH BCC, KLAS C, PETERS AMJ, MATZKU S, MOLLER P, FALK W, DEBATIN KM, KRAMMER PH. Monoclonal Antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; **245**: 301–304.
- [88] TSUBATA T, WU J, HONJO T. B-cell apoptosis induced by receptor crosslinking is blocked by a T cell signal through CD40. *Nature* 1993; **364**: 645–648.
- [89] TSUJIMOTO Y. Overexpression of the human bcl-2 gene product results in growth enhancement of Epstein-Barr virus immortalized B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1958–1962.
- [90] UEHARA T, MIYAWAKI T, OHTA K, TAMARU Y, YOKOI T, NAGAMURA S, TANIGUCHI N. Apoptotic cell death of primed CD40⁺ T lymphocytes in Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *Blood* 1992; **80**: 452–458.
- [91] VAUX DL, CORY S, ADAMS JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1989; **335**: 440–442.
- [92] VEIS DJ, SORENSON CM, SHUTTER JR, KORSMEYER SJ. Bcl-2 deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys and hypopigmented hair. *Cell* 1993; **75**: 229–240.
- [93] WATANABE-FUKUNAGA R, BRANNAN CI, COPELAND NG, JENKINS NA, NAGATA S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; **356**: 314–317.
- [94] WESTENDORP MO, FRANK R, PCHSENBAUER C, STRICKER K, DHEIN J, WALCZAK H, DEBATIN KM, KRAMMER PH. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV Tat and gp 120. *Nature* 1995; **375**: 497–500.

- [95] WIJSMAN JH, JONKER RR, KEIJZER R, VAN DE VELDE CJH, CORNALINE CJ, VAN DIERENDONCK JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections, In situ end labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993; **41**: 7–12.
- [96] WILLIAMS GT, SMITH CA, SPOONCER E, DEXTER TM, TAYLOR DR. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 1990; **343**: 76–79.
- [96 b] WILLIAMS GT, SMITH C. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls in cell death. *Cell* 1993; **74**: 777–779.
- [97] WILSON KP, BLACK JAF, THOMSON JA, KIM EE, GRIFFITH JP, NAVIA MA, MURCKO MA, CHAMBERS SP, ALDAPE RA, RAYBUCK SA, LIVINGSTONE DJ. Structure and mechanism of interleukin-1-beta-converting enzyme. *Nature* 1994; **370**: 270–276.
- [98] WOLF D, ROTTER V. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 790–794.
- [99] WÓJCIK C. Mechanizmy regulacji cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 331–352.
- [100] WYLLIE AH. Glucokortykoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; **284**: 555–556.
- [101] WYLLIE AH, KERR JFR, CURRIE AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Intern Rev Cytol* 1980; **68**: 251–306.
- [102] YOUNG JDE, LIU CC, PERSECHINI PM, COHN ZA. Perforin-dependent and -independent pathways of cytotoxicity mediated by lymphocytes. *Immunol Rev* 1988; **103**: 161–202.
- [103] YUAN J, SHAHAM S, LEDOUX S, ELLIS HM, HORVITZ HR. The *C.elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to the mammalian interleukin-1- β -converting enzyme. *Cell* 1993; **75**: 641–652.
- [104] ZAULI G, GIBELLINI D, CAPUTO A, BASSINI A, NEGRINI M, MONNE M, MAZZONI M, CAPITANI S. The human immunodeficiency virus type-1 Tat protein upregulates Bcl-2 gene expression in Jurkat T cell line and primary peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 1995; **86**: 3823–3834.
- [105] ZIEGLER A, JONASON AS, EFFELL DJ, SIMON JA, SHARMA HW, KIMMELMAN J, REMINGTON L, JACKS T, BRASH DE. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 1994; **372**: 773–779.

Otrzymano 12.03.1996 r.

Przyjęto: 09.05.1996 r.

Adres autora: Zakład Genetyki Człowieka AM w Lublinie
Lublin 20-950, ul. Radziwiłłowska 11 tel.: (081)234-17

CZYNNIKI REGULACYJNE APOPTOZY

REGULATORY FACTORS OF APOPTOSIS

Joanna KOPEĆ-SZŁĘZAK

Zakład Fizjopatologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Streszczenie: W artykule przedstawiona jest koncepcja tzw. uniwersalnego regulatora apoptozy wg Stellera [39], z uwzględnieniem genu *reaper*, a także mechanizm wywoływania apoptozy Fas-FasL w komórkach układu odpornościowego. Omówiono również fizjologiczne, patologiczne i terapeutyczne czynniki regulujące proces apoptozy.

Słowa kluczowe: apoptoza, regulatory, stymulacja, hamowanie

Summary: The article deals with the mechanism as a model for the convergence of regulation of death signal (gen "reaper"– Steller [39]) and with the effector of apoptosis Fas-FasL in immune system. Physiological, pathological and therapeutic regulatory factors are also discussed.

Key words: apoptosis, regulatory factors, stimulation, inhibition.

WSTĘP

Aktywacja mechanizmu apoptozy jest regulowana przez wiele różnorodnych sygnałów pochodzących zarówno z wnętrza komórki, jak i z otaczającego komórkę środowiska. Z aktualnego piśmiennictwa wynika, że regulacja procesu apoptozy może zachodzić przede wszystkim na poziomie genowym i znane jest wiele prac nad wpływem regulacyjnym ekspresji protoonkogenów i genów przeciwnowotworowych, zwłaszcza rodziny genu *bcl-2* i genu *p53* [32,35,37]. Apoptoza może być też uzależniona od przebiegu cyklu komórkowego [17,50]. Nie do końca rozwiązany problemem jest zagadnienie selektywnego przeznaczania wybranych komórek do realizacji apoptozy.

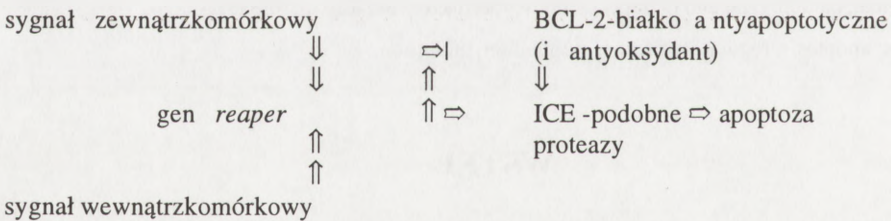
UNIWERSALNY REGULATOR APOPTOZY

Apoptoza może być inicjowana przez liczne i bardzo różnorodne sygnały, jednakże różne drogi sygnalizacyjne aktywują w końcu ten sam program apoptotyczny.

Ekspresja białek antyapoptotycznych, takich jak BCL-2, może zatrzymać apoptozę wywołaną przez różne sygnały indukujące [42]. To wskazuje, że białko to może wchodzić w interakcje z komponentami, które są bądź wyodrębnione z innych dróg sygnalizacyjnych bądź działają wspólnie od momentu (punktu) konwergencji tych dróg.

W badaniach u *Drosophila melanogaster*, gdzie podobnie jak u ssaków początek apoptozy podlega regulacji przez różnorakie sygnały (wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe) wykazano, że różne drogi sygnalizacyjne służące aktywacji apoptozy ulegają konwergencji w genie określonym jako *reaper* (co można przetłumaczyć jako "gen żniwiarz"). Gen ten uważa się [39] za uniwersalny regulator apoptozy u *Drosophila*. Prawdopodobnie gen *reaper* koduje molekułę regulacyjną i w ten sposób działa jako zasadniczy regulator apoptotyczny. Produktem tego genu jest mały polipeptyd o 65 aminokwasach.

Selektywna ekspresja genu *reaper* następuje w komórkach, które są przeznaczone do apoptozy. Został zaproponowany [39] model konwergencji sygnałów apoptotycznych z uwzględnieniem genu *reaper*, w którym ekspresja tego genu jest indukowana przez różne sygnały. Ten gen *reaper* ma pełnić funkcję regulatora apoptozy, ale sam nie uczestniczy w procesie apoptozy: (↑ – aktywacja, ↓ – hamowanie):



W tym modelu *reaper* może wywołać apoptozę bądź przez aktywację genów indukujących apoptozę, których produktem są proteazy, bądź przez hamowanie negatywnych regulatorów apoptozy, np. genu *bcl-2* i białka BCL-2.

ICE-podobne proteazy to np. konwertaza cysteinowa interleukiny 1 β (ICE – *Interleukin 1 β converting enzym*). Rola enzymów ICE-podobnych w wywoływaniu efektu apoptotycznego przez gen *reaper* została ostatnio potwierdzona u *Drosophila* [46].

Trzeba jednakże pamiętać, że model jest wysoce spekulatywny m.in. z powodu braku uwzględnienia interakcji pomiędzy genem *reaper* a innymi genami śmierci

komórki. *Reaper* przedstawiony jest w tym modelu jako czynnik integracyjny, który wiąże różne drogi sygnalizacyjne z podstawowym programem śmierci komórki. Jest także możliwe, że konwergencja różnych dróg sygnalizacyjnych zachodzi na poziomie promotora genu *reaper*, z czego wynika kontrolna rola tego promotora lub czynników działających na promotor.

W modelu programu apoptozy z genem *reaper* przedstawionym na podstawie badań u *Drosophila* można znaleźć poważny mankament w przypadku zastosowania go bezpośrednio do komórek u ssaków. Otóż w zasadzie w komórkach ssaków *in vitro* nie można indukować apoptozy pod nieobecność syntezy białek, choć możliwość indukcji apoptozy jest uzależniona od stanu metabolicznego komórki. Próbuje się [39] jednakże tłumaczyć związek syntezy białek z indukcją apoptozy w następujący sposób. W komórkach ssaków istnieje stały poziom białek anty-apoptotycznych, co ma fundamentalne znaczenie dla przeżycia komórek. Brak syntezy może jednak prowadzić do zmniejszenia poziomu zarówno anty-, jak i proapoptotycznych białek, a tym samym zaburzyć stan równowagi między tymi rodzajami białek w komórce i doprowadzić do apoptozy.

Wynik tej destabilizacji zależy od rodzaju komórki, a także od stopnia stabilności tych przeciwstawnie działających białek. Poza tym niektóre komórki mogą szybciej tracić białka uczestniczące w indukcji apoptozy i dopiero po wznowieniu ich syntezy ulegają apoptozie. Należy też pamiętać o możliwości występowania różnic w mechanizmach czynności komórek *in vivo* (*Drosophila*) i *in vitro* (komórki ssaków). Na podstawie wielu badań procesu apoptozy badacze jednakże uważają, iż jest to zjawisko ewolucyjnie bardzo konserwatywne i stąd informacje uzyskane w doświadczeniach z nicieniami (*Caenorhabditis*) czy owadami (*Drosophila*) są cenne dla poznania apoptozy w komórkach ssaków. Występuje także pewna homologia pomiędzy "domenami śmierci" receptora dla TNF (*Tumor Necrosis Factor* – czynnik martwicy nowotworu) i cząsteczki CD95 a białkiem *reaper*, co może sugerować istnienie wspólnego ewolucyjnego przodka [11].

FIZJOLOGICZNE I PATOLOGICZNE CZYNNIKI REGULACYJNE APOPTOZY

Zastosowane w modelu uniwersalnej regulacji apoptozy pojęcia: sygnały zewnątrz i wewnątrzkomórkowe są często traktowane jako czynniki regulujące apoptozę. Jak wynika z wielu prac, istotnie decyduje, czy komórka wejdzie w apoptozę, jest zależna od tak bardzo różnych stymulatorów o efekcie regulacyjnym [10,21,43,49]. W organizmie można wyróżnić fizjologiczne aktywatory i inhibitory apoptozy. Jako inhibitory apoptozy [42] działają m.in.: czynniki wzrostu, substancja pozakomórkowa, ligand CD40, aminokwasy obojętne, cynk, estrogeny i androgeny.

Natomiast za aktywatory apoptozy uważa się: TNF i molekuly TNF-podobne (TNF – *tumor necrosis factor*), TGF- β (*transformujący czynnik wzrostu*), neurotransmittery (np. dopamina), utratę kontaktu komórki z substancją pozakomórkową, wapń i glukokortykoidy.

W wyniku fizjologicznej regulacji apoptozy są eliminowane komórki w przebiegu procesów morfotycznych i w trakcie dostosowywania się organizmu do zmian w poziomie hormonów, a także takie, które mają defekty genetyczne lub przebieg ich różnicowania był błędny [30].

Regulacja apoptozy jest procesem kompleksowym, podobnie jak regulacja proliferacji i trzeba zawsze brać pod uwagę możliwość nakładania się stymulacji wielu czynników, także o przeciwnych właściwościach.

Kolejną grupę inhibitorów bądź induktorów apoptozy stanowią czynniki patologiczne. W przypadku inhibitorów są to m.in. geny wirusów, np. adenowirus, bakulowirusy, wirus Epsteina-Barr, niektóre wirusy wywołujące opryszczkę. Za czynniki patologiczne wywołujące apoptozę uważa się: szok termiczny, toksyny bakteryjne, wolne rodniki, metabolity, niektóre infekcje wirusowe.

W takich przypadkach przebieg apoptozy można regulować na czterech zasadniczych etapach [18] (rys. 1):

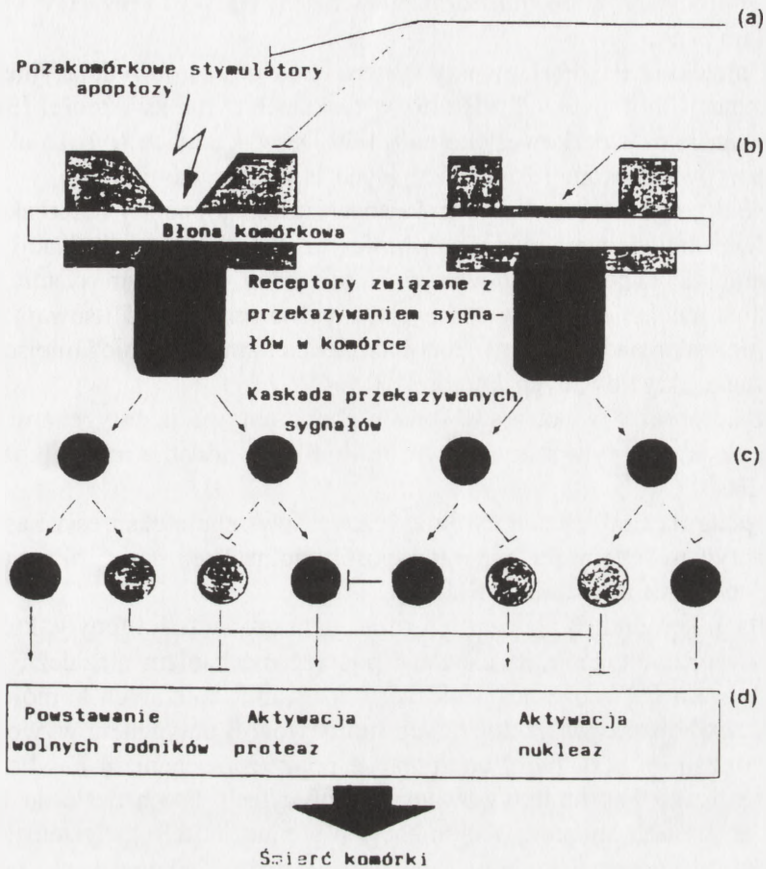
- 1 – poprzez bezpośrednie działanie na induktory apoptozy (np. blokowanie odpowiednich receptorów) na powierzchni komórek,
- 2 – poprzez działanie cytokin czy hormonów,
- 3 – poprzez blokadę przekazywania sygnałów w komórce,
- 4 – poprzez hamowanie procesów katabolicznych w komórce.

Jednakże po przekroczeniu przez komórkę tzw. punktu krytycznego apoptozy, gdy procesy apoptotyczne wkroczyły w fazę reakcji katabolicznych, interwencja w przebieg apoptozy jest niewykonalna [19].

Poznano także czynniki farmakologiczne czy terapeutyczne o charakterze inhibitorów lub induktorów apoptozy. I tak do induktorów apoptozy należą leki chemioterapeutyczne, takie jak: cisplatyna, doksorubicyna, bleomycyna, arabinizyd cytozyny, metotreksat, winkrystyna, a także promieniowanie UV i promieniowanie gamma. Do inhibitorów apoptozy zalicza się m.in.: promotory nowotworów, takie jak: fenobarbital i inhibitory kalpajny (proteazy cysteinowej). Stały rozwój badań nad apoptozą przynosi informacje o coraz to nowych substancjach i czynnikach regulujących proces apoptozy, jakimi okazały się np. ceramidy [29].

REGULACJA APOPTOZY W UKŁADZIE ODPORNOŚCIOWYM POPRZEZ SYSTEM Fas-FasL

Powierzchniowa cząsteczka należąca do rodziny receptorów TNF-podobnych określana jako Fas występuje na wielu ludzkich komórkach, ale specjalną rolę



Rys. 1. Schemat przemian apoptotycznych w komórce uwzględniający możliwość ingerencji w przebieg apoptozy (wg Kroemera [18] uproszczony): a – bezpośrednia "neutralizacja" induktorów apoptozy (np. blokada receptorów), b – działanie substancji typu cytokin czy hormonów, c – działanie substancji blokujących przekazywanie sygnałów (np. kinaz), d – działanie substancji hamujących procesy kataboliczne (np. inhibitorów procesów rodnikotwórczych, a także proteaz czy nukleaz)

odgrywa na limfocytach [45,47,48]. Częsteczką tą składa się z 325 aminokwasów z sekwencją sygnalizacyjną na krańcu aminowym. Stwierdzono, że opisana niemal równocześnie częsteczką APO-1 i Fas są identyczne i w klasyfikacji CD na V Konferencji "Leukocyte Differentiation Antigen" w Bostonie w 1993 roku oznaczone jako CD95 [6].

U człowieka gen Fas jest umieszczony na długim ramieniu 10 chromosomu. Wysoką ekspresję tego genu obserwowano w dojrzałych aktywowanych limfocytach,

a także w limfocytach T po transformacji wirusem HLT-VI oraz HIV i wirusem Epsteina-Barr [7,9].

Ligand molekuly Fas-FasL tworzy system Fas-FasL o roli regulacyjnej w procesach eliminacji limfocytów T i B oraz w reakcjach cytotoksyczności [34]. FasL to białko o masie cząsteczkowej około 40 000 Da wykazujące wysoką aktywność cytotoksyczną wobec komórek wykazujących ekspresję Fas [41].

System Fas jest zaangażowany zarówno w delecji klonalnej autoreaktywnych komórek T w obwodowych narządach limfatycznych, jak i w eliminacji aktywowanych komórek T po ich odpowiedzi na antygeny. Poza tym system ten jest jednym z dwu mechanizmów, w jaki cytotoksyczne limfocyty T usuwają komórki docelowe (np. zakażone wirusem). Podobny mechanizm może mieć miejsce w procesie usuwania aktywowanych komórek T [34].

Dojrzałe komórki T wykazują ekspresję Fas, a aktywacja antygenami podnosi poziom tej ekspresji i tym samym czyni te limfocyty podatne na apoptozę dzięki obecności Fas.

Jednocześnie na limfocytach cytotoksycznych występuje ekspresja FasL (którą wywołują antygeny) i komórki te są w ten sposób zdolne do eliminacji aktywowanych komórek T poprzez mechanizm Fas-FasL [16].

W populacji komórek B podczas ich rozwoju w szpiku te limfocyty, które silnie reagują na własne antygeny, są usuwane poprzez mechanizm niezależny od Fas. Natomiast system Fas może uczestniczyć w usuwaniu dojrzałych komórek B (na obwodzie), bowiem aktywacja dojrzałych limfocytów B antygenem wywołuje ekspresję Fas i czyni je podatnymi na apoptozę poprzez mechanizm Fas-FasL. Jest możliwe, że ligand Fas na aktywowanych limfocytach T wiąże się do komórek B wywołując w nich apoptozę i eliminację z populacji [6,31]. System Fas-FasL może działać w tej samej komórce albo w dwu różnych komórkach, tak jak to przedstawia schemat wg Nagata [25] (rys. 2).

Cytotoksyczność limfocytów T oparta na systemie Fas-FasL obejmuje 2 etapy[41]:

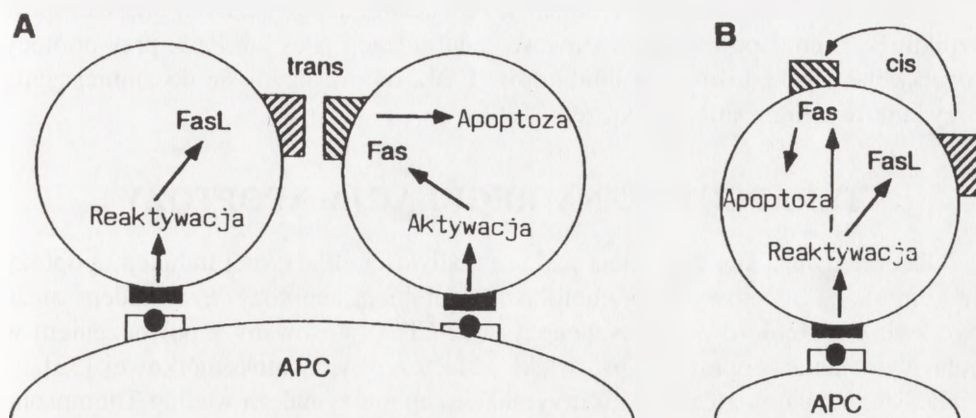
1 – rozpoznanie komórki docelowej i ekspresję FasL na cytotoksycznym limfocycie T,

2 – aktywację poprzez Fas-FasL apoptozy w komórce docelowej.

Komórki T $CD8^+$ zdolne są do reakcji cytotoksycznych zarówno poprzez Fas, jak i z udziałem granzymów i nie wiadomo, jaki czynnik decyduje o zastosowaniu określonego mechanizmu cytotoksyczności w danym przypadku.

Komórki T o fenotypie $CD4^+$ Th1 częściej wykazują ekspresję FasL niż komórki TH2; a zasadniczym mechanizmem wywoływania apoptozy w komórkach docelowych jest mechanizm z udziałem granzymów [25].

Ekspresja antygeny Fas nasila się w niektórych chorobach układu krwiotwórczego, np. w aplazji szpiku stwierdzono wzrost ekspresji Fas na komórkach macierzystych szpiku $CD34^+$ [22].



Rys. 2. Schemat mechanizmu regulacji apoptotycznej limfocytów poprzez system Fas-Fas L (wg Nagata [25] skrócony): A – ekspresja systemu Fas-Fas L na dwu komórkach prowadząca do apoptozy komórki z Fas (tzw. układ trans), B – układ Fas-Fas L w pozycji cis, tzn. na tej samej komórce, wywołujący jej samobójczą śmierć, APC – komórka prezentująca antygen

Regulacja apoptozy przez Fas-FasL [25] może zachodzić bez udziału jądra komórkowego i tym samym nie wymaga indukcji genów. Komórki ulegające apoptozie indukowanej tą drogą prawdopodobnie są wyposażone w program apoptotyczny w cytoplazmie, który to program może być aktywowany przez Fas. Jednakże w piśmiennictwie nie ma jednomyślności na ten temat. Wprawdzie stwierdzono [7], że w komórkach ostrej białaczki linii T istnieje "program antyapoptotyczny" niezależny od bcl-2, z drugiej strony wykazano [28], że wysoki poziom bcl-2 w komórkach przewlekłej białaczki limfatycznej i włochatokomórkowej hamuje apoptozę, wywołowaną poprzez Fas. Istnieje podobna opinia o związku wysokiej ekspresji bcl-2 z apoptozą mediowaną przez Fas [13].

Nieprawidłowe funkcjonowanie systemu Fas-FasL może powodować zaburzenia autoimmunologiczne poprzez niewłaściwą selekcję limfocytów reagujących na własne antygeny, a także ujawniać się w chorobach limfoproliferacyjnych [34].

Krytyczną cząsteczką regulującą wywołanie apoptozy w limfocycie jest w wielu przypadkach receptor powierzchniowy Fas [6]. W schorzeniu o podłożu autoimmunologicznym (Toczeń rumieniowaty układowy) wykazano [4] podwyższony poziom rozpuszczalnej formy receptora Fas w surowicy chorych i obniżenie komórkowego receptora Fas, co wiąże się z patogenezą choroby. Jednakże badania te wymagają dalszych potwierdzeń. Zwiększoną ekspresję receptora Fas na limfocytach T CD4+ stwierdzono w zakażeniach wirusem HIV, co przyspiesza ich eliminację z populacji drogą apoptozy. W ten sposób receptor Fas wzbudził zainteresowanie zespołów badających możliwości terapii AIDS [38].

System Fas może także mieć udział w odrzucaniu allogenicznych przeszczepów szpiku. Być może powstanie możliwość "neutralizacji" Fas lub FasL przy pomocy przeciwciał lub zastosowania inhibitorów FasL, co przyczyni się do zmniejszenia przypadków odrzucania przeszczepu [25].

TERAPEUTYCZNA REGULACJA APOPTOZY

Obecnie uważa się, że istnieją realne możliwości efektywnej indukcji apoptozy w komórkach docelowych, w chorobach z inhibicją apoptozy. Przykładem może być związek 2-chloro-2-deoksyadenozyna (2-CDA) stosowany z powodzeniem w celu wywołania apoptozy w przewlekłej białaczce włochatokomórkowej [33].

Do stanów patologicznych z zatrzymaniem apoptozy należą według Thompsona [42] i Orreniusa [27]:

1. Nowotwory: niektóre chłoniaki,
nowotwory z mutacją p 53,
nowotwory hormono-zależne gonad;
2. Zaburzenia autoimmunologiczne;
3. Niektóre infekcje wirusowe (np. wirusami Herpes czy Adenowirusami).

W chorobach autoimmunologicznych z ekspansją proliferacyjną limfocytów reaktywnych na własne antygeny, stosowano z powodzeniem indukcję selektywnej apoptozy poprzez Fas [3,5].

Obecne doniesienia sugerują, że podatność komórek na apoptozę jest regulowana w sposób skoordynowany; np. ekspresja BCL-2 może podwyższać oporność komórek na działanie bardzo wielu znanych induktorów apoptozy [24]. Dlatego terapia w kierunku ekspresji BCL-2 (czyli hamowania apoptozy) może być stosowana w wielu różnorodnych schorzeniach związanych z nadmierną utratą komórek w drodze apoptozy.

W poszukiwaniach sposobów regulacji apoptozy w przypadkach jej nieprawidłowości ostatnio wiele uwagi poświęca się retinoidom i ceramidom, jako czynnikiem regulującym inicjację apoptozy. Ceramidy to związki powstające w komórkach w wyniku rozkładu sfingomieliny przez sfingomielinazę, np. pod wpływem działania TNF- α . Okazało się, że *in vitro* w komórkach białaczkowych (U937) ceramid C-2 indukuje apoptozę [26]. Podobnie efekt indukcji apoptozy potwierdzono w innych liniach komórkowych [29]. Z badań tych również wynikało, że efekt apoptotyczny wywoływany przez TNF- α i ceramid jest hamowany przez jednoczesne stosowanie 1,2-diacylglicerolu, co zasugerowało, że ceramid może być antagonistą DG w przewodzeniu sygnałów apoptotycznych w komórce.

Na podstawie tych i podobnych badań zaproponowano [29] schemat udziału cyklu sfingomielinowego w przekazywaniu sygnałów w komórce z uwzględnieniem ceramidu, jako przekaźnika II stopnia. Powstały pod wpływem TNF- α w przebiegu

cyklu sfingomieliny ceramid aktywuje kinazę serynowo-treoninową i powoduje hamowanie aktywności fosfolipazy działając w ten sposób na komórkowe elementy systemu przekazywania sygnałów, co prowadzi do wyzwolenia programu apoptozy w komórce.

Ponadto ceramid i DG jako przedstawiciele przekaźników pochodzenia (odpowiednio) sfingolipidowego i glicerolipidowego wykazują interakcje przejawiające się nie tylko w regulacji apoptozy, ale i cyklu komórkowego [14]. Na przykładzie komórek U937 wykazano [3], że fragmentacja DNA w procesie apoptozy wywołanej poprzez TNF- α i ceramid C-2 jest związana z obniżeniem m-RNA dla BCL-2. Ceramidy mogą również stabilizować mRNA dla pewnych białek, np. ceramid C-6 wpływa na wzrost stężenia mRNA dla IL-2 w komórkach T [2].

Badano także wpływ retinoidów na regulację apoptozy. Przykładem takich badań jest praca nad wpływem retinoidu N(-hydroksyfenilo) całkowicie trans retinamidu (HPR) na apoptozę komórek linii białaczkowych. Poziom m-RNA bcl-2 po 24 godzinach działania HPR wyraźnie się zmniejszył, a apoptoza została w tych komórkach zaindukowana [8]. Autorzy tej pracy sprawdzali także jednoczesne działanie HPR, jako induktora apoptozy, i antyoksydantów, takich jak: acetylocysteina, kwas askorbinowy i α -tokoferol, których wpływ okazał się supresyjny na apoptozę indukowaną przez HPR.

Utlenienie grup -SH w komórce wydaje się indukować apoptozę, ale nie dotyczy to oksydacji glutationu. Autorzy tych badań są skłonni przypisać kluczową rolę komórkowemu statusowi oksydo-redukcyjnemu związków tiolowych w regulacji apoptozy. Inni badacze na podstawie badań mysich tymocytów uważają, że spadek poziomu GSH w cytosolu komórki poprzedza proces apoptozy i jest jednym z warunków jej zaistnienia [1].

W terapii schorzeń układu krwiotwórczego często stosuje się interferony, najczęściej IFN- α i IFN- γ . Badania nad działaniem IFN- α w komórkach B-CLL (*in vivo* i *in vitro*) wykazały wzrost ekspresji bcl-2, a tym samym ochronę komórek przed apoptozą. Efekt ten utrzymywał się również przy indukującym apoptozę działaniu promieni gamma i hydrokortyzonu. Natomiast IFN- γ w komórkach białaczkowych linii B na różnych stadiach rozwoju może indukować apoptozę, co wykazano w komórkach chłoniaka RAMOS 1. W komórkach pre-B (KM-3) autorzy nie stwierdzili ani biochemicznych (fragmentacja DNA), ani morfologicznych zmian świadczących o apoptozie tych komórek [15,44].

Nie bez znaczenia w procesach regulacji apoptozy jest poziom jonów wapnia w komórkach. Stwierdzono [20], że lek przeciwnowotworowy harringtonina w odpowiedniej dawce wywołująca apoptozę może być hamowana przez chelatory wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych. Interesujące wydają się też badania szukające wewnętrznych czynników indukujących apoptozę. Komórki nabłonkowe nowotworu przełyku wydzielają czynnik o działaniu [23] immunosupresyjnym, który wywołuje indukcję apoptozy w ok. 20% limfocytów krwi obwodowej. Autorzy

tych badań sądzą, że indukcja apoptozy wiąże się z podwyższeniem poziomu Ca w limfocytach przez czynnik wydzielany z komórek nowotworowych.

Z niektórych prac wynika, że rodzaj stymulatora wwołującego apoptozę związany jest z występowaniem określonych cech w komórce apoptotycznej. W komórkach nerki *in vitro* podczas apoptozy wywołanej przez TPA następowała ekspresja genu glikoproteiny klusteryny, której nie stwierdzono po stymulacji cholesterollem [10].

UWAGI KOŃCOWE

Na koniec wydaje się celowe przytoczenie pracy Henkarta z 1995 roku [12], w której autor podejmuje dyskusję nad zagadnieniem dotąd uważanym za zamknięte.

Destrukcja jądra komórkowego i fragmentacja DNA były określane jako atrybuty apoptozy. Według Henkarta [12] apoptoza może zachodzić z naruszeniem struktury jądra komórkowego, co stanowi integralną część mechanizmu apoptozy, ale w pewnych przypadkach fragmentacja DNA może być jedynie konsekwencją procesów katabolicznych w komórce występujących podczas apoptozy. Autor ten jest jednocześnie zwolennikiem poglądu, że mechanizm apoptozy wywoływanej *via* Fas nie angażuje jądra komórkowego, jako niezbędnego elementu tego mechanizmu.

Problematyka apoptozy znajduje się ciągle w kręgu zainteresowania wielu badaczy. Ostatnio [40] stwierdzono, że istnieją bardzo ściśle powiązania pomiędzy apoptozą a mitozą wyrażone udziałem kinazy p34 cdc2 (która jest uważana za kluczową kinazę rozpoczynania mitozy) – w inicjowaniu apoptozy. Te wyniki nawiązują bezpośrednio do jednej z uwag końcowych, zawartej w artykule Radziszewskiej [30]: "*szlaki komórkowe prowadzące do apoptozy, proliferacji i różnicowania zawierają wiele elementów wspólnych*".

PIŚMIENNICTWO

- [1] BEAVER JP, WARING P. A decrease in intracellular glutathione concentration precedes the onset of apoptosis in murine thymocytes. *Eur J Cell Biol* 1995; **68**: 47–54.
- [2] CHAN G, OCHI A. Sphingomyelin-ceramide turnover in CD 28 costimulatory signaling. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 1999–2004.
- [3] CHEN M, QUITANS J, FUKS Z, THOMPSON C, KUFEL DW, WEICHELBAUM RR. Suppression of Bcl-2 messenger RNA production may mediate apoptosis after ionizing radiation, TNF- α , and ceramide. *Cancer Res* 1995; **55**: 991–994.
- [4] CHENG J, ZHON T, LUI C. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas Molecule. *Science* 1994; **263**: 1759–1762.
- [5] CRITCHFIELD J, RACKE M, ZURIGA I, PFLUCKER Z. T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune Encephalomyelitis. *Science* 1994; **263**: 1139–1142.
- [6] DANIEL PT, KRAMMER P H. Activation induces sensitivity toward APO-1 /CD95/ mediated apoptosis in human B cells. *J Immunol* 1994; **152**: 5624–5631.

- [7] DEBATIN KM, KRAMMER PH. Resistance to APO-1 (CD95) induced apoptosis in T-ALL is determined by a BCL-2 independent anti-apoptotic program. *Leukemia* 1995; **9**: 815–820.
- [8] DELIA D, AIELLO A, FORMELLI F, FONTANELLA E, COSTA A, MIYASHITA T, REED JC, PIEROTTI MA. Regulation of apoptosis induced by the retinoid N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and effect of deregulated bcl-2. *Blood* 1995; **85**: 359–367.
- [9] FALK MH, TRAUTH BC, DEBATIN KM, KLAS C, GREGORY CD, RICKINSON AB. Expression of the APO-1 antigen in Burkitt lymphoma cell lines correlates with a shift towards a lymphoblastoid phenotype. *Blood* 1992; **79**: 3300–3306.
- [10] FLACH R, CATTARUZ M, BRANDT CK. Clusterin gene expression in apoptotic MDCK cells is dependent on the apoptosis-inducing stimulus. *Bioch Bioph Acta* 1995; **1268**: 325–328.
- [11] GOLSTEIN P, MARGUET D, DEPRATERE V. Homology between reaper and the cell death domains of Fas and TNFR1. *Cell* 1995; **81**: 185–186.
- [12] HENKART PA. Apoptosis: O death, where is thy sting? *J Immunol* 1995; **154**: 4905–4908.
- [13] ITOH N, TSUJIMOTO Y, NAGATA S. Effects of bcl-2 an FAS antigen mediated cell death. *J Immunol* 1993; **151**: 621–627.
- [14] JAYADEV S, LIU B, BIELAWSKA AE, LEE JY, NAZAIRE F, PUSHKAREVA MY, OBEID LM, HANNUN YA. Role for ceramide in cell cycle arrest. *J Biol Chem* 1995; **270**: P 2047–2052.
- [15] JEWELL AP, WORMAN CP, LYDYARD PM, YONG KL, GILES FJ, GOLDSTONE AH. Interferon-alpha up-regulates bcl-2 expression and protects B-CLL cells from apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Br J Haematol* 1994; **88**: 268–274.
- [16] KABELITZ D, POHL T, PECHOLD K. Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol Today* 1993; **14**: 338–339.
- [17] KOCKI J, ROŻYŃKOWA DM, RUPNIEWSKA ZM, WOJCIEROWSKI J. Cell cycle linked expression of the protooncogene BCL-2. *Ann Hematol* (suppl.), 1992; A.81.
- [18] KROEMER G, MARTINEZ C. Pharmacological inhibition of programmed lymphocyte death. *Immunol Today* 1994; **15**: 235–242.
- [19] KROEMER G. The pharmacology of T cell apoptosis. *Adv Immunol* 1995; **58**: 211–296.
- [20] LIU YP, UEDA T, YOSHIDA A, IWASAKI H, NAKAMURA T. Effect of harringtonine on apoptotic cell death and cell cycle progression in human leukemia HL60 cells. *Anticancer Res* 1994; **14**: 1509–1515.
- [21] LU XJ, XIE D, REED D, BRADSHAW WS, SIMMONS DL. Nonsteroidal antiinflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; **92**: 7961–7968.
- [22] MACIEJEWSKI JP, SELLERI C, SATO T, ANDERSON S, YOUNGU N. Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34+ cells of patients with aplastic anemia. *Br J Haemat* 1995; **91**: 243–252.
- [23] O'MAHONY AM, O'SULLIVAN GC, O'CONNELL J, COTTER TG, COLLINS JK. Immune suppressive factor derived from oesophageal squamous carcinoma induces apoptosis in normal and transformed cells of lymphoid lineage. *J Immunol* 1993; **151**: 4847–4856.
- [24] MIYASHITA T, REED JC. Bcl-2 oncoprotein blocs chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993; **81**: 151–157.
- [25] NAGATA S, GOLSTEIN P. The Fas death factor. *Science* 1995; **267**: 1449–1455.
- [26] OBEID LM, LINARDIE CM, KAROLAK L. Programmed cell death induced by ceramid. *Science* 1993; **259**: 1769–1771.
- [27] ORRENIUS S. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for human disease. *J Int Med* 1995; **237**: 529–553.
- [28] PANAYIOTIDIS P, GANESGAHURU K, FORONI L, HOFFBRAND AV. Expression and function of the FAS antigen in B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Leukemia* 1995; **9**: 1227–1232.

- [29] PUSHKAREVA M, OBEID L, HANNUM YA. Ceramide, an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. *Immunol Today* 1995; **16**: 294–297.
- [30] RADZISZEWSKA E. Fizjologiczna rola apoptozy. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 247–264.
- [31] RATHMELL J, GOODNOW CC. Effects of the Ipr mutation on elimination and inactivation of self reactive B cell. *J Immunol* 1994; **153**: 2831–2842.
- [32] REED CJ. Bcl-2 prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol/Oncol Clin N A* 1995; **9**: 451–473.
- [33] ROBERTSON E, CHUBB S, MEYŃ RE, STORY M, FORD R, HITTELMAN WN, PLUNKETT W. Induction of apoptotic cell death in CLL by 2-CDA. *Blood* 1993; **81**: 143–150.
- [34] ROBERTSON MJ. Functional consequences of APO-1/FAS antigen expression by normal and neoplastic cells. *Blood* 1993; **82**: 39a.
- [35] ROŻYŃKOWA D. Genetyczne regulacje apoptozy, programowanej śmierci komórek. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 303–318.
- [36] SATO N, IWATA S, NAKAMURA K, HORI T, MORI K, YODOI J. Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. Possible roles of cellular thioles other than glutathione in T cell apoptosis. *J Immunol* 1995; **154**: 3194–3203.
- [37] SIKORA EJ. Apoptoza. *Post Bioch* 1994; **40**: 150–160.
- [38] STALDER T, HAHN S, ERB P. Fas antigen is the major target molecule for CD4+T cell mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1994; **152**: 1127–1133.
- [39] STELLER H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 1995; **267**: 1495–1498.
- [40] SCHROETER M, PEITISCH L, TSCHOPP J. Increased p34^{cdc2} dependent kinase activity during apoptosis. *Eur J Cell Biol* 1996; **69**: 143–150.
- [41] SUDA T, TAKAHASHI T, GOLDSTEIN P, NAGATA S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand a novel member of the TNF-receptor family. *Cell* 1993; **75**: 1169–1178.
- [42] THOMPSON CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; **267**: 1456–1462.
- [43] TOREN A, RECHARI G. Antiapoptotic role of infections agents in lymphoid malignancies. *Br J Hematol* 1994; **87**: 675–677.
- [44] TRUBIANI O, BOSCO D, DI-PRIMIO R. Interferon-gamma (IFN-gamma) induces programmed cell death in differentiated human leukemic B cell lines. *Exp Cell Res* 1994; **215**: 23–27.
- [45] WATANABE-FUKUNAGA R, BRAUNAN CI, ITAKI N. The c-DNA structure, expression and chromosomal assignment of mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992; **148**: 1274–1279.
- [46] WHITE K, TAHAOGUA E, STELLER H. Cell killing by the *Drosophila* gen reaper. *Science* 1996; **271**: 805–807.
- [47] WONG GW, GOEDEL DV. Fas antigen and p55 TNF receptor signal apoptosis through distinct pathways. *J Immunol* 1994; **152**: 1751–1755.
- [48] YOSHINO T, KONDO E, CAO L. Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblast in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes. *Blood* 1994; **83**: 1856–1861.
- [49] ZHAO Y, TOZAWA Y, ISEKI R. Calcineurin activation protects T cells from glucocorticoid induced apoptosis. *J Immunol* 1995; **154**: 6346–6354.
- [50] ZHU L, ANASETTI C. Cell cycle control of apoptosis in human leukemic T cells. *J Immunol* 1995; **154**: 192–200.

Otrzymano: 05.01.1996 r.

Przyjęto: 27.05.1996 r.

Adres autora: Zakład Fizjopatologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii
00-957 Warszawa, ul. Chocimska 5

**NIEKTÓRE ZASTOSOWANIA METOD
KOMPUTEROWEJ ANALIZY OBRAZU
(CYTOMETRII OBRAZOWEJ)
W BIOLOGII KOMÓRKI***

**APPLICATIONS OF COMPUTER-ASSISTED IMAGE ANALYSIS
TO CELL BIOLOGY**

Zbigniew MADEJA, Włodzimierz KOROHODA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: W artykule omówiono wybrane zastosowania komputerowej analizy obrazu w biologii komórki. Dokonano przeglądu zastosowań analizy obrazu w fotometrii i morfometrii oraz w badaniach ruchów komórek. W pracy przedstawiono podstawowe założenia stosowanych metod, ich ograniczenia oraz przykłady wykorzystania.

Słowa kluczowe: analiza obrazu, fotometria, morfometria, ruchy komórek

Summary: This paper reviews applications of computer-assisted image analysis to cell biology. The current status of image analysis in photometry, morphometry and cell movement analysis is summarized. The limitations and advantages of the presented methodology are discussed.

Key words: image analysis, photometry, morphometry, cell movement.

I. WSTĘP

W biologii komórki, podobnie jak w biofizyce, biochemii lub genetyce, istnieje potrzeba prowadzenia badań ilościowych [59]. Przez wiele lat opisy morfologii

*Praca finansowana w ramach grantu KBN 6 P204 057 07.

komórek, wyników reakcji histochemicznych względnie reakcji komórek na rozmaite czynniki zewnętrzne zazwyczaj miały charakter werbalny, jakościowy, względnie ich jedyną dokumentację stanowiły mikrofotografie.

Próby obiektywizacji opisu, co jest warunkiem powtarzalności przedstawianych w pracach wyników, podejmowano od wielu lat. Przykładem może być wprowadzenie przed 20–30 laty metod morfometrycznych Weibla do analizy mikrofotografii z mikroskopów elektronowych w celu obiektywizacji opisu kształtów i wielkości badanych obiektów biologicznych [97, 112]. Już w latach pięćdziesiątych próbowano wykorzystywać metody cytospektrofotometryczne do ilościowych badań składników komórek lub produktów reakcji histochemicznych.

Podstawowe kierunki ilościowych badań obrazów mikroskopowych dotyczą:

- 1) analizy kształtów i wielkości obiektów (komórek, organelli etc.);
- 2) określania ilości składników (DNA, RNA, produktów hybrydyzacji sond molekularnych z kwasami nukleinowymi, wybranych białek, jonów, etc.) i ich lokalizacji w komórkach;
- 3) analizy kinetyki zmian zachodzących w mierzonych parametrach podczas obserwowanych zjawisk;
- 4) migracji komórek i towarzyszących jej zmian kształtu komórek, organizacji cytoszkieletu, rozmieszczenia białek i jonów.

Chociaż zasady opisu i analizy obrazu zapisanego cyfrowo (po tzw. digitalizacji, por. poniżej) opracowano na początku lat osiemdziesiątych [1, 100], to ich powszechne wprowadzenie do badań nie było wówczas możliwe i początkowo wykorzystywano analizę obrazu do określania morfotycznych składników krwi. Dopiero w drugiej połowie lat osiemdziesiątych, a przede wszystkim po roku 1991, rozwój technik umożliwiających wykorzystanie stosunkowo szybkich, mających dużą pamięć komputerów osobistych, kamer CCD (*charge coupled devices*) oraz przetworników obrazu na zapis cyfrowy poddający się matematycznemu opracowaniu umożliwił szerokie wykorzystanie metod ilościowej analizy obrazu w biologii komórki, genetyce, patologii, immunologii, biochemii i biofizyce.

W Polsce pionierami badań z zastosowaniem cytometrii obrazowej byli prof. Aleksandra Krygier-Stojałowska [50, 51] i prof. Jerzy Warchoła [23].

Celem tego artykułu jest przedstawienie podstaw metod cytometrii obrazowej (ang. *image cytometry*) i przykładów jej wykorzystania, między innymi w pracach prowadzonych w Zakładzie Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego, Uniwersytetu Jagiellońskiego.

II. PODSTAWOWE ZAŁOŻENIA STOSOWANYCH METOD

Biologowie, podobnie jak chemicy i fizycy, szeroko wykorzystują metody spektrofotometryczne. Światło, zazwyczaj monochromatyczne, przechodząc przez obiekt, np. roztwór barwnika w kuwecie, jest pochłaniane. Detektor (fotoogniwo,

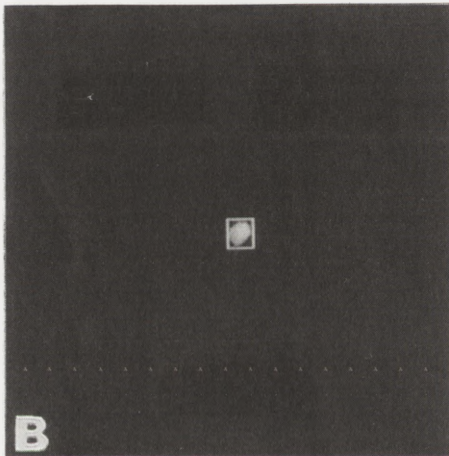
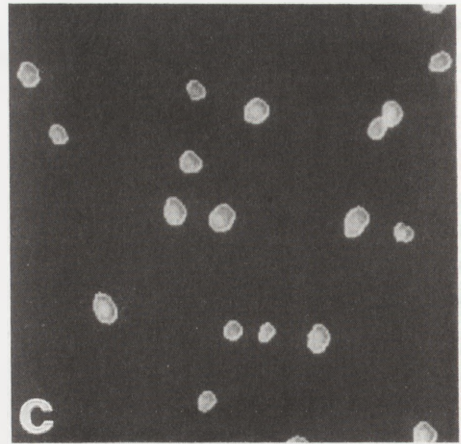
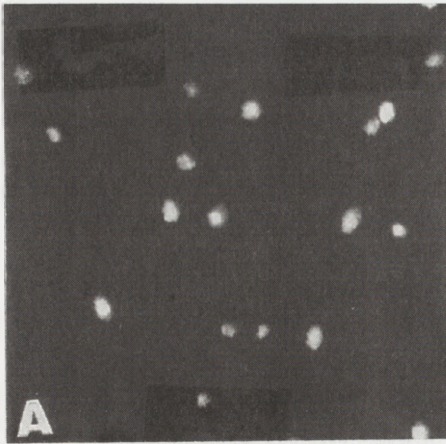
fotopowielacz, fotodiody) mierzy ilość światła przechodzącego i pochłoniętego przez badany obiekt. W ten sposób dokonuje się pomiarów transmitancji, absorbancji i ekstynkcji.

Podobny sposób postępowania jest wykorzystywany w układach pomiarowych dostosowanych do analizy obrazów mikroskopowych. Obserwator, wykorzystując przesłone pola "wybiera" interesujący go fragment obrazu, np. jądro komórkowe lub mitochondrium (fot. 1 A,B). Układ detekcyjny, zwykle wykorzystujący fotopowielacz, umożliwia dokonanie pomiaru światła przechodzącego przez wybrany wycinek obrazu. W starszych "cytofotometrach" wykorzystywano siatki dyfrakcyjne i pryzmaty do uzyskania światła monochromatycznego. W nowszych wykorzystuje się filtry interferencyjne, lustra dichroiczne i monochromatory względnie monochromatyczne światło laserowe. Również detektory uległy zmianie. Najczulsze fotopowielacze wykorzystywane w mikroskopach firmy Leica, pozwalają na pomiary z dokładnością 10^{-7} luksa. W ten sposób, stosując odpowiednio dobrane układy filtrów interferencyjnych i lusterek dichroicznych można mierzyć zarówno absorbancję, jak i fluorescencję wybranych obiektów biologicznych.

Zapis wyników pomiarów w pamięci komputera oraz wykorzystanie sterowanych komputerem ruchów stolika krzyżowego pozwala na stosunkowo szybkie skanowanie obrazu. W mikroskopach konfokalnych, analizujących obraz w podobny sposób, skanowanie obrazu odbywa się dzięki wędrowaniu skolimowanej wiązki światła laserowego. Stosując skanowanie obrazu można bez trudności określać ilość DNA wyznakowanego barwnikiem fluorescencyjnym (np. bisbenzylamidem Hoechst, DAPI, oranżem akrydynowym) w wielu pojedynczych jądrach komórek. Pomiary takie znalazły zastosowanie do badań syntezy DNA i wzrostu komórek. Odnaczają się one dużą dokładnością, okazały się jednak zbyt powolne dla celów diagnostycznych. Stąd w badaniach medycznych w latach 1970–1994 dominowały metody wykorzystujące cytometrię przepływową. Zaletą cytometrii przepływowej jest możliwość wykonania pomiarów na dużej liczbie pojedynczych komórek lub jąder komórkowych w krótkim czasie, np. kilkudziesięciu tysięcy komórek w kilkadziesiąt sekund.

Pomimo gwałtownego rozwoju wszelkiego rodzaju pośrednich, głównie biochemicznych i biofizycznych metod badawczych, analiza obrazu mikroskopowego pozostaje wciąż podstawowym narzędziem pracy używanym w biologii komórki i histopatologii.

Komputerowa analiza obrazu jest dziedziną wiedzy próbującą w tym celu wykorzystać systemy komputerowe. Aczkolwiek w dalszym ciągu niedoskonałe, komputerowe systemy analizy obrazu pozwalają na stosunkowo szybkie i precyzyjne opisanie szeregu parametrów obrazu mikroskopowego. Obecnie metody takie stosuje się na szeroką skalę w badaniach fotometrycznych, morfometrycznych oraz do analizy położenia obiektów ruchomych. Wiele tego typu badań bez udziału komputerowych metod analizy obrazu byłoby niezwykle utrudnione lub wręcz niemożliwe do przeprowadzenia. W badania fotometrycznych omawiane metody



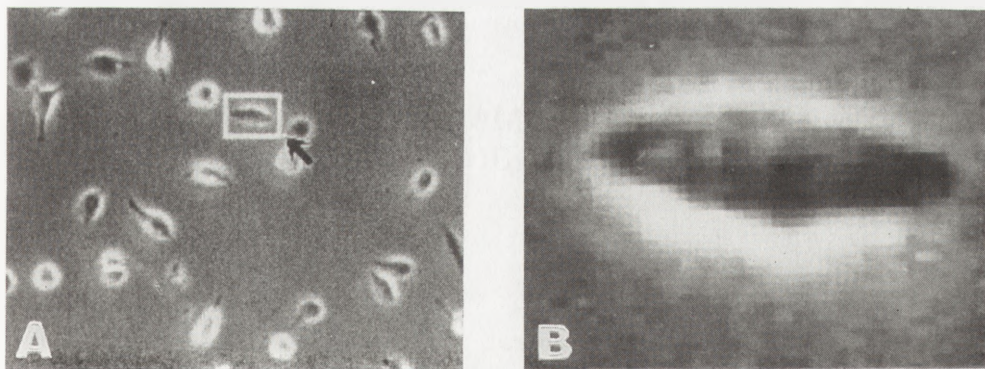
Fot. 1. Jądra komórek BHK wybarwione barwnikiem Hoechst 33258: A – obszar preparatu widoczny pod mikroskopem, B – wybrany za pomocą przesłony pola obszar preparatu, z którego układ detekcyjny dokonuje pomiaru intensywności fluorescencji, C – jednoczesna analiza intensywności świecenia wszystkich jąder znajdujących się w polu widzenia mikroskopu; system komputerowej analizy obrazu wyodrębnia poszczególne jądra komórkowe na podstawie różnicy jasności pomiędzy jądrem komórkowym a tłem

pozwalają na określenie ilości rozmaitych substancji i jonów (DNA, białek, Ca^{++} , H^+) w komórce [27, 35, 42, 85, 110]. Większość tych pomiarów odbywa się przy użyciu barwników fluorescencyjnych wiążących się ilościowo z danym rodzajem substancji, jednak podobną ocenę można przeprowadzić stosując ilościowe barwienia histochemiczne, np. barwienie jąder z zastosowaniem reakcji Feulgena [18, 50, 54, 65]. Z kolei w badaniach morfometrycznych możliwe jest otrzymanie dużej ilości danych dotyczących powierzchni komórki i jądra komórkowego, ich kształtów, utkania (*texture*), położenia w stosunku do innych obiektów itp. [8, 11, 29, 74, 107, 108, 114]. Kolejne zastosowanie metody komputerowej analizy obrazu znalazły w badaniach położenia poruszających się obiektów. Wszystkie te rodzaje zastosowań zostaną omówione w dalszej części tego artykułu.

III. OBRAZ KOMPUTEROWY

Obraz analizowany przez komputer składa się z szeregu punktów zwanych pikselami (fot. 2 A,B). Informacja dotycząca analizowanego obiektu zawarta jest właśnie w ich położeniu (współrzędnych X,Y), intensywności świecenia, względnie barwie. Pod względem formalnym obraz komputerowy jest więc zbiorem punktów, z których każdy ma określone położenie oraz określoną jasność lub kolor. Najprostsze są obrazy czarno-białe, zwane obrazami binarnymi, w których każdy piksel może przyjmować wartość 0 (czarny) lub 1 (biały) (fot. 3). Obrazy takie zajmują stosunkowo mało pamięci komputerowej, jednakże są praktycznie bezużyteczne w analizie fotometrycznej. Ten typ obrazu jest natomiast często wykorzystywany w analizie morfometrycznej rzutów obrazu komórek na płaszczyznę, szczególnie w układach w pełni zautomatyzowanych, gdyż w znakomity sposób ułatwia zdefiniowanie badanego obiektu oraz liczbowy zapis jego wielkości i kształtu.

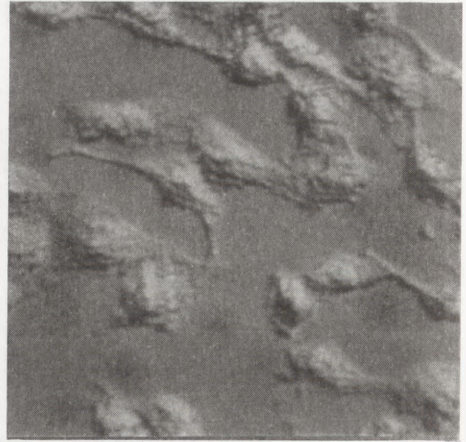
Drugą grupę często używanych obrazów są obrazy wieloodcieniowe (fot. 4). W odróżnieniu od obrazów czarno-białych niosą one również informację o intensywności świecenia danego punktu. Dlatego właśnie ten typ obrazów znajduje zastosowanie w analizach fotometrycznych. Najczęściej stopień jasności pojedynczego punktu określany jest przez 256 poziomów szarości. Takie obrazy zajmują znacznie więcej pamięci komputera niż obrazy binarne. Z tego względu, jak również z uwagi na czas przeprowadzania obliczeń, w stosowanych systemach analizy obrazu używa się zwykle obrazów o możliwie niewielkiej liczbie pikseli (256x256 lub 512x512 punktów). Takie typy obrazów są szeroko wykorzystywane w ilościowej analizie fotometrycznej przy równoczesnym zastosowaniu oświetlenia preparatów światłem monochromatycznym względnie rejestrowaniu emisji monochromatycznego światła fluorescencyjnego.



Fot. 2. Cyfrowy obraz komórek mięsaka szczura: A – pełen obraz o rozdzielczości 560/420 pikseli, B – 10-krotne powiększenie zaznaczonego fragmentu obrazu, z uwidocznieniem jego struktury punktowej



Fot. 3. Cyfrowy obraz keratynocytów rybich poddany procesowi "binaryzacji"



Fot. 4. Obraz wieloodcieniowy – komórki XC obserwowane w kontraście różnicowym Nomarskiego

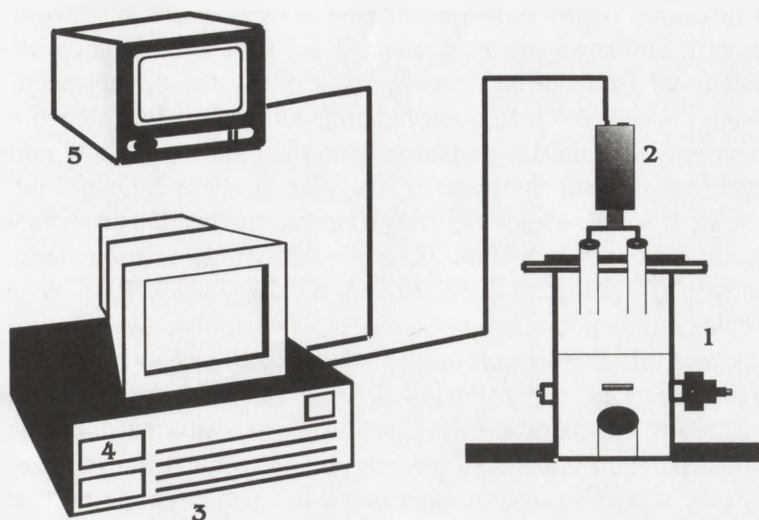
Największe i najbardziej złożone są obrazy kolorowe, których analiza również zaczyna być wykorzystywana w wielu dziedzinach biologii i medycyny [8, 29].

W rzeczywistości, oprócz danych dotyczących położenia i jasności danego piksela, plik zawierający dane obrazu musi mieć również inne informacje dotyczące sposobu zapisu i organizacji danych. Właśnie sposób zapisu tych informacji decyduje o formacie graficznym zapisanego obrazu. O tym, z jakim formatem mamy do czynienia, informuje użytkownika rozszerzenie nazwy zbioru, np. BMP, TIF, TGA, PIC. Istnieje także możliwość konwersji jednego formatu obrazu na inny. Szersze omawianie podstaw komputerowej analizy obrazu wykracza poza ramy niniejszego opracowania. Zwięzły opis podstaw komputerowej analizy obrazu można znaleźć w książce L.Wojnara i M. Majorka "Komputerowa Analiza Obrazu" [115].

IV. APARATURA WYMAGANA DO ANALIZY OBRAZÓW MIKROSKOPOWYCH

Typowe systemy analizy obrazów mikroskopowych obejmują (rys. 1) [17, 101]

- 1/ mikroskop,
- 2/ kamerę CCD,
- 3/ komputer z kartą akwizycji obrazu,
- 4/ oprogramowanie do analizy obrazu,
- 5/ układ monitorów.



Rys. 1. Układ do analizy obrazu mikroskopowego – opis w tekście

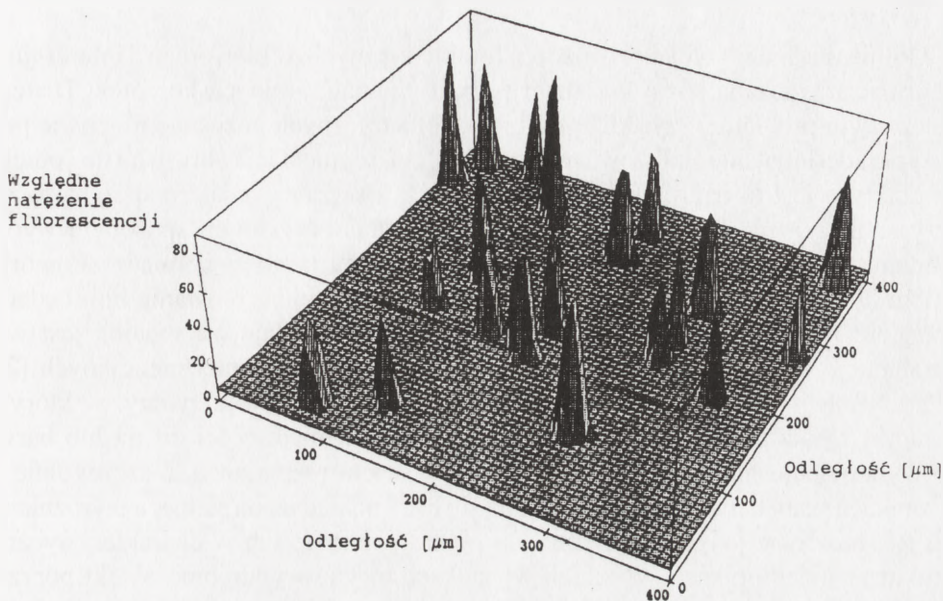
Widziany pod mikroskopem obraz preparatu jest za pośrednictwem kamery przeniesiony do komputera, zamieniony na obraz cyfrowy i zapisany. W używanych do analizy kamerach CCD obraz powstaje poprzez współdziałanie tysięcy niezależnych fotoelementów, co zapewnia jednoczesny pomiar z całego obserwowanego obszaru preparatu (zasada rejestracji obrazu za pomocą "migawki", podobna jak w aparacie fotograficznym – odmienna niż przy rejestracji metodą skaningową i z wykorzystaniem telewizyjnych kamer analogowych). Następnie otrzymane obrazy poddaje się analizie za pomocą odpowiednio dobranego oprogramowania. Często konieczne jest wstępne przetworzenie obrazu w celu umożliwienia zdefiniowania analizowanego obiektu poprzez wskazanie jego krawędzi, co jest warunkiem koniecznym do przeprowadzenia jakiegokolwiek analizy ilościowej. Otrzymanie wydobytego z tła obiektu pozwala następnie na stosunkowo proste wydobycie parametrów fotometrycznych, morfologicznych, względnie dotyczących aktualnego położenia obiektu analizy.

V. FOTOMETRIA

Oznaczenia fotometryczne polegają na ocenie ilości substancji na podstawie intensywności świecenia (tzn. zsumowanej wartości poszczególnych pikseli w ana-

lizowanym obszarze) odpowiedniego wskaźnika. Oczywiście możliwość zastosowania cytometrii obrazowej do oznaczania ilości badanej substancji w komórce jest uzależniona od istnienia barwnika specyficznego dla tej substancji. Jedną z najpowszechniej oznaczanych za pomocą komputerowej analizy obrazu substancji w komórce są jony wapnia. Do pomiarów stężenia jonów wapnia w komórce (za pomocą takich wskaźników fluorescencyjnych, jak np. Fura-2, Quin-2 lub Indo-1), wykorzystuje się stosunek dwóch sygnałów fluorescencyjnych, będących wynikiem zmiany spektrum wzbudzenia (fura-2) bądź emisji (Indo-1) po związaniu przez barwnik jonów Ca^{++} [19, 32, 45, 53, 61, 62, 63, 76, 78, 89, 104]. W cytometrii obrazowej polega to na podzieleniu przez siebie dwóch obrazów cyfrowych otrzymanych przy różnych długościach fali światła wzbudzającego bądź emitowanego przez wskaźnik fluorescencyjny. Ponieważ ten sposób pomiaru jest niezależny od stężenia wskaźnika wewnątrz komórki, metoda ta pozwala na dokładne wykalibrowanie układu pomiarowego oraz uzyskanie pomiaru bezwzględnego stężenia jonów wapnia. Pomiaru stężenia jonów wapnia mogą być wykonywane przy użyciu systemów opartych na fotopowielaczach jako detektorach sygnału jednak coraz powszechniej stosuje się w tym celu systemy komputerowej analizy obrazu [19, 32, 45, 53, 62, 89, 104]. Na podobnej zasadzie można dokonywać pomiarów wewnątrzkomórkowego pH [7, 27, 113] oraz stężenia innych jonów.

Inną dziedziną fotometrii, w której komputerowa analiza obrazu znalazła olbrzymie zastosowanie, są pomiary ilości DNA w jądrze komórkowym (ostatnio również w mitochondriach) (fot. 1C, rys. 2). Szczególnie dużo badań z wykorzystaniem tej techniki wykonuje się na komórkach nowotworowych, próbując wykorzystać ją jako potencjalną metodę diagnostyczną [12, 16, 37, 48, 55, 84, 86, 90, 92, 94, 111, 117]. Obecnie istnieją dwie główne metody oceny ilości DNA w komórce. Jedną z nich, cytometria przepływowa, pozwala na szybką analizę dużej liczby komórek pozostających w zawiesinie [69]. Dodatkowymi cechami tej metody są szybkość i dokładność. Natomiast zastosowanie cytometrii obrazowej pozwala na analizę nienaruszonych wycinków tkanek oraz korelowanie oznaczenia ilości DNA z kształtem i wielkością jąder [20, 36, 44, 49, 66, 72, 82]. Ponadto metoda ta umożliwia korelowanie ilości DNA z cechami morfologicznymi komórek. Oznaczanie niektórych cech morfologicznych komórek (np. wielkość komórki w zawiesinie) z równoczesną oceną ilości DNA jest również możliwe przy użyciu cytometrii przepływowej [41]. W cytometrii obrazowej ilość DNA określa się przy użyciu do barwienia jąder reakcji Feulgena [12, 16, 37, 48, 55, 84, 86, 92, 94, 111, 117]. Coraz częściej używane są charakterystyczne dla cytometrii przepływowej barwniki fluorescencyjne: jodek propydydny i bromek etydydny oraz Hoechst 33258 i DAPI. Dwa pierwsze barwniki nie rozróżniają RNA i DNA. Dlatego konieczne jest trawienie preparatu DNA-azą lub RNA-azą w zależności od potrzeb. Ich zaletą jest stosunkowo słabe wyświecanie barwnika i małe zmiany fluorescencji kompleksu barwnik - kwas nukleinowy w czasie. Dwa następne barwniki, szczególnie Hoechst



Rys 2. Trójwymiarowa prezentacja wyników analizy obrazu przedstawionego na fot. 1C

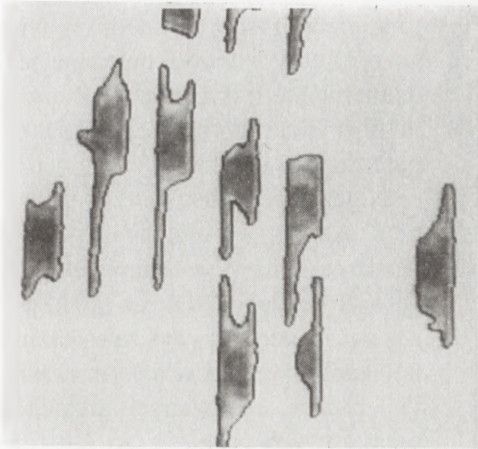
33258 (bisbenzimid) są specyficzne dla DNA, jednak wzbudzone są światłem ultrafioletowym i szybko się wyświecają, a ponadto są droższe [79, 80, 88, 91].

W ostatnich dwu latach ukazało się wiele prac, których autorzy porównują skuteczność analizy aneuploidii komórek metodami cytometrii przepływowej i cytometrii obrazowej w diagnostyce nowotworów. Mimo iż cytometria przepływowa analizuje większą liczbę komórek w krótkim czasie, większość autorów uważa, że metody cytometrii obrazowej są dokładniejsze. Obecnie, dzięki nowym programom można wykonać analizę kształtu komórek i zawartości DNA w ich jądrach z prędkością analizy około 500 komórek w ciągu godziny [3, 5, 26, 75]. Dokładność analizy pozwala nie tylko na diagnostykę komórek nowotworowych, ale także stanów przedrakowych [11, 28, 29, 87].

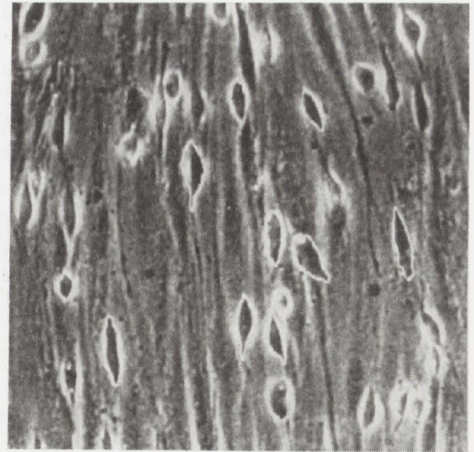
Metody komputerowej analizy obrazu stosuje się również do ilościowej analizy reakcji histochemicznych [4, 71, 96], pomiaru antygenów jądrowych [85] i wirusowych [38], w pomiarach immunohistochemicznych [2] lub toksykologicznych [15]. W ostatnich latach pojawiła się możliwość wykorzystania ilościowej analizy obrazu w badaniach wykorzystujących hybrydyzację *in situ*, szczególnie w jej wersji określanej jako FISH (ang. *fluorescent in situ hybridization*) [77, 98].

VI. MORFOMETRIA

Odmienne niż w wypadku oznaczeń fotometrycznych, w morfometrii interesująca informacja związana jest z kształtem i strukturą analizowanych komórek. Dlatego kluczowym problem wszystkich analiz morfometrycznych pozostaje możliwie precyzyjne zdefiniowanie analizowanego obiektu, tzn. segmentacja obrazu na tło i obiekt. W praktyce jest to najtrudniejszy problem do rozwiązania, z jakim spotykamy się przy analizach morfologicznych. Najpowszechniej stosowanym sposobem wyodrębnienia komórki jest określenie granicznego progu jasności pomiędzy komórką a tłem [2, 57, 70, 99, 114], co pozwala na automatyczne narysowanie linii będącej brzegiem komórki (fot. 5). Inną, trudniejszą, ale dokładniejszą metodą jest wyodrębnianie zarysów komórek w obrazach z mikroskopów interferencyjnych [21, 117]. Niestety temu sposobowi analizy poddają się jedynie preparaty, w których komórki są oddzielone od siebie i różnią się stopniem jasności od tła lub barwą po wybarwieniu histologicznym preparatu. W wielu preparatach, a szczególnie w wycinkach tkanek, liczne obiekty stykają się bądź nakładają na siebie, a wyróżnienie ich jest możliwe jedynie na podstawie różnic w barwie lub w charakterystycznej strukturze układu pikseli. W takich wypadkach można wyodrębnić obiekt poprzez ręczne wykonanie konturu komórki kursorem (fot. 6) lub poprzez stosowanie skomplikowanych, najczęściej projektowanych dla określonego typu obrazu algorytmów, przetwarzających obraz [8, 11, 58]. Otrzymanie wyodrębnionej komórki pozwala następnie na stosunkowo łatwe otrzymanie liczbowych parametrów opisujących morfologię komórki, np. obwodu, powierzchni, maksymalnej i minimalnej średnicy, współczynnika kolistości, dyspersji i wielu innych parametrów kształtu komórki lub jej elementu, np. jądra komórkowego. W ten sposób otrzymane dane znalazły zastosowanie zarówno w medycynie, jak i w naukach podstawowych [2, 34, 43, 57, 58, 70, 83, 99, 106]. W ostatnich latach metody te są już szeroko wykorzystywane w diagnostyce nowotworów. Histopatologowie od lat wyróżniali komórki nowotworowe na podstawie ich cech morfologicznych. Takiej charakterystyki nie można przeprowadzić wykorzystując metody cytometrii przepływowej, natomiast cytometria obrazowa stwarza możliwość obiektywizacji oceny obrazu komórek na podstawie ilościowego opisu ich cech morfologicznych, takich jak rzut powierzchni komórki, jego obwód, kształt, rzut powierzchni jądra i jąderka, obwód rzutu jądra i jąderka, kształt jądra oraz stosunki między tymi wielkościami. Jak dotychczas badania takie były niemożliwe do wykonania na dużej liczbie komórek, co jest warunkiem ich wykorzystania w diagnostyce histopatologicznej. Autorom tego opracowania wydaje się, że ten kierunek rozwoju cytometrii obrazowej, obok badania fotometrycznego ilości składników komórki (poszczególnych białek, DNA, RNA itp.), będzie się intensywnie rozwijał w najbliższych latach.



Fot. 5. Automatycznie wykonturowane makrofagi szczurze hodowane na ultracienkich rowkach – komórki wybarwiono barwnikiem Coomassie Brilliant Blue

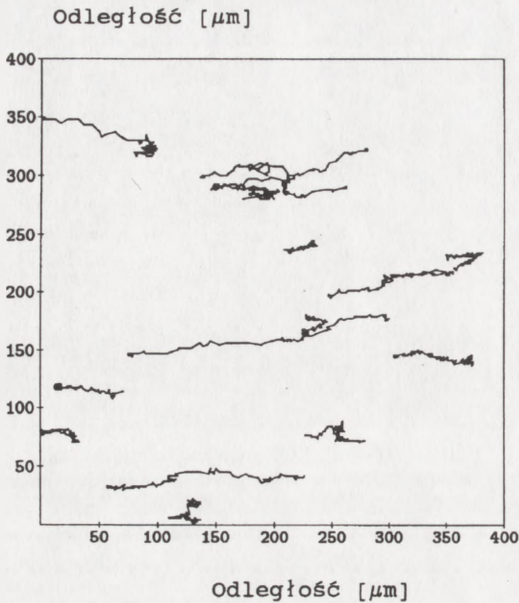


Fot. 6. Ręcznie konturowane komórki mięsaka szczurza hodowane na warstwie fibroblastów – charakterystyczne dla kontrastu fazowego "halo" oraz duża gęstość komórek uniemożliwia automatyczne wyodrębnienie obiektów analizy

VII. KOMPUTEROWE METODY ANALIZY OBRAZU W BADANIACH RUCHÓW KOMÓREK

Aktywność ruchowa komórek zwierzęcych odgrywa znaczącą rolę w procesach morfogenezy, regeneracji, gojenia ran, reakcjach obronnych układu immunologicznego oraz w procesach tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe [6, 9, 10, 30, 31, 39, 40, 46, 60, 68, 81, 93, 94, 102, 105]. Z tego względu badaniami nad mechanizmami migracji komórek zajmuje się wiele pracowni na całym świecie. W badaniach tych używane są rozmaite metody pomiarowe. Krytyczne omówienie tych metod można znaleźć w innych opracowaniach [33, 47]. Tutaj ograniczymy się do krótkiego omówienia kilku przykładów ich wykorzystania.

Zastosowanie systemów komputerowych do badań migracji komórek oparte jest na określaniu zmian położenia komórek w czasie doświadczenia i wyznaczaniu na tej podstawie trajektorii ich ruchów (rys. 3). Odmienne niż w przypadku analiz morfometrycznych i fotometrycznych interesująca informacja leży w zmianie położenia komórki, gdyż na tej podstawie możemy określić takie parametry, jak: prędkość ruchu, przemieszczenie komórki, liniowość i kierunkowość ruchu. Podstawową cechą tego typu analizy jest porównywanie sekwencji obrazów będących kolejnymi elementami "filmowanego" procesu. Z tego względu dodatkowymi elementami systemu do analizy obrazu są w tych układach magnetowid poklatkowy lub program komputerowy zapisujący obrazy w zadanych odstępach czasowych



Rys. 3. Trajektorie komórek XC migrujących po warstwie fibroblastów ludzkich – każda trajektoria została sporządzona na podstawie 97 kolejnych, wyznaczonych w pięciominutowych odstępach, położeni komórek

(ang. *time-lapsing*). Ponadto w większości przypadków konieczne jest uzupełnienie mikroskopu o komorę inkubacyjną utrzymującą stałą temperaturę.

Najczęściej stosowanym sposobem określania położenia komórki jest oznaczenie położenia jej środka geometrycznego, gdyż ten punkt jest zazwyczaj uznawany za wskaźnik położenia komórki w danym czasie. W obecnie stosowanych układach pomiarowych problem ten jest rozwiązywany na dwa sposoby. Systemy w pełni automatyczne określają położenie środka komórki samodzielnie, bez konieczności interwencji obserwatora, poprzez detekcję krawędzi komórki i obliczenie położenia jej środka geometrycznego [13, 56, 103, 109]. Działanie innych systemów opiera się na wyznaczeniu środka poruszającej się komórki

przez obserwatora i najczęściej automatycznym zapisie w pamięci komputera danych o jego położeniu [14, 24, 73, 114, 116]. Należy jednak zdawać sobie sprawę z faktu, że działanie systemów automatycznych jest możliwe jedynie do śledzenia komórek izolowanych, nie tworzących kontaktów z innymi komórkami, co w dużym stopniu ogranicza stosowanie tych metod. Z doświadczenia autorów tego opracowania (dysponujących zarówno automatycznymi, jak i semiautomatycznymi metodami do wyznaczania trajektorii ruchu komórek) wynika, że te drugie mają na obecnym etapie rozwoju systemów do analizy ruchu komórek daleko większe możliwości zastosowania.

Kolejnym problemem, z którym spotykamy się przy badaniach ruchów komórek, jest konieczność jednoczesnego monitorowania możliwie dużej liczby komórek. W przypadku komórek szybko poruszających się takich jak *Amoeba proteus*, *Dicystelium discoideum* lub leukocyty problem ten jest stosunkowo łatwy do rozwiązania poprzez prowadzenie obserwacji przy małych powiększeniach. Jednak nawet dla komórek poruszających się wolniej (większość komórek tkankowych) można dobrać takie parametry, które pozwalają jednocześnie obserwować do 20 komórek, przy wystarczająco dużym powiększeniu [114].



Fot. 7. Wyznaczanie nowej powierzchni zajętej przez poruszającą się *Ameba proteus* poprzez nałożenie na siebie 2 kolejnych obrazów migrującej komórki: obszar najciemniejszy – nowa powierzchnia zajęta przez komórkę; obszar o zabarwieniu pośrednim – powierzchnia zwolniona przez komórkę; obszar najjaśniejszy – powierzchnia zajęta przez komórkę na obu obrazach

Jest to dla szybko poruszających się komórek czas zbyt długi. Należy ponadto zwrócić uwagę, że takie rozwiązanie techniczne zostało niejako wymuszone przez wspomniane wcześniej ograniczenia metod w pełni automatycznej detekcji położenia komórki, tj. konieczności analizowania komórek znajdujących się w dużej odległości od siebie i nie mających możliwości spotkania się ze sobą podczas doświadczenia [52, 64].

Opisane sposoby wyznaczania trajektorii ruchu komórek są najczęściej stosowane do analizy ich aktywności ruchowej. Istnieją jednak również inne sposoby charakterystyki ruchu. W przypadku komórek wolno migrujących niekiedy mierzy się ich aktywność migracyjną poprzez określanie stosunku nowej powierzchni wytworzonej przez pseudopodium w kierunku ruchu do powierzchni całkowitej komórki lub stosunek powierzchni, o jaki zmniejszyła się powierzchnia od strony przeciwnej do kierunku ruchu do jej powierzchni całkowitej (fot. 7) [22, 25, 67]. Próbuje się również zastosować analizę Fourierską do analizy ruchliwości komórek [107,108]. Różnice działania tych systemów analizy w stosunku do omawianych poprzednio występują praktycznie jedynie na poziomie analizy danych.

Ciekawe rozwiązanie tego problemu zaproponował Thurston i wsp. [103]. Używany przez nich system miał ruchomy stolik mikroskopowy, którego położenie kontrolowane było przez komputer. Ponieważ komputer zapamiętywał położenie stolika, przy którym widoczna była analizowana komórka, mógł określać położenie wielu komórek znajdujących się w różnych polach widzenia. System ten pozwalał na jednoczesne śledzenie ponad 100 komórek przy stosunkowo dużym powiększeniu, co umożliwiało ponadto prowadzenie analiz morfometrycznych. Ponieważ jednak oznaczanie położenia komórki wiązało się najpierw z jej odszukaniem, zwiększanie liczby analizowanych komórek ograniczało jednocześnie częstotliwość pomiaru. Przy czasie odszukiwania ok. 3s/komórkę dla analizy 100 komórek minimalny krok czasowy pomiędzy kolejnymi pomiarami wynosi 5 min.

VIII. PODSUMOWANIE

Komputerowe metody analizy obrazu zarówno w pełni zautomatyzowane, jak i wymagające współdziałania obserwatora są niezwykle skutecznym i wszechstronnym systemem badawczym. Intensywne prace prowadzone obecnie w celu przystosowania tych metod do celów diagnostycznych doprowadziły do ich rozpowszechnienia i udoskonalenia. Używając komputerowych metod analizy obrazu należy jednak pamiętać o konieczności starannego wykalibrowania wszystkich elementów systemu oraz uwzględnieniu ograniczeń stosowanej metody.

LITERATURA

- [1] ATTLE JR, SWENSON R. Applications of image analysis. *International Laboratory* 1980; **10**: 35–48
- [2] AZIZ DC, BARATHUR RB. Quantitation and morphometric analysis of tumors by image analysis. *J Cell Biochem* 1994; **19**: 120–125.
- [3] BACUS JW, BACUS JV. Quality control in image cytometry: DNA ploidy. *J Cell Biochem Suppl.* 1994; **19**: 153–164.
- [4] BALLOUK F, BOGUNIEWICZ A, ROSS JS, JENNINGS TA. Image analysis quantification in hormone receptor assay of mucinous carcinoma of the breast. Comparison with biochemical analysis. *Anal Quantitativ Cytol Histol* 1995; **17**: 151–156.
- [5] BARETTON G, BLASENBREU S, VOGT T, LOHRS U, RAU H, SCHMIDT M. DNA ploidy in carcinoma of the gallbladder. Prognostic significance and comparison of flow and image cytometry on archival tumor material. *Path Res Pract* 1994; **190**: 584–592.
- [6] BAYERS HR, ETOH T, DOHERTY JR, SOBER AJ, MIHM Jr. MC. Cell migration and actin organization in cultured human primary, recurrent cutaneous and metastatic melanoma. Time-lapse and image analysis. *Amer J Pathol* 1991; **139**: 423–435.
- [7] BEATTY DM, CHRONWALL BM, HOWARD DE, WIEGMANN TB, MORRIS SJ. Calcium regulation of intracellular pH in pituitary intermediate lobe melanotropes. *Endocrinology* 1993; **133**: 972–984.
- [8] BENGTTSSON E, NORDIN B, PEDERSEN F. MUSE- a new tool for interactive image analysis and segmentation based on multivariate statistics. *Comput Methods Programs Biomed* 1994; **42**: 181–200.
- [9] BEREITER-HAHN J. Epidermal cell migration and wound repair. W: *Biology of the Integument. Vol.2 Vertebrates*, J. Bereiter-Hahn, A.G. Matoltsy, K.S. Richards red., Springer - Verlag Berlin, Heidelberg, 1986; 443–472.
- [10] BEREITER-HAHN J. Cytomechanics and biochemistry. W: *Constructional Morphology and Evolution*. N. Schmidt-Kittler, K. Vogel red., Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, 1991; 81–90.
- [11] BERMAN JJ, MOORE GW. Image analysis software for the detection of preneoplastic and early neoplastic lesions. *Cancer Lett* 1994; **77**: 103–109.
- [12] BERTINO B, KNAPE WA, PYTLINSKA M, STRAUSS K, HAMMOU JC. A comparative study of DNA measured by flow cytometry and image analysis in 1864 specimens. *Anal Cell Pathol* 1994; **6**: 377–394.
- [13] BHARGAVA MM, LI Y, JOSEPH A, JIN L, ROSEN EM, GOLDBERG ID. HGF-SF: effects on motility and morphology of normal and tumor cells.[w] ID Goldberg, EM Rosen [red]

- Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor and C-Met Receptor, Birkhauser Verlag Basel/Switzerland 1993; 341–349.
- [14] BOISFLEURY-CHEVANCE A, RAPP B, GRULER H. Locomotion of white blood cells: a biophysical analysis. *Blood Cells* 1989; **15**: 315–333.
- [15] BURGHARDT RC, BARHOUMI R, DOOLITTLE DJ, PHILLIPS TD, 1994. Application of cellular fluorescence imaging for *in vitro* toxicology testing. Principles in Methods of Toxicology, IIIrd ed., Raven Press, Ltd., 1994; chapter 34:1231–1258.
- [16] BÜRGER RA, WITZSCH U, ENGEL H, POTRATZD, STÖCKLE M. Automated image analysis DNA cytometry in testicular cancer. *Urol Res* 1994; **22**: 17–20.
- [17] CHIKAMORI K, YAMAMOTO A, ARAKI T. A microspectrophotometer for multispectral image analysis, instrumentation and application to multicolor-stained specimen. *Acta Histochem Cytochem* 1991; **24**: 395–403.
- [18] CHIECO P, JONKER A, MELCHIORRI C, VANNI G, VAN NOORDEN CJF. A user's guide for avoiding errors in absorbance image cytometry: a review with original experimental observations. *Histochem J* 1994; **26**: 1–19.
- [19] DAVENPORT RW, KATER SB. Local increases in intracellular calcium elicit local filopodial responses in helisoma neuronal growth cones. *Neuron* 1992; **9**: 405–416.
- [20] DESTEXHE E, BICKER E, COIGNOUL F. Image analysis evaluation of ploidy, S-phase fraction and nuclear area in canine mammary tumours. *J Comp Path* 1995; **113**: 205–216.
- [21] DUNN GA, ZICHA D. Using interference microscopy to study cell behavior. In: Cell Biology: A Laboratory Handbook, Acad. Press. 1994; pp.25–33.
- [22] DUNN GA, BROWN AF. A unified approach to analysing cell motility. *J Cell Sci Suppl* 1987; **8**: 81–102.
- [23] FILIPIAK K, WARCHOŁ JB. Automatyczne metody analizy obrazów i ich zastosowanie w biologii komórkowej. *Postępy Biochemii* 1992; **38**: 132–136.
- [24] FRIEDL P, NOBLE PB, ZANKER KS. Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Comparison of three quantitative methods for analysing cell trajectories. *J Immunol Methods* 1993; **165**: 157–165.
- [25] FUKUI Y, MURRAY J, RIDDELLE K, SOLL D.R. Cell behaviour and actomyosin organization in *Dictyostelium* during substrate exploration. *Cell Str Function* 1991; **16**: 289–301.
- [26] GANDOUR-EDWARDS RF, DONALD PJ, Yu TLC, HOWARD RR, TEPLITZ RL. DNA content of head and neck squamous carcinoma by flow and image cytometry. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; **120**: 294–297.
- [27] GIBBON BC, KROPF DL. Cytosolic pH gradients associated with tip growth. *Science*; 1994; **263**:1419–1421.
- [28] GIOVAGNOLI MR, LUKIC A, MURARO R, FIGLIOLINI M, PACHI A, VECCHIONE A. Image cytometry for DNA analysis in endometrial carcinoma correlated with other prognostic parameters. *Intern J Oncology* 1995; **7**: 809–815.
- [29] GREEN A, MARTIN N, PFITZNER J, O'ROURKE M, KNIGHT N. Computer image analysis in the diagnosis of melanoma. *J AM Acad Dermatol* 1994; **31**: 958–964.
- [30] GRIMSTAD IA. Direct evidence that cancer cell locomotion contributes importantly tumour invasion. *Exp Cell Res* 1987; **173**: 515–523.
- [31] GROTENDORST GR. Alteration of the chemotactic response of NIH/3T3 cells to PDGF by growth factors, transformation, and tumour promoters. *Cell* 1984; **36**: 279–285.
- [32] GUSTAFSON M, MAGNUSSON KE. A novel principle for quantitation of intracellular calcium changes using Fura-2 and a modified image processing system – applications in studies of neutrophil motility and phagocytosis. *Cell Calcium* 1992; **13**: 473–486.
- [33] HADDOX JL, ROSWELL RP. Evaluation of the methodology of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. *J Immunol Methods* 1993; **163**: 273–275.

- [34] HARMS H, GUNZER U, BAUMANN I, SERBOUTI S. Malignancy-associated changes in monocytes and lymphocytes in acute leukemias measured by high-resolution image processing. *Analyt Quant Cytol Histol* 1993; **15**: 371–378.
- [35] HENDEY B, MAXFIELD FR. Regulation of neutrophil motility and adhesion by intracellular calcium transients. *Blood Cells* 1993; **19**: 143–164.
- [36] HEROSKE G, FRIEDRICH K, THESSING F, MEYER W, KUNZE KD. Heterogeneity of the chromatin fine structure in DNA-diploid breast cancer cells. *Anal Cell Pathol* 1995; **8**: 213–226.
- [37] ITAKURA Y, SASANO H, MORI S, NAGURA H. DNA ploidy in human esophageal squamous dysplasias and squamous cell carcinomas as determined by image analysis. *Mod Pathol* 1994; **7**: 867–873.
- [38] JIWA NM, MESKER WE, PLOEM-ZAAIJER JJ, VAN DROP W, THE TH, RAAP AK. Quantification of low frequency white blood cells expressing human cytomegalovirus antigen by image cytometry. *Cytometry* 1994; **16**: 69–73.
- [39] JANIK P, SZANIAWSKA B, MIŁOSZEWSKA J, PIETRUSZEWSKA E, KOWALCZYK D. The role of protein kinase C in migration of rat glioma cells from spheroid cultures. *Cancer Lett* 1992; **63**: 167–170.
- [40] JUTILA MA. Leukocyte traffic to sites of inflammation. *APMIS* 1992; **100**: 191–201.
- [41] KAWIAK J, HOSER G. Ekspresja genów w komórkach określana cytometrią przepływową. *Postępy Biologii Komórki* 1994; **21 Supl3**: 39–38.
- [42] KHAN M, BUI HX, ROSARIO A, ABDULLA M, BALLOUK F, SIM YJ, ROSS JS. Role of DNA content determination by image analysis in confirmation of dysplasia i Barrett's esophagus. *Modern Pathology* 1994; **2**: 169–174.
- [43] KILLICH T, PLATH PJ, WEI X, BULTMANN H, RENSING L, VICKER MG. The locomotion, shape and pseudopodial dynamics of unstimulated *Dictyostelium* cells are not random. *J Cell Sci* 1993; **106**: 1005–1013.
- [44] KIM D, CHARLTON JD, COGGINS JM, MOHLER JL. Semiautomated nuclear shape analysis of prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Anal Quantitat Cytol Histol* 1994; **16**: 400–414.
- [45] KINOSITA K, ITOH H, ISHIWATA S, HIRANO K, NISHIZAKA T, HAYAKAWA T. Dual-view microscopy with a single camera: real-time imaging of molecular orientations and calcium. *J Cell Biol* 1991; **115**: 67–73.
- [46] KONDO H, YONEZAWA Y. Changes in the migratory ability of human lung and skin fibroblasts during *in vitro* aging and *in vitro* cellular senescence. *Mech Age Develop* 1992; **63**: 223–233.
- [47] KOROHODA W. Badania migracji komórek – wrażliwości i trudności interpretacji. *Postępy Biologii Komórki* 1993; **20** sup2: 3–17.
- [48] KOWAL-VERN A, SWINNEN LJ, SHANKEY V, WALLOCH J, POTOCKI D, GROSS FISHER S, MOLNAR Z. Flow and image cytometric DNA analysis of postcardiac transplant lymphomas. *Mod Pathol* 1994; **7**: 332–338.
- [49] KRONQVIST P, COLLAN Y, KUOPIO T, KUJARI H. Nuclear morphometry in breast cancer: The influence of sampling rules and freezing of samples. *Modern Pathology* 1995; **8**: 187–192.
- [50] KRYGIER-STOJAŁOWSKA A, TESSMANN D, SCHUTZ M, URASIŃSKI I. Próba zastosowania metody Feulgena dla oceny czynności jądra komórkowego. *Annales Acad Med Stet* 1972; Supl4: 65–70.
- [51] KRYGIER-STOJAŁOWSKA A. Zasady cytofotometrii. [w] A Krygier-Stojałowska i H Godlewski [red]. Topochemiczne metody badań komórek i tkanek. PWN Warszawa 1982: 111–134.
- [52] KUHNEL-KRATZ C, HADDER DP. Real time three-dimensional tracking of ciliates. *J Photochem Photobiol Biol* 1993; **19**: 193–200.

- [53] LASKEY RE, ADAMS DJ, VAN BREEMEN C. Cytosolic $[Ca^{2+}]$ measurements in endothelium of rabbit cardiac valves using imaging fluorescence microscopy. *Am J Physiol* 1994; **266**: H2130–H2135.
- [54] LAVIA LA. Video microscopy: system calibration for densitometric analysis. *Biotechniques* 1989; **7**: 1018–25.
- [55] LERMA E, LEE SJ, TUGUES D, OLIVA E, GICH I, PRAT J. Ploidy of 36 stromal tumors of the gastrointestinal tract. A comparative study with flow cytometry and image analysis. *Analyt Quant Cytol Histol* 1994; **16**: 435–440.
- [56] LI Y, JOSEPH A, BHARGAVA MM, ROSEN EM, NAKAMURA T, GOLDBERG I. Effect of scatter factor and hepatocyte growth factor on motility and morphology of MDCK cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992; **28A**: 364–368.
- [57] LOCKETT SJ, HERMAN B. Automatic detection of clustered, fluorescent-stained nuclei by digital image-based cytometry. *Cytometry* 1994; **17**: 1–12.
- [58] MACKIN RW, ROYSAM B, HOLMES TJ, TURNER JN. Automated three-dimensional image analysis of thick and overlapped clusters in cytologic preparations. Application to cytologic smears. *Analyt Quant Cytol Histol* 1993; **6**: 405–417.
- [59] MADDOX J. Towards more measurement in biology. *Nature* 1994; **368**: 95.
- [60] MANDELL LA, AFNAM M. Chemotactic inhibitors in sera of patients with neoplastic disease. *Clin Invest Med* 1991; **14**: 131–141.
- [61] MARGAROLI A, MILANID, MELDOLESIJ, POZZAN T. Fura-2 measurement of cytosolic free Ca^{2+} in monolayers and suspensions of various types of animal cells. *J Cell Biol* 1987; **105**: 2145–2155.
- [62] MARKS PW, MAXFIELD FR. Local and global changes in cytosolic free calcium in neutrophils during chemotaxis and phagocytosis. *Cell Calcium* 1990; **11**: 181–190.
- [63] MAZOROW DL, MILLAR DB. Quin-2 and Fura-2 measure calcium differently. *Anal Biochem* 1990; **186**: 28–30.
- [64] MAZZILLI F, ROSSI T, SABATINI L, DONDERO F. Superimposed image analysis system (SIAS)* software: a new approach to sperm motility assessment. *Fertility and Sterility* 1995; **64**: 653–656.
- [65] MELLO MLS, CHAMBERS AF. Image analysis of Feulgen-stained transformed NIH 3T3 cells differing in p21 expression and ras induced metastatic ability. *Analyt Quant Cytol Histol* 1994; **16**: 113–123.
- [66] MEYER JS, PROVINCE MA. S-Phase fraction and nuclear size in term prognosis of patients with breast cancer. *Cancer* 1994; **74**: 2287–2299.
- [67] MITTAL AK, BEREITER-HAHN J. Ionic control of locomotion and shape of epithelial cells: I. Role of calcium influx. *Cell Motility* 1985; **5**: 123–136.
- [68] MOHLER JL. Cellular motility and prostatic carcinoma metastases. *Cancer and Metastasis Reviews* 1993; **12**: 53–67.
- [69] MUIRHEAD KA, HORAN PK. Applications of flow cytometry to tissue culture systems. *Advances in Cell Culture* 1984; **3**: 57–91.
- [70] MUNN LL, GLACKEN MW, McINTYRE BW, ZYGOURAKIS K. Analysis of lymphocyte aggregation using digital image analysis. *J Immunol* 1993; **166**: 11–25.
- [71] NAGATA T. Quantitative analysis of histochemical reactions: image analysis of light and electron microscopic radioautograms. *Acta Histochem Cytochem* 1993; **26**: 281–291.
- [72] OZAKI D, KONDO Y. Comparative morphometric studies of benign and malignant intraductal proliferative lesions of the breast by computerized image analysis. *Hum Pathol* 1995; **26**: 1109–1113.
- [73] PARKHURST MR, SALTZMAN WM. Quantification of human motility in three-dimensional collagen gels. *Biophys J* 1992; **61**: 306–315.

- [74] PAUWELS O, KISS R, ATASSI G. Computer-assisted microscope analysis of morphonuclear modifications induced by anticancer antimetabolites in cell lines cultured *in vitro*. *Anti-Cancer Drugs* 1994; **5**: 160–170.
- [75] PERSONS DL, TAKAI K, GIBNEY DJ, KATZMANN JA, LIEBER MM, JENKINS RB. Comparison of fluorescence *in situ* hybridization with flow cytometry and static image analysis in ploidy analysis of paraffin embedded prostate adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1994; **25**: 678–683.
- [76] PILLAI S, MENON GK, BIKLE DD, ELIAS PM. Localization and quantitation of calcium pools and calcium binding sites in cultured human keratinocytes. *J Cell Phys* 1993; **154**: 101–112.
- [77] PIPER J, RUTOVITZ D, SUDAR D, KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, WALDMAN FM, GRAY JW, PINKEL D. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995; **19**: 10–26.
- [78] POPPER LD, BATRA S. Calcium mobilization and cell proliferation activated by extracellular ATP in human ovarian tumour cells. *Cell Calcium* 1993; **14**: 209–218.
- [79] POULIN N, HARRISON A, PALCIC B. Quantitative precision of an automated image cytometric system for the measurement of DNA content and distribution in cells labelled with fluorescent nucleic acid stains. *Cytometry* 1994; **16**: 227–235.
- [80] POULIN NM, MATTHEWS JB, SKOV KA, PALCIC B. Effects of fixation method on image cytometric measurement of DNA content and distribution in cells stained for fluorescence with propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 1994; **42**: 1149–1156.
- [81] RAZ A. Actin organization, cell motility, and metastasis. *Adv Exp Med Biol* 1988; **233**: 227–233.
- [82] REMMELINK M, SALMON I, PASTEELS JL, ARDICHVILI D, KISS R. Nuclear DNA content, proliferation index and nuclear size determination in normal and tumoral adren tissues, pheochromocytomas and metastases. *Acta Cytol* 1995; **39**: 416–422.
- [83] RICCO R, SERIO G, CANIGLIA DM, CIMMINO A, LETTINI T, LOZUPONE A, DELFINO VP. Size and shape evaluation of astrocytoma nuclei with the shape analytical morphometry software system. *Analyt Quant Cytol Histol* 1994; **16**: 345–350.
- [84] ROSEN AC, GRAF AH, KLEIN M, LAHOUSEN M, VAVRA N, REINER A, HACKER GW. DNA ploidy in primary fallopian-tube carcinoma using image cytometry. *Int J Cancer* 1994; **58**: 362–365.
- [85] ROSTAGNO P, BIRTSWILE I, ETTORE F, COURDI A, GIOANNI J, NAMER M, CALDANI C. Immunohistochemical determination of nuclear antigens by colour image analysis: application for labelling index, estrogen and progesterone receptor status in breast cancer. *Anal Cell Pathol* 1994; **7**: 275–287.
- [86] RUBIN EM, DeROSE PB, COHEN C. Comparative image cytometric DNA ploidy of liver cell dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 1994; **7**: 677–680.
- [87] SALMON I, SWAN Jr F, DARGENT JL, PASTEELS JL, KISS R, KATZ RL. Relationship between DNA ploidy level, nuclear size, and survival in large cell lymphoma. *Amer J Clin Pathol* **103**: 568–573.
- [88] SANTISTEBAN MS, MONTMASSON MP, GIROUD F, RONOT X, BRUGAL G. Fluorescence image cytometry of DNA content versus chromatin pattern: a comparative study of ten fluorochromes. *J Histochem Cytochem* 1992; **40**: 1789–1797.
- [89] SCHLATTERER C, KNOLL G, MALCHOW D. Intracellular calcium during chemotaxis of *Dictyostelium discoideum*: a new fura-2 derivative avoids sequestration of the indicator and allows long-term calcium measurements. *Eur J Cell Biol* 1991; **58**: 172–181.
- [90] SCHMIDT B, WEINBERG DS, HOLLISTER K, BARNHILL RL. Analysis of melanocytic lesions by DNA image cytometry. *Cancer* 1994; **73**: 2971–2977.
- [91] SCHNELL SA, WESSENDORF MW. Bisbenzimidazole: a fluorescent counterstain for tissue autoradiography. *Histochemistry* 1995; **103**: 111–114.

- [92] SEIGNEURIN D, LOUIS J, VILLOUD MC. The value of DNA image cytometry for the cytological diagnosis of well-differentiated breast carcinomas and benign lesions. *Anal Cell Pathol* 1994; **7**: 115–125.
- [93] SINGER SJ, KUPFER A. The directed migration of eucaryotic cells. *Ann Rev Cell Biol* 1986; **2**: 337–365.
- [94] SIITONEN SM, KALLIONIEMI OP, HELIN HJ, ISOLA JJ. Prognostic value of cells with more than 5c DNA content in node-negative breast cancer as determined by image cytometry from tissue sections. *Hum Pathol* 1993; **24**: 1348–1353.
- [95] SMOLLE J, HOFFMANN-WELLENHOF R, KOFLER R, SOYER HP, KERL H. Tumor cell proliferation and motility estimates are prognostic factors in malignant melanoma. *Anal Cell Pathol* 1993; **5**: 113–124.
- [96] STEFANO GB. Computer-assisted microscopic image analysis in neuroimmunology. *Methods in Neuroscience*, Acad. press, Inc., 1995 Vol. **24**: 210–219.
- [97] STOCKEM W, KOROHODA W. Effects of induced pinocytotic activity and extreme temperatures on the morphology of Golgi bodies in *Amoeba proteus*. *Cell Tissue Res* 1975; **157**: 541–552.
- [98] STOKKE T, COLLINS C, KUO WL, KOWBEL D, SHADRAVAN F, TANNER M, KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, PINKEL D, DEAVEN L, GRAY JW. A physical map of chromosome 20 established using fluorescence *in situ* hybridization and digital imager analysis. *Genomics* 1994; **26**: 134–137.
- [99] SUSNIK B, WORTH A, PALCIC B, POULIN N, LeRICHE J. Differences in quantitative nuclear features between ductal carcinoma *in situ* (DCIS) with and without accompanying invasive carcinoma in the surrounding breast. *Anal Cell Pathol* 1995; **8**: 39–52.
- [100] SWENSON RA, ATTLE JR. 1979. Counting, measuring, and classifying with image analysis. *Laboratory Investigation* 1979; **9**: 201–213.
- [101] TANKE HJ, FLORIJN RJ, WIEGANT J, RAAP AK, VROLIJK J. CCD microscopy and image analysis of cells and chromosomes stained by fluorescence *in situ* hybridization. *Histochem J* 1995; **27**: 4–14.
- [102] TATSUKA M, JINNO S, KAKUNAGA T. Quantitative measurement of cell motility associated with transformed phenotype. *Jpn J Cancer Res* 1989; **80**: 408–412.
- [103] THURSTON G, SPADINGER I, PALCIC B. Computer automation in measurement and analysis of cell motility *in vitro*. [w] ID Goldberg [red] *Cell Motility Factors*, Birkhauser Verlag Basel/Switzerland 1991; 206–222.
- [104] TSIEN RY, HAROOTUNIAN AT. Practical design criteria for a dynamic ratio imaging system. *Cell Calcium* 1990; **11**: 93–109.
- [105] TRINKAUS JP. Protrusive activity of the cell surface and the initiation of cell movement during morphogenesis. *Exp Biol Med* 1985; **10**: 130–173.
- [106] TUCKER JH, COWPE JG, OGDEN GR. Nuclear DNA content and morphometric characteristics of normal, premalignant and malignant oral smears. *Anal Cell Pathol* 1994; **6**: 117–128.
- [107] VERSCHUEREN H, HOUBEN B, DE BRAEKELEER J, DE WIT J, ROGGEN D, DE BAETSELIER P. Methods for computer assisted analysis of lymphoid cell shape and motility, including Fourier analysis of cell outlines. *J Immunol Methods* 1993; **163**: 99–113.
- [108] VERSCHUEREN H, DE WIT J, DE BRAEKELEER, SCHIRRMACHER V, DE BAETSELIER P. Motility and invasive potency of murine T-lymphoma cells: effect of microtubule inhibitors. *Cell Biol Inter* 1994; **18**: 11–19.
- [109] VOLLMER KL, ALBERTS JS, CARPER HT, MANDELL GL. Tumor necrosis factor alpha decreases neutrophil chemotaxis to N-formyl-1-methionyl-1-leucyl-1-phenylalanine: analysis of single cell movement. *J Leukoc Biol* 1992; **52**: 630–636.
- [110] VROLIJK J, SLOOS WCR, VERWOERD NP, TANKE HJ. Applicability of a noncooled video-rated CCD camera for detection of fluorescence *in situ* hybridization signals. *Cytometry* 1994; **15**: 2–11.

- [111] WAGNER TMU, ADLER A, SEVELDA P, ASSMANN I, KNEPFLÉ CF, CZERWENKA K, HEINZL H, PLOEM-ZAAIJER JJ. Prognostic significance of cell DNA content in early-stage ovarian cancer (figo stages I and II/A) by means of automatic image cytometry. *Int J Cancer* 1994; **56**: 167–172.
- [112] WEIBEL E.R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 1971; **26**: 235–302.
- [113] WIEGMANN TB, WELLING LW, BEATTY DM, HOWARD DE, VAMOS S, MORRIS SJ. Simultaneous imaging of intracellular $[Ca^{++}]$ and pH in single MDCK and glomerular epithelial cells. *Am J Physiol* 1993; **265**: C1184–C1190.
- [114] WÓJCIAK-STOTHARD B, MADEJA Z, KOROHODA W, CURTIS ASG, WILKINSON C. Activation of macrophage-like cells by multiple grooved substrata. Topographical control of cell behaviour. *Cell Biol Int* 1995; **19**: 485–490.
- [115] WOJNAR L, MAJOREK M. Komputerowa analiza obrazu. Fotobit-Design S.C. Kraków 1994.
- [116] ZAMA N, KATOW H. A method of quantitative analysis of cell migration using a computerized time-lapse videomicroscopy. *Zool Sci* 1988; **5**: 53–60.
- [117] ZANDONA C, BUDEL V, LARSIMONT D, PETEIN M, GASPERIN P, PASTEELS JL, KISS R. Digital cell image analysis of Feulgen-stained nuclei from human papillary, medullary, colloid, lobular and comedocarcinomas of the breast. *Anticancer Res* 1994; **14**: 2173–2182.
- [118] ZICHA D, DUNN GA. An image processing system for cell behaviour studies in subconfluent cultures. *J Microscopy* 1995; **179**: 11–21.

Otrzymano: 28.03. 1996 r.

Przyjęto: 07.06. 1996 r.

Adres autorów: Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego UJ, al. A. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

STRUKTURA I FUNKCJA SYSTEMINY – PEPTYDU O WŁAŚCIWOŚCIACH HORMONU ROŚLINNEGO

STRUCTURE AND PROPERTIES OF SYSTEMIN – THE PEPTIDE WITH PLANT HORMON PROPERTIES

Genowefa ŚLÓSAREK¹, Jan BARCISZEWSKI²

¹Zakład Biofizyki Molekularnej, Instytut Fizyki, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań, ²Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Streszczenie: Systemina jest peptydem zawierającym 18 aminokwasów: AVQSKPPSKRDPPKMQTD. Wyodrębniono ją z liści ziemniaka i pomidora. Powoduje ona indukcję systemów obronnych roślin poprzez aktywację syntezy wielu białek, jak np. inhibitorów proteaz serynowych I i II czy oksydazy polifenolowej. Mechanizm tego procesu nie jest dotychczas znany. Systemina powstaje w wyniku swoistej proteolizy 200-aminokwasowego białka – prosysteminy. W wyniku ataku owadów, patogenów lub zranienia rośliny następuje natychmiastowa, systemiczna synteza prosysteminy, która uodparnia daną roślinę na dalsze uszkodzenia. Na podstawie widm NMR systeminy oraz obliczeń dynamiki molekularnej stwierdziliśmy, że peptyd przyjmuje strukturę typu *Z-like* β -sheet. Podobne struktury znaleziono także w białkach wiążących DNA.

Słowa kluczowe: systemina, prosystemina, sygnały systemiczne, aktywacja syntezy inhibitorów proteaz.

Abstract: The synthesis of proteinase inhibitor proteins in response to wounding is a defensive response against pest and pathogen attacks. Wounding of leaves results in the release of a mobile wound signal which induces proteinase inhibitor synthesis through-out the plant. The signal transduction pathway regulating this response is not fully understood, but several compounds have been identified which are capable of inducing proteinase inhibitor synthesis in tomato and potato leaves. These compounds include cell wall fragments of both plant and pathogen origin, abscisic acid, jasmonic acid and, most recently, an 18-amino-acid polypeptide AVQSKPPSKRDPPKMQTD, called systemin, isolated from tomato leaves. In this chapter, we describe the properties of systemin and its precursor prosystemin, and we summarize the evidence supporting a role of systemin as an initial signal that regulates proteinase inhibitor synthesis in response to wounding. Using two-dimensional NMR spectroscopy it has been concluded that the peptide can adopt a *Z-like*- β -sheet structure, which has previously been found in many specific DNA-binding proteins.

Key words: systemin, prosystemin, systemic signals, proteinase inhibitors synthesis activator.

1. WPROWADZENIE

Istnienie i funkcjonowanie organizmów wyższych zależy od ich zdolności do skoordynowanych zmian rozwojowych w odpowiedzi na wszelkie zmiany środowiskowe zachodzące w ich otoczeniu. Różnorodne impulsy odbierane (rejestrowane) przez komórkę, indukują odpowiednie sygnały (transdukcja sygnału) i powodują powstanie określonych zmian biochemicznych (reakcja na sygnał) w komórce. Proces ten oparty jest na swoistym mechanizmie polegającym na rozpoznaniu sygnału przez receptor i wykorzystaniu wtórnych przekaźników (ang. *second messenger*) oraz białek efektorowych do jego rozprzestrzeniania (przekazywania), a także wywołaniu odpowiedniej reakcji. Jest oczywiste, że proces transdukcji sygnału musi charakteryzować się dużą szybkością, czułością (osiąga się ją przez amplifikację) i specyficznością wszystkich pozytywnych i negatywnych elementów występujących na tym etapie. Działaniu "pozytywnych" elementów zapewniających transmisję sygnału musi towarzyszyć określona aktywność elementów "negatywnych" zapewniających przebieg reakcji na odpowiednim poziomie i we właściwym czasie. Musi ona być także skoordynowana z innymi aktywnościami komórki.

Poznanie mechanizmu transdukcji sygnałów w organizmach wyższych uzależnione są od wiedzy na temat specyficzności różnych bodźców, biochemicznych właściwości receptorów oraz swoistości odpowiedzi komórkowych. Są one jednak bardzo skomplikowane u roślin, ponieważ przebieg wielu reakcji wywoływanych przez różne sygnały jest podobny; np. wpływ światła na morfologię roślin i ekspresję genów jest bardzo zbliżony do efektu wywoływanego przez cytokiny, a także etylen, kwas jasmonowy, kwas salicylowy, systeminę – peptyd o właściwościach hormonu lub sygnały elektryczne [1,6]. Może to wynikać między innymi z faktu, że u roślin brak jest systemu antygen - przeciwciało, a odporność roślin powodowana jest różnymi zmianami chemicznymi, biochemicznymi lub strukturalnymi będącymi odpowiedzią na atak szkodników, bakterii i wirusów, a także uszkodzeniami mechanicznymi (zranieniami).

Jak już wspomnieliśmy, rośliny ze względu na stałą określoną lokalizację są narażone na różne czynniki zewnętrzne powodujące stres, takie jak: wysoka lub niska temperatura, metale ciężkie, utleniacze, toksyny, sole oraz infekcje bakteryjne i wirusowe. W wyniku ich działania następuje zmiana (modyfikacja) ekspresji genów i synteza polipeptydów powodujących, że dana komórka, a także cały organizm, stają się odporne na działanie czynnika wywołującego stres. Zmiany te mogą następować w miejscu ataku (zranienia) powodując superczułą odpowiedź (od ang. *Hypersensitive Response* – HR) np. poprzez syntezę fitoaleksyn lub pojawiać się równocześnie w odległych od miejsca ataku częściach rośliny. Jest to reakcja systemiczna (od ang. *Systemic Acquired Resistance* – SAR) [6]. Roślina reagując na okaleczenie (zranienie), szok termiczny, chemiczny lub atak owadów uwalnia

sygnały (małe związki chemiczne), które w wielu przypadkach prowadzą do syntezy oraz akumulacji inhibitorów proteaz serynowych. Mimo że do końca nie jest jasne, czy inhibitory te są odpowiedzialne za ochronę (całej) rośliny (systemiczna, systemowa), istotny jest fakt ich znaczącego ilościowego wzrostu (syntezy) inhibitora proteaz bezpośrednio po uwolnieniu sygnału [18]. Szybka akumulacja inhibitorów proteaz zachodzi nie tylko w uszkodzonych liściach, ale również w innych częściach rośliny. Wskazuje to, że sygnał z miejsca inokulacji przemieszcza się po całej roślinie, co może oznaczać, że mechanizmy obronne (odporność) u roślin opierają się w dużej mierze na cząsteczkach sygnałnych przenoszących informacje o zaatakowaniu tkanki roślinnej [6].

Hipoteza o udziale niewielkich cząsteczek sygnałnych w odpowiedzi systemicznej została sformułowana na początku wieku, ale pierwsze potwierdzające ją wyniki uzyskano dopiero w latach pięćdziesiątych. Zaproponowano model reakcji systemicznej [18], w którym substancje o małej masie cząsteczkowej (M_r), powstające podczas ataku szkodników lub w wyniku uszkodzenia mechanicznego, przemieszczają się w całej roślinie w wyniku swoistych oddziaływań z receptorami znajdującymi się na błonach komórkowych. Sygnał przekazywany jest do jądra komórkowego, gdzie następuje synteza odpowiednich mRNA, a następnie ich translacja w cytoplazmie do białek stanu patogenezy (od ang. *Pathogenesis Related Proteins* – PRP). Są one transportowane do wakuoli lub przyłączane do receptorów komórkowych. Cząsteczkami mającymi charakter sygnałów obronnych u roślin, oprócz wymienionych wcześniej, są między innymi: lipopolisacharydy pochodzące z bakterii atakujących roślinę oraz pektyny (oligosacharydy i oligomery kwasu α -1,4-galakturonowego) wytwarzane przez roślinę, które indukują syntezę inhibitorów proteaz (od ang. *Proteinase Inhibitor Inducing Factor* – PIIF) [18].

Stosunkowo dużo wiadomo na temat małych cząsteczek sygnałnych, aktywujących ekspresję genów inhibitorów proteaz serynowych I ($M_r=8100$) i II ($M_r=12300$) [6]. Do cząsteczek tych należą między innymi: kwas salicylowy, kwas jasmonowy i jego ester metylowy, etylen oraz systemina – jedyny dotychczas poznany peptyd o właściwościach hormonu [12].

Kwas salicylowy powstaje w roślinie z kwasu cynamonowego. Powoduje on odporność na wirusy, bakterie i pasożyty grzybowe. Wydaje się, że akumulacja kwasu salicylowego w zainfekowanych liściach związana jest z indukcją oporności. W liściach tytoniu zaatakowanych wirusem mozaiki tytoniu (TMV) ilość kwasu salicylowego wzrasta 20-krotnie. Podobną akumulację stwierdzono po traktowaniu liści tytoniu egzogennym kwasem salicylowym. Wykryto również, że w tkankach transgenicznego tytoniu transformowanego genem hydrolazy salicylanowej z *Pseudomonas putida* nie obserwuje się akumulacji kwasu salicylowego. Oznacza to, że związek ten nie przemieszcza się w roślinie, ale jest niezbędnym elementem systemu indukcji odporności. Ponadto stwierdzono, że po infekcji liści tytoniu wirusem TMV następuje 10-krotny wzrost wydzielania etylenu. Jego synteza jest

największa w okresie 10 godzin przed ukazaniem się lokalnego uszkodzenia widocznego na liściach. Etylen jest ważnym regulatorem wzrostu powodującym kiełkowanie, opadanie liści, dojrzewanie, a także reakcje roślin na zmienne warunki otoczenia, takie jak zranienie, niska temperatura, patogeny. W ostatnim okresie dzięki badaniom genetycznym, poznano elementy łańcucha transdukcji sygnałów indukowanych etylenem poprzez kilka produktów genów zaangażowanych w ten proces. Przypuszcza się, że białko ETR 1 (błonowy receptor etylenu) kontroluje poziom etylenu poprzez fosforylację kaskady obejmującej dwa inne białka CTR 1 i EIN 3 [2,3,21].

Kwas jasmonowy i jego ester metylowy są również ważnymi efektorami wzrostu i rozwoju roślin. Początkowo związki te wykryto w oleju *Jasminum grandiflorum*, a następnie w komórkach wielu grzybów, glonów i roślin wyższych. Są one również składnikami niektórych feromonów. Kwas jasmonowy syntetyzowany jest z kwasu linolenowego w wyniku wielu nie do końca poznanych reakcji. Wykazano, że ester metylowy jest uwalniany w roślinie na skutek uszkodzenia, ataku patogenów, braku wody lub w odpowiedzi na inne stresy. Przypuszcza się, że jasmonian przemieszcza się w całej roślinie, a także ze względu na dużą lotność uwalniany jest do atmosfery. Związek ten wpływa na ekspresję genów kodujących swoisty typ białek (od ang. *Jasmonate Induced Proteins* — JIP), selektywną represję syntezy niektórych peptydów oraz czasowe opóźnienie biosyntezy innych białek. Jego działanie wpływa na regulację aktywacji i transkrypcji genów dojrzewania potranskrypcyjnego odpowiednich mRNA, modyfikacji wewnątrzkomórkowego transportu i degradacji białek. W odpowiedzi na atak owadów lub inny stres prowadzący do uwalniania wtórnych przekaźników, pochodne kwasu jasmonowego "uruchamiają" program ekspresji genów związanych z obroną roślin, a także w wyniku działania białka deaktywującego rybosomy JIP 60 (ang. *ribosome-inactivating protein*) wpływają na obniżenie poziomu biosyntezy białka [16].

2. WŁASNOŚCI SYSTEMINY

Systeminę wyodrębniono z liści pomidora *Lycopersicon esculentum* (v. Castlemart), (1µg peptydu z 2 kg liści). Indukuje ona ekspresję inhibitorów proteaz serynowych identycznych z powstającymi podczas ataku owadów lub uszkodzenia roślin. Przypuszcza się, że zwiększona ilość inhibitorów nagromadzona w liściach obniża aktywność trawiennych proteaz w owadach, prowadząc ostatecznie do ich śmierci [7,12]. Systemina posiada aktywność o około 5 rzędów wielkości większą niż oligogalakturenonowe induktory inhibitorów proteaz. Jeden pmol systeminy wprowadzony do liści pomidora powoduje syntezę około 140 µg inhibitora I i około 60 µg inhibitora II na gram tkanki roślinnej. Wykazano, że syntetyczny peptyd

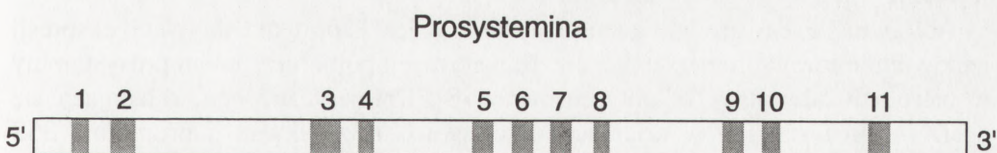
znakowany ^{14}C podany na świeżo zraniony liść, rozprzestrzeniła się na całą powierzchnię liścia w ciągu 30 min. Po 2 godzinach radioaktywność rejestrowana była w wydzielinie łyka [12,13], co oznacza, że systemina jest zdolna do systemicznej migracji w roślinie.

Wkrótce po wykryciu systeminy znaleziono gen jej prekursora – prosysteminy [8,9]. Zbudowany jest on z 4526 par zasad, w którym 76% stanowią pary AT. Fragmenty niekodujące, zawierające 104 i 246 par zasad znajdują się odpowiednio przy końcach 5' i 3' genu. Region kodujący genu prosysteminy zawiera 10 intronów o różnej długości oraz 11 egzonów, których wielkość waha się w granicach 34–90 par zasad. Egzony tworzą pary: 1-2, 3-4, 5-6, 7-8 i 9-10. Sekwencja genu wykazuje dużą homologię między egzonami parzystymi: 2,4,6,8,10 i między egzonami nieparzystymi: 1,3,5,7,9. Nie zauważono natomiast homologii między sekwencjami egzonów tworzących parę, np. 1 i 2. Egzon 11 nie jest homologiczny do żadnego z pozostałych dziesięciu egzonów i koduje systeminę (rys. 1).

W prosysteminie występują trzy sekwencje: RepA, RepB i RepC, które są powtórzone we fragmentach Rep2A, Rep2B i Rep2C. Ustalono, że fragmenty RepA, RepB i RepC są kodowane przez egzony 3, 4, 5 i 6, natomiast ich powtórzenia – przez egzony 7, 8, 9 i 10 (rys. 2). Nie stwierdzono homologii prosysteminy do żadnego z dotychczas opisanych lub zarejestrowanych w bankach białek.

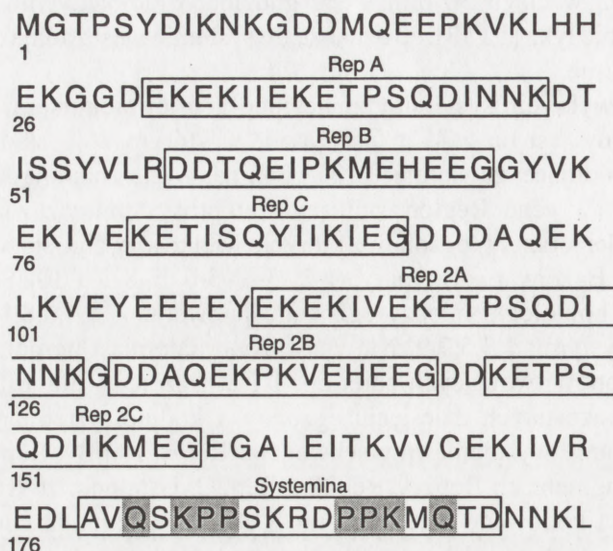
Brak homologii między parami egzonów może sugerować, że pierwotną formą genu prosysteminy była para egzonów. Występowanie powtarzających się polipeptydów kodowanych przez pary egzonów wskazuje, że ewolucja genu mogła przebiegać poprzez duplikację i elongację. Występowanie egzonu 11 (bez pary) można tłumaczyć wcześniejszą, niezależną ewolucją, po której nastąpiło jego przyłączenie do genu prosysteminy lub też stopniowym zanikiem egzonu mogącego tworzyć parę z egzonem 11.

Za pomocą analizy typu Northern wykazano, że ilość mRNA prosysteminy jest największa po 3–4 godzinach po inwazji lub zranieniu, podczas gdy mRNA inhibitora I – po 8–10 godzinach [8]. W zdrowych liściach nie stwierdzono obecności mRNA inhibitorów proteaz, natomiast zawsze występowały w nich niewielkie ilości mRNA prosysteminy. Obecność mRNA prosysteminy w liściach (przed i po uszkodzeniu)



Rys. 1. Schemat organizacji genu prosysteminy – eksony zaznaczone są w ramach i oznaczone numerami

Prosystemina



Rys. 2. Struktura pierwszorzędowa prosysteminy [9] – sekwencje powtarzające się oraz systeminy zaznaczone są w ramce; aminokwasy tworzące strukturę palindromiczną zaznaczone są w ramce

świadczy o potencjalnej zdolności rośliny do dowolnej reakcji na różnego typu ataki zewnętrzne. Po transformacji pomidora genem zawierającym cDNA prosysteminy wraz z promotorem 35S wirusa mozaiki kalafiora, w liściach roślin transgenicznym stwierdzono konstytutywną syntezę inhibitorów proteaz I i II, których poziom osiąga 1mg/g suchych liści. Fenotyp rośliny transformowanej jest różny od rośliny nie transformowanej, która syntezuje inhibitory proteaz w liściach jako odpowiedź na uszkodzenie zewnętrzne lub induktory chemiczne; rośliny transgeniczne charakteryzują się karłowatością. Przeszczepienie górnej części rośliny nie transformowanej do dolnej części transgenicznego pomidora powoduje konstytutywną ekspresję inhibitorów w liściach obu przeszczepionych częściach rośliny. Wynika z tego wniosek, że ekspresja transgeny generuje sygnał, a jego propagacja w roślinie nie wymaga jej uszkodzeń [11].

Aby określić, czy produkt genu prosysteminy jest istotny dla aktywacji ekspresji genów inhibitorów proteaz, dokonano transformacji pomidora genem prosysteminy w orientacji odwrotnej, tj. antysensownej [8]. Chimeryczny gen, składający się z cDNA prosysteminy w orientacji odwrotnej oraz z sekwencji promotora 35S wirusa mozaiki kalafiora, wklonowano do wektora pUA64. Ekspresja genu cDNA prosysteminy powodowała supresję indukcji syntezy inhibitora proteaz. Wskazuje to, że systemina jest integralnym składnikiem systemu transdukcji sygnału, który reguluje syntezę inhibitorów w odpowiedzi na atak z zewnątrz.

3. STRUKTURA SYSTEMINY

Systemina stanowi krótki fragment prosysteminy zbudowany z 18 aminokwasów, w większości o charakterze hydrofilowym. Zarówno w prosysteminie, jak i w systeminie największy procent stanowią bowiem aminokwasy obdarzone ładunkiem (rys. 3).

Systemina ma rzadko spotykaną w białkach strukturę palindromiczną, Tworzą ją dwie pary prolin: 6-7 i 12-13 oraz dwie reszty glutaminy: 3 i 16, występujące przy obu końcach łańcucha peptydowego. Symetrię dopełniają aminokwasy zasadowe – lizyny 5, 9 i 14 oraz arginina 10 (rys. 2).

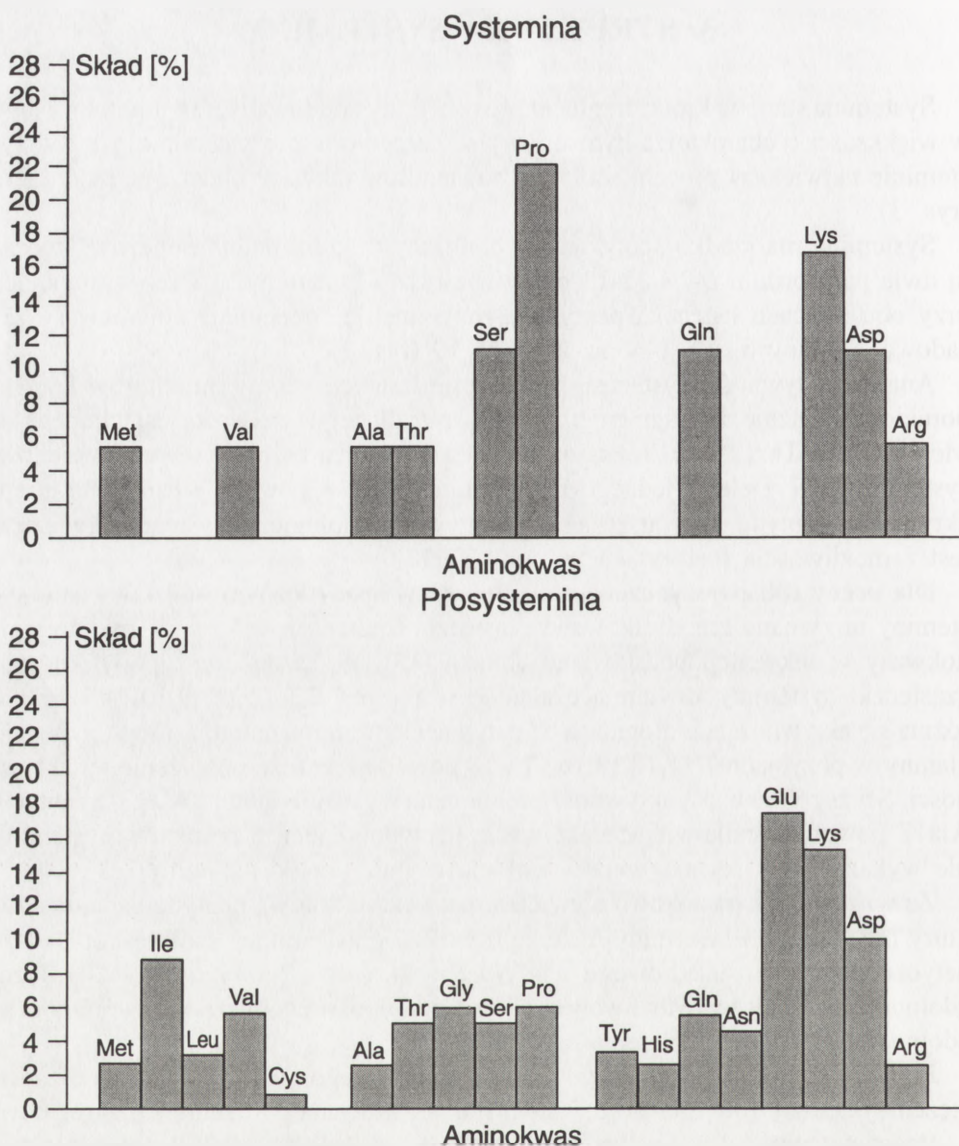
Analiza aktywności systeminy w procesie indukcji genów inhibitorów I i II u pomidora wskazuje, że fragmentem niezbędnym dla tej właściwości jest tetrapeptyd: Met15-Gln16-Thr17-Asp18, znajdujący się przy końcu karboksylowym cząsteczki systeminy [13]. Delecja jednego z tych aminokwasów powoduje całkowitą utratę aktywności peptydu. Przypuszcza się, że aktywność biologiczna systeminy związana jest z możliwością fosforylacji treoniny Thr17.

Dla oceny roli pojedynczego aminokwasu w specyficznym oddziaływaniu systeminy otrzymano zmodyfikowane cząsteczki (mutanty), w których kolejne aminokwasy w sekwencji podstawiano alaniną [13]. Wykazano, że zmodyfikowane cząsteczki systeminy zawierające alaninę w pozycji 2,3,4,5,6,8,9,10,14 i 15 nie różnią się aktywnością biologiczną od natywnej systeminy, natomiast występowanie alaniny w pozycjach 7,11,12,13,16,17 i 18 powoduje znaczne obniżenie jej aktywności. Szczególnie niską aktywność biologiczną wykazuje mutant Ala13, a mutacja Ala17 powoduje całkowitą dezaktywację peptydu. Żaden z mutantów systeminy nie wykazał większej aktywności biologicznej niż peptyd naturalny [13].

Ze względu na stosunkowo niewielką masę cząsteczkową peptydu badania struktury przestrzennej systeminy można prowadzić przy pomocy spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance* – NMR) dużej zdolności rozdzielczej. Możliwa jest analiza stabilności chemicznej systeminy oraz zdolność peptydu do tworzenia agregatów [22].

Pomiary widm magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H 1D NMR) dla różnych stężeń systeminy (od 1,45 do 5,7 mM) nie wskazały na tworzenie się agregatów.

Podstawowym celem analizy widm NMR jest jednak określenie struktury przestrzennej badanej cząsteczki w środowisku wodnym. Dla uzyskania pełnych informacji konieczne jest stosowanie kilku standardowych technik dwuwymiarowej spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego [17]. W przypadku systeminy okazało się, że do analizy poszczególnych linii rezonansowych protonów systeminy konieczne jest obniżenie pH. Oznaczenie protonów niewymienialnych prowadzono w 6 mM roztworze systeminy w 99,9% D_2O , 10 mM fosforanie potasu, pH 6,8, temp. 300 K, natomiast oznaczenie protonów amidowych wykonano w roztworze



Rys. 3. Skład aminokwasowy cząsteczki systeminy i prosysteminy (w procentach)

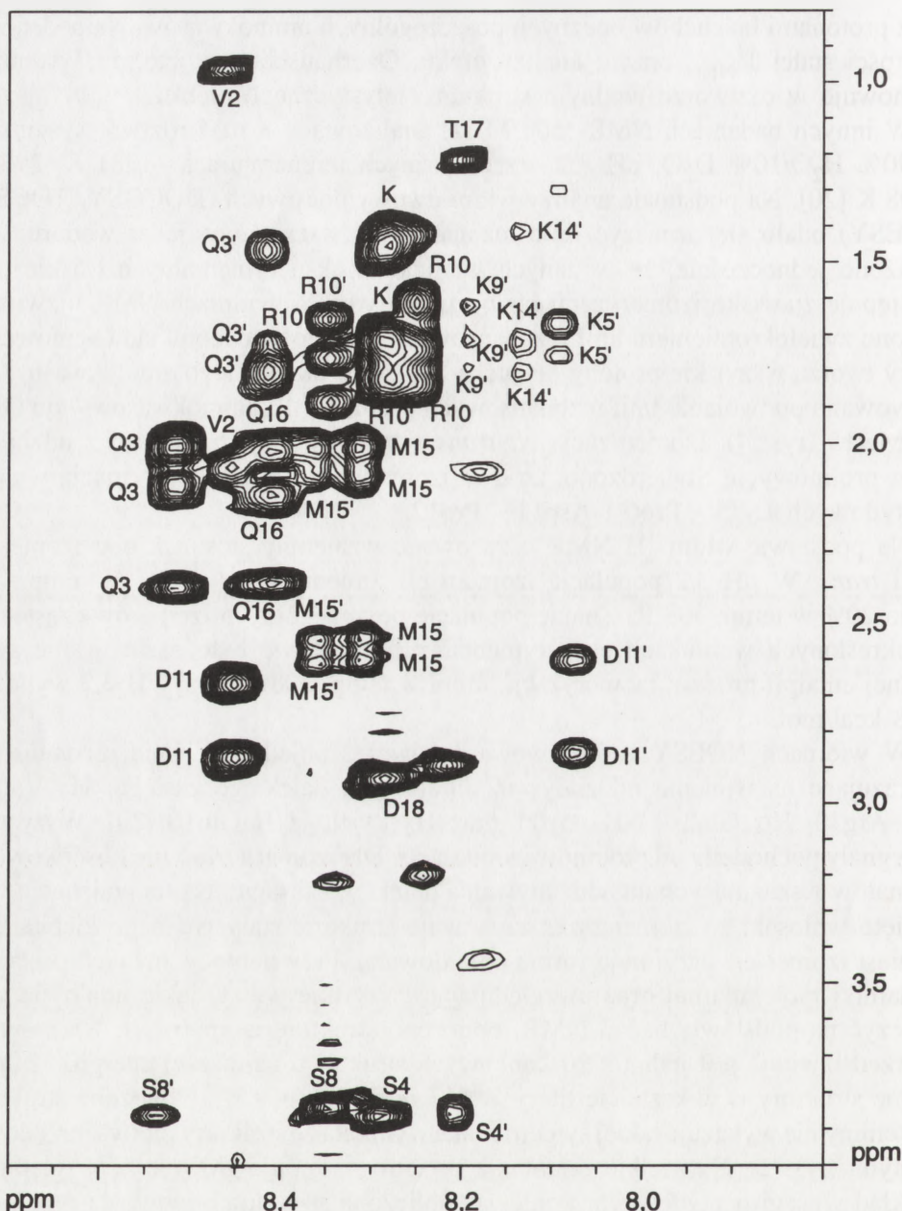
90% H₂O/10% D₂O, 10 mM fosforanie potasu, pH 4,8, temp. 284 K. Na podstawie widm COSY wyznaczono stałe sprzężenia spin-spin $J^3_{\text{NH}\alpha}$ dla poszczególnych protonów H α łańcucha głównego. Wartości $J^3_{\text{NH}\alpha}$ wahały się jednak w granicach 7 Hz. Jednocześnie analiza widm NOESY oraz widm ROESY nie wskazywała na istnienie oddziaływań dalekiego zasięgu między protonami łańcucha głównego

oraz protonami łańcuchów bocznych poszczególnych aminokwasów. Na podstawie wartości stałej $J^3_{\text{NH}\alpha}$ oraz z analizy efektu Overhausera przyjęto, że systemina zachowuje w roztworze wodnym strukturę statystycznego kłęбка.

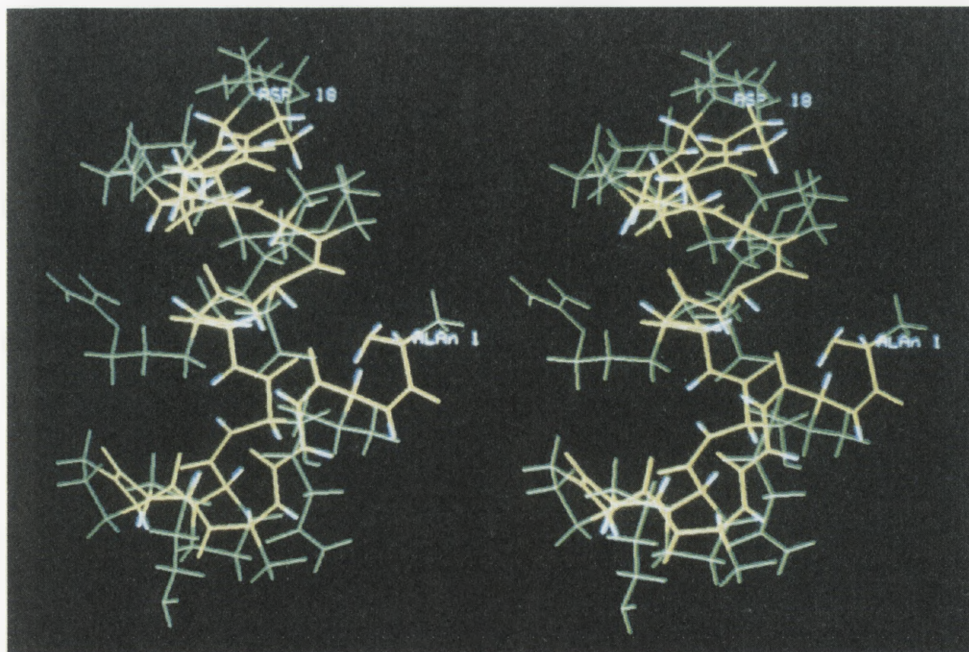
W innych badaniach NMR (500 MHz) analizowano 8 mM roztwór systeminy w 90% $\text{H}_2\text{O}/10\% \text{D}_2\text{O}$, pH 3,2, trzech różnych temperaturach – 281 K, 293 K i 308 K [20]. Na podstawie analizy widm dwuwymiarowych (DQCOSY, TOCSY, NOESY) udało się oznaczyć linie rezonansowe wszystkich jąder wodoru. Zauważono jednocześnie, że w danych warunkach eksperymentalnych (niskie pH) występuje zjawisko izomeryzacji *cis-trans* peptydu. W widmach NMR ujawniało się ono zwielokrotnieniem linii rezonansowych od tego samego układu spinowego, który tworzą wszystkie protony łańcucha bocznego określonego aminokwasu. Obserwowano podwojenie linii rezonansowych protonów 13 aminokwasów – od Gln3 do Met15 (rys. 4). Izomeryzacja *cis-trans* systeminy dotyczy wiązań z udziałem reszt prolinowych. Stwierdzono, że dwa izomery różniły się konformacją wiązań peptydowych Lys5 - Pro6 i Asp11 - Pro12.

Na podstawie widm ^1H NMR oszacowano wzajemny stosunek obu izomerów *cis* i *trans*. W pH 3,2 populacja izomeru *cis* zmieniała się od 7% w temp. 281 K do 20% w temp. 308 K. Znając populacje poszczególnych izomerów cząsteczki w określonych warunkach eksperymentalnych możliwe było oszacowanie swobodnej entalpii procesu izomeryzacji, która w temp. 308 K, przy pH 3,2 wynosiła 0,98 kcal/mol.

W widmach NOESY zaobserwowano również pojedyncze linie rezonansowe wskazujące na istnienie oddziaływań dipolowych dalekiego zasięgu: $\text{H}\gamma$ Val2 - NH Arg10, $\text{H}\alpha$ Gln3 - NH Asp11 oraz $\text{H}\gamma$ Lys9 - NH Gln16 [20]. Wszystkie te sygnały pochodziły od protonów izomeru *cis*. Dla izomeru *trans* nie obserwowano sygnałów wskazujących na oddziaływania dalekiego zasięgu. Na tej podstawie wysunięto wniosek, że izomer *trans* zachowuje strukturę statystycznego kłęбка, natomiast izomer *cis* przyjmuje formę pofałdowaną. Przy pomocy znanych procedur dynamiki molekularnej oraz uwzględniając wszystkie więzy, jakie udało się wyznaczyć na podstawie badań NMR, obliczono strukturę izomeru *cis*. Na rysunku 5 przedstawiona jest jedna z 20 końcowych struktur o najniższej energii. Ma ona formę struktury β w kształcie litery Z (*Z-like β -sheet*) [4,5]]. Obliczona struktura systeminy nie wykazuje takiej symetrii, jaka wynikała ze struktury pierwszorzędowej peptydu (rys. 2). Niewielkie załamanie symetrii następuje głównie ze względu na rozkład wiązań peptydowych. Ponieważ obliczona struktura odpowiada tylko jednemu z możliwych izomerów, jest możliwe, że dynamiczna równowaga między różnymi izomerami systeminy spełnia wymogi struktury palindromicznej. Obliczona struktura izomeru *cis* jest prawdopodobnie jedną z najbardziej stabilnych.



Rys. 4. Fragment widma TOCSY dla systeminy. Widmo zarejestrowano na spektrometrze BRUKER AMX-500 500 MHz, w czasie mieszania (60 ms) stosowano sekwencję impulsową MLEV-16 [20]. Próbkę stanowiło 500 ml 8 mM systeminy w 90% H_2O /10% D_2O , pH 3,2, temp. 308 K. Jako wzorzec wewnętrzny stosowano DSS



Rys. 5. Struktura przestrzenna systeminy (stereo) obliczona za pomocą programu XPLOR 3.01 [20]

4. ODDZIAŁYWANIE SYSTEMINY Z BIAŁKAMI I DNA

W ostatnim czasie zanotowano znaczny postęp w badaniach nad receptorami systemicznych cząsteczek sygnałnych. Udało się między innymi znaleźć receptor kwasu salicylowego oraz sklonować przypuszczalny receptor etylenu [2,3,21]. Podobne badania prowadzone są także w odniesieniu do systeminy. Ostatnio wyizolowano białko wiążące systeminę – SBP-50 (ang. *Systemin Binding Protein* – SBP) [19]. Autorom nie udało się jednak wykazać specyficzności tworzenia kompleksu, natomiast stwierdzono, że białko SBP ma właściwości furyny [19]. Jeśli tak, to powstaje pytanie, z jakimi cząsteczkami może oddziaływać systemina?

Z analizy strukturalnej wielu kompleksów białko-DNA wiadomo, że β -wstęga (ang. *β -sheet*) jest często domeną odpowiedzialną za oddziaływanie między makrocząsteczkami [14,15]. Z drugiej strony, struktura palindromiczna systeminy sugeruje możliwość oddziaływania symetrycznego peptydu z palindromiczną sekwencją DNA, podobnie jak to ma miejsce w represorach tryptofanowym i metioninowym z *E.coli* [21]. W tym ostatnim przypadku domeną odpowiedzialną za oddziaływanie białko-DNA jest β -wstęga.

Przeprowadzona chromatografia powinowactwa systeminy wskazuje wyraźnie na swoiste oddziaływanie peptydu z DNA kowalennie związanym z celulozą [20].

Inny peptyd o podobnej długości (ląc peptyd o długości 15 aminokwasów) nie wiązał się z DNA. Obserwacje te stały się podstawą do sformułowania hipotezy o aktywacji ekspresji genu inhibitora proteaz na drodze specyficznego oddziaływania białko-DNA.

Kompleksy systeminy z DNA obserwować można także przy pomocy kapilarnej elektroforezy [10]. Poznanie pełnej swoistości oddziaływań systeminy wymaga dalszych badań.

Część badań własnych opisanych w pracy była finansowana przez Komitet Badań Naukowych w ramach grantu dla J.B.

LITERATURA

- [1] BOWLER C, CHVA NH. Emerging themes of plant signal transduction. *The Plant Cell* 1994; **6**: 1529–1541.
- [2] CHANG C. The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis*: an emerging paradigm. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 129–133.
- [3] ECKER JR. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 1995; **268**: 667–675.
- [4] EFIMOV AV. Standard structures in proteins. *Progr Biophys Molec Biol* 1993; **60**: 201–230.
- [5] EFIMOV AV. Favoured structural motifs in globular proteins. *Structure* 1994; **2**: 999–1002.
- [6] ENYEDI AJ, YALPANI N, SILVERMAN P, RASKIN I. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* 1992; **70**: 879–886.
- [7] GREEN TR, RYAN CA. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. *Science* 1972; **175**: 776–777.
- [8] MCGURL B, PEARCE G, OROZCO-CARDENAS M, RYAN CA. Structure, expression and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* 1992; **225**: 1570–1573.
- [9] MCGURL B, RYAN CA. The organization of the prosystemin gene. *Plant Mol Biol* 1992; **20**: 405–409.
- [10] MUCHA P, REKOWSKI P, KUPRYSZEWSKI G, BARCISZEWSKI J. Monitoring of the purification of systemin by capillary electrophoresis. *J Chromatogr* 1996; w druku.
- [11] NARVAEZ-VASQUEZ J, PEARCE G, OROZCO-CARDENAS ML, FRANCESCHI VR, RYAN CA. Autoradiographic and biochemical evidence for the systemic translocation of systemin in tomato plants. *Planta* 1995; **195**: 593–600.
- [12] PEARCE G, STRYDOM D, JOHNSON S, RYAN CA. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 1991; **253**: 895–898.
- [13] PEARCE G, JOHNSON S, RYAN CA. Structure-activity of deleted and substituted systemin, an 18-amino acid polypeptide inducer of plant defensive genes. *J Biol Chem* 1993; **268**: 212–216.
- [14] PHILLIPS K, PHILLIPS SEV. Electrostatic activation of *Escherichia coli* methionine repressor. *Structure* 1994; **2**: 309–316.
- [15] RAUMANN BE, ROULD MA, PABO CO, SAUER RT. DNA recognition by β -sheets in the Arc repressor-operator crystal structure. *Nature* 1994; **367**: 754–757.
- [16] REINBOTHE S, MOLLLENHAUER B, REINBOTHE C. JIPs and RIPs: The regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *The Plant Cell* 1994; **6**: 1197–1209.

- [17] RUSSELL DJ, PEARCE G, RYAN CA, SATTERLEE JD. Proton NMR assignments of systemin. *J Prot Chem* 1992; **11**: 265–274.
- [18] RYAN CA. The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Mol Biol* 1992; **19**: 123–133.
- [19] SCHALLER A, RYAN CA. Identification of a 50 kDa systemin-binding protein in tomato plasma membranes having kex2p-like properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 11802–11806.
- [20] ŚLÓSAREK G, KALBITZER HR, MUCHA P, REKOWSKI P, KUPRYSZEWSKI G, GIEL-PIETRASZUK M, SZYMAŃSKI M, BARCISZEWSKI J. Mechanism of the activation of proteinase inhibitor synthesis by systemin involves β -sheet structure, a specific DNA-binding protein domain. *J Struct Biol* 1995; **115**: 30–36.
- [21] WOLTERING EJ. Ethylene: a tiny molecule with great potential. *Bioassays* 1995; **17**: 287–290.
- [22] WUTHRICH K. Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 1990; **265**: 2025–2041.

Otrzymano: 27.02. 1996 r.

Przyjęto: 12.06. 1996 r.

Adres autorów: Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
61704 Poznań, Noskowskiego 12

STATUT POLSKIEGO TOWARZYSTWA CYTOMETRII (zatwierdzony przez Sąd Wojewódzki w Warszawie dnia 24 kwietnia 1996 r.)

I. Nazwa, siedziba, teren działalności i charakter prawny Towarzystwa

§1

Stowarzyszenie nosi nazwę Polskie Towarzystwo Cytometrii (w dalszym ciągu oznaczone skrótem PTC).

§2

Terenem działalności PTC jest obszar Rzeczypospolitej Polskiej, a siedzibą Władz miasto Warszawa.

§3

PTC rozwija działalność za pośrednictwem Zarządu Głównego i Oddziałów zorganizowanych w poszczególnych miastach.

II. Cele i środki działania

§4

Celem PTC jest popieranie rozwoju cytometrii i popularyzowanie tej metodyki oraz jej zastosowań.

§5

Środki prowadzące do tego celu są następujące:

- a) urządzenie posiedzeń naukowych i dyskusyjnych, odczytów, wykładów, wystaw, konkursów i ankiet oraz zjazdów naukowych i dydaktycznych;
- b) wydawanie i popieranie działalności wydawniczej z dziedziny cytometrii i jej zastosowań;
- c) popieranie badań naukowych i przyznawanie stypendiów;
- d) utrzymywanie łączności z pokrewnymi stowarzyszeniami oraz organizowanie wymiany wydawnictw naukowych, członkostwo w innych pokrewnych organizacjach międzynarodowych;
- e) organizowanie wymiany naukowej z zagranicą przez zapraszanie uczonych zagranicznych do Polski i delegowanie za granicę przedstawicieli Towarzystwa;
- f) tworzenie spośród swoich członków sekcji i komisji do wykonywania poszczególnych zadań.

III. Prawa i obowiązki członków

§6

Członkowie Towarzystwa dzielą się na:

- a) zwyczajnych,
- b) honorowych,
- c) wspierających.

§7

Członkiem zwyczajnym Towarzystwa może zostać każda pełnoletnia osoba, mająca dorobek naukowy w dziedzinie cytometrii lub dziedzin pokrewnych, czy też przyczyniająca się w wybitny sposób do popularyzacji tych dziedzin.

§8

Godność członków honorowych nadaje Walne Zgromadzenie na wniosek Zarządu Głównego, osobom fizycznym, wybitnie zasłużonym na polu cytometrii i dziedzin pokrewnych. Nabycie praw członka PTC następuje z chwilą wyrażenia przez te osoby zgody na udział w pracach PTC.

§9

Członkiem wspierającym Towarzystwa może zostać każda osoba fizyczna lub prawna, okazująca gotowość współpracy z Towarzystwem w realizacji jego celów.

§10

Osoba pragnąca zostać członkiem zwyczajnym lub wspierającym PTC składa Zarządowi Głównemu lub Zarządowi Oddziału deklarację, zaopiniowaną przez dwóch członków zwyczajnych lub honorowych Towarzystwa. Listę przyjętych członków Zarząd Oddziału przedstawia do zatwierdzenia Zarządowi Głównemu. Zarząd Główny, w razie decyzji odmownej zawiadamia o niej Oddział w terminie 2 tygodni od jej podjęcia.

§11

Członkowie zwyczajni i wspierający opłacają wpisowe oraz składki roczne, których wysokość ustala Walne Zgromadzenie.

§12

Członkowie honorowi nie opłacają składek ani wpisowego i otrzymują bezpłatnie wydawnictwa Towarzystwa.

§13

Wszyscy członkowie Towarzystwa mają prawo:

- a) czynnego udziału w zebraniach naukowych Towarzystwa;

b) otrzymywania wydawnictw Towarzystwa na warunkach ustalonych przez Zarząd Główny.

Członkowie honorowi i zwyczajni mają ponadto prawo:

c) głosowania na Walnych Zgromadzeniach Towarzystwa;

d) wybieralności do wszystkich władz Towarzystwa.

§14

Do obowiązków wszystkich członków Towarzystwa należy czynny udział w pracach Towarzystwa i popieranie jego zamierzeń wymienionych w §4.

§15

Każdy członek ma prawo wystąpienia z PTC, obowiązany jest jednak powiadomić o tym na piśmie Zarząd Oddziału i uregulować zaległe składki.

§16

W razie nieopłacenia przez członka składek w ciągu 2 lat, Zarząd Oddziału może podjąć uchwałę o skreśleniu z listy członków Towarzystwa, a po ich uregulowaniu przywrócić go ponownie do jego praw.

§17

Członek Towarzystwa może być wykluczony z listy członków za czyny nie licujące z godnością członka lub za działalność na szkodę Towarzystwa. Wykluczenie następuje na mocy uchwały Zarządu Głównego większością 2/3 głosów, przy czym na żądanie wykluczonego motywy powinny być zakomunikowane na piśmie. Wykluczonemu przysługuje prawo odwołania się do Walnego Zgromadzenia w terminie 2 tygodni od doręczenia uchwały.

IV. Władze Stowarzyszenia

§18

Władzami PTC są: Walne Zgromadzenie członków, Zarząd Główny, Prezydium Zarządu i Komisja Rewizyjna.

§19

Walne Zgromadzenie członków PTC jest naczelną władzą PTC. Wytacza ono kierunki działania Towarzystwa i zasady gospodarki finansowej, ustala wysokość składki członkowskiej, przeprowadza wybory Zarządu Głównego i Komisji Rewizyjnej, udziela lub odmawia absolutorium ustępującemu Zarządowi Głównemu, rozstrzyga odwołania członków od uchwał Zarządu Głównego w sprawie wykluczenia ich z PTC.

§20

Walne Zgromadzenia członków dzielą się na zwyczajne i nadzwyczajne. Zwyczajne Walne Zgromadzenie członków PTC zwołuje Zarząd Główny, w związku z zakończeniem swej kadencji, co 2 lata. Nadzwyczajne Walne Zgromadzenie zwołuje Zarząd Główny z własnej inicjatywy, na pisemne żądanie Komisji Rewizyjnej PTC lub na żądanie nie mniej niż 1/4 członków zwyczajnych i honorowych.

§21

Walnemu Zgromadzeniu członków PTC przewodniczy wybrany przez zebranych członek honorowy lub zwyczajny, protokołuje wybrany sekretarz Zgromadzenia.

§22

Zarząd Główny zobowiązany jest przesłać zawiadomienie o zwołaniu Walnego Zgromadzenia, wraz z proponowanym porządkiem dziennym, wszystkim członkom Towarzystwa, przynajmniej na dwa tygodnie przed wyznaczonym terminem zgromadzenia.

§23

Porządek dzienny zwyczajnego Walnego Zgromadzenia ustala Zarząd Główny. Porządek dzienny może być uzupełniony przez Walne Zgromadzenie, na życzenie Zarządu każdego z Oddziałów, doręczone na piśmie Zarządowi Głównemu, najpóźniej na pięć dni przed terminem Walnego Zgromadzenia.

§24

Porządek dzienny nadzwyczajnego Walnego Zgromadzenia musi obejmować punkty dotyczące spraw, celem których załatwienia nadzwyczajne Walne Zgromadzenie zostało zwołane.

§25

Walne Zgromadzenie członków PTC jest prawomocne w pierwszym zwołanym terminie jeżeli uczestniczy w nim co najmniej połowa sumy liczby członków zwyczajnych i honorowych. Jeżeli to nie nastąpi, w drugim terminie wyznaczonym nie wcześniej niż 30 minut po upływie czasu pierwszego terminu, do ważności uchwał Walnego Zgromadzenia wystarczy obecność co najmniej 1/4 liczby członków.

§26

Uchwały zapadają zwykłą większością głosów, z wyjątkiem uchwał dotyczących zmian statutu, wyboru członków honorowych i wykluczenia członków, którzy odwołali się do Walnego Zgromadzenia oraz rozwiązania Towarzystwa. Uchwały te wymagają 2/3 głosów. Wybory do Zarządu Głównego i udzielenie absolutorium odbywają się w głosowaniu tajnym. Inne uchwały mogą być podejmowane w głosowaniu jawnym, jeżeli obecni jednomyślnie zgodzą się na taką formę głosowania.

§27

Walne Zgromadzenie członków Towarzystwa wybiera w tajnym głosowaniu:

- a) Prezesa,
- b) Prezesa-Elekta,
- c) czterech członków Zarządu Głównego,
- d) trzyosobową Komisję Rewizyjną.

Ustępujący prezes wchodzi do Zarządu z urzędu, na jedną kadencję.

§28

Kadencja Zarządu Głównego trwa dwa lata. Tej samej funkcji w Zarządzie członek nie może pełnić przez okres więcej niż dwóch kadencji, funkcje w Zarządzie Głównym nie mogą być łączone.

§29

Zarząd Główny PTC kieruje działalnością Towarzystwa, wykonuje nadzór nad działalnością Oddziałów i zarządza majątkiem Towarzystwa, zgodnie z postanowieniami niniejszego Statutu i uchwałami Walnego Zgromadzenia członków oraz reprezentuje Towarzystwo na zewnątrz.

§30

Zarząd Główny PTC składa się z Prezesa, Prezesa-Elekta, Przewodniczących Oddziałów oraz ponadto pięciu członków – w tej liczbie Sekretarza i Skarbnika oraz Prezesa poprzedniej kadencji. W przypadku zmniejszenia się składu Zarządu Głównego ma on prawo dokooptowania do swego składu najwyżej dwóch członków, poza wymienionymi wyżej. W razie niemożności przybycia Przewodniczącego Oddziału na posiedzenie Zarządu Głównego, ma on prawo upelnomocnić jednego z członków Zarządu Oddziału do zastępowania siebie na tym posiedzeniu. Pełnomocnictwo to winno być wydane na piśmie i jest ważne tylko na jedno posiedzenie Zarządu Głównego. Prezes, Prezes-elekt, Sekretarz i Skarbnik tworzą Prezydium Zarządu Głównego PTC. Bieżące sprawy PTC są prowadzone przez Prezydium Zarządu Głównego.

§30

Najpóźniej w 10 dni po wyborach winno się odbyć posiedzenie konstytucyjne Prezydium Zarządu Głównego, na którym członkowie wybrani przez Walne Zgromadzenie dokonują wyboru spośród siebie funkcji Sekretarza, Skarbnika i ewentualnie inne.

§32

W razie ustąpienia Prezesa Towarzystwa w czasie trwania kadencji, funkcje jego aż do najbliższego Walnego Zgromadzenia obejmuje Prezes-elekt. Jeżeli Zgro-

madzenie to byłoby Nadzwyczajnym Walnym Zgromadzeniem, to w jego porządku dziennym winien znaleźć się punkt przewidujący wybory nowego Prezesa-Elekta.

§33

Zarząd Główny organizuje przynajmniej raz na trzy lata zjazdy naukowe lub powierza ich organizację Zarządom Oddziałów.

§34

Posiedzenie Prezydium Zarządu Głównego PTC zwołuje Prezes lub Prezes-elekt, w zasadzie raz na dwa miesiące.

§35

Posiedzenie plenarne Zarządu Głównego PTC zwołuje Prezes lub Prezes-elekt, co najmniej jeden raz w roku. Zwołuje on ponadto posiedzenia plenarne na pisemny wniosek Komisji Rewizyjnej lub przynajmniej 3 członków Zarządu Głównego. Wszyscy członkowie Zarządu Głównego powinni otrzymać zawiadomienie o posiedzeniu, przynajmniej na tydzień przed terminem, wraz z proponowanym porządkiem dziennym.

§36

Do prawomocności uchwał Zarządu Głównego wystarczy obecność co najmniej 2/3 członków tego Zarządu, w tym Prezesa lub Prezesa-Elekta. Uchwały Zarządu Głównego lub jego Prezydium zapadają zwykłą większością głosów. W razie równości głosów rozstrzyga głos przewodniczącego zebrania. Przebieg obrad jest protokolowany. Protokół podpisuje Przewodniczący i Sekretarz.

§37

Prezes Zarządu Głównego przewodniczy z urzędu posiedzeniom Zarządu. Reprezentuje PTC we wszystkich jego stosunkach z władzami i instytucjami naukowymi w kraju i za granicą. Do dokonywania czynności prawnych w imieniu PTC upoważniony jest Prezes Zarządu Głównego oraz ustanowieni przez niego pełnomocnicy.

§38

Skarbnik prowadzi księgowość Zarządu Głównego, sporządza zestawienia i sprawozdania finansowe dla władz, Walnego Zgromadzenia członków oraz Komisji Rewizyjnej, prowadzi i podpisuje korespondencję dotyczącą zobowiązań materialnych.

§39

Komisja Rewizyjna składa się z trzech osób, wybranych przez Walne Zgromadzenie na okres kadencji Zarządu Głównego. Komisja Rewizyjna konstituując

się, wybiera ze swego składu Przewodniczącego i zastępcę. W przypadku zmniejszenia się składu Komisji Rewizyjnej ma ona prawo dokooptowania do swego składu nie więcej niż 1 osobę.

§40

Komisja Rewizyjna przeprowadza kontrolę działalności Towarzystwa i jest obowiązana przynajmniej raz w okresie kadencji przed Walnym Zgromadzeniem członków dokonać rewizji ksiąg, dokumentów kasowych, sprawdzić stan majątku i prawidłowość wydatków finansowych w oparciu o preliminarz oraz złożyć na piśmie sprawozdanie i wnioski Walnemu Zgromadzeniu. Wśród tych wniosków Komisja Rewizyjna stawia również wniosek o udzielenie lub odmówienie absolutorium ustępującemu Zarządowi Głównemu. Postanowienia Komisji Rewizyjnej podejmowane są zwykłą większością głosów.

V. Struktury terenowe

§41

W celu realizacji zadań PTC, z inicjatywy Zarządu Głównego albo z inicjatywy terenowej, mogą powstawać w poszczególnych miejscowościach Oddziały PTC, które będą jednostkami regulaminowymi PTC. Do powołania Oddziału wymagany jest udział przynajmniej pięciu osób.

§42

Na pokrycie kosztów związanych z działalnością – Oddziały otrzymują fundusze, których wielkość ustala Zarząd Główny.

§43

Oddziały zobowiązane są składać raz do roku Zarządowi Głównemu sprawozdania z działalności naukowej, organizacyjnej i finansowej.

VI. Majątek Towarzystwa

§44

Majątek Towarzystwa powstaje z:

- a) opłat wpisowych,
- b) składek członkowskich,
- c) subwencji państwowych, instytucji samorządowych itp.,
- d) darowizn, spadków i zapisów.

§45

Towarzystwo prowadzi księgi rachunkowe i inwentaryzacyjne, przygotowane do czynności i potrzeb, zgodnie z wymaganiami przepisów ogólnych.

§46

Funduszami Towarzystwa dysponuje zgodnie z opracowanym i zatwierdzonym preliminarzem Prezes lub Prezes-elekt wspólnie ze Skarbnikiem, albo osobą przez nich upoważnioną, zgodnie z obowiązującymi przepisami. Oni też są uprawnieni do zaciągania zobowiązań majątkowych.

VII. Przepisy końcowe

§47

Zmiany Statutu PTC zapadają na mocy uchwały Walnego Zgromadzenia członków PTC większością 2/3 głosów. Walne Zgromadzenie członków PTC jest prawomocne w pierwszym zwołanym terminie jeżeli uczestniczy w nim co najmniej połowa sumy liczby członków zwyczajnych i honorowych. Jeżeli to nie nastąpi, w drugim terminie wyznaczonym nie wcześniej niż 30 minut po upływie czasu pierwszego terminu, do ważności uchwał Walnego Zgromadzenia wystarczy obecność conajmniej 1/4 liczby członków. Projekt zmiany Statutu powinien być przesłany członkom PTC na co najmniej trzy tygodnie przez Walnym Zgromadzeniem.

§48

Rok gospodarczy Towarzystwa trwa od 1 stycznia do 31 grudnia.

§49

Rozwiązanie Towarzystwa może nastąpić na mocy uchwały Walnego Zgromadzenia Członków PTC, powziętej większością 2/3 głosów. Walne Zgromadzenie, uchwalając rozwiązanie Towarzystwa, jednocześnie decyduje o sposobie likwidacji i o użyciu jego majątku. Walne Zgromadzenie członków PTC jest w sprawie rozwiązania Towarzystwa prawomocne w pierwszym zwołanym terminie, jeżeli uczestniczy w nim co najmniej połowa sumy liczby członków zwyczajnych i honorowych. Jeżeli to nie nastąpi, w drugim terminie ważność uchwał Walnego Zgromadzenia nie zależy od liczby obecnych członków Towarzystwa.

KOMUNIKATY

VI Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki

odbędzie się w dniach 12–14 września 1996 r. w Lublinie.

Program naukowy Konferencji stwarza możliwość prezentacji najnowszych osiągnięć teoretycznych i doświadczalnych z zakresu biologii komórki w ramach 10 niżej wymienionych sekcji tematycznych:

- Błony biologiczne
- Patologia komórki
- Starzenie się i śmierć komórek
- Biologia rozwoju
- Ruch i cytoskielet– Komunikacja międzykomórkowa
- Komórka a środowisko
- Współczesne metody w biologii komórki
- Morfologiczna analiza ilościowa
- Varia.

Przewiduje się 40-minutowe wykłady (po 3 w każdej sekcji) oraz prezentacje prac w formie plakatów – w ramach poszczególnych sekcji.

Zgłoszenie chęci uczestnictwa w Konferencji powinno nastąpić przed 31 stycznia 1996 roku (z podaniem tytułu zgłaszanej pracy, trzech słów kluczowych oraz sugestią sekcji tematycznej).

Obrady Konferencji będą prowadzone w języku polskim.

Wszelkich informacji związanych z Konferencją udziela

dr hab. K. Trębacz
Zakład Biofizyki Instytutu Biologii UMCS
20-033 Lublin, ul. Akademicka 19
Fax: (81) 375102, tel. 375080
E-mail: TREBACZ.BIOTOP.UMCS.LUBLIN.PL

Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej przyznaje doroczną nagrodę naukową, w tym również w roku 1996, za wyróżniającą się oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w ostatnich dwóch latach w czasopiśmie figurującym w Current Content.

Wysokość nagrody w 1996 r. wyniesie 600 NZŁ

Zgłoszenia wraz z dwoma odbitkami należy kierować do dnia 15 listopada każdego roku pod adresem Fundacji. Regulamin nagrody poniżej.

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa
tel. 34-03-44, fax 3404470

Regulamin

dorocznej nagrody Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

- * 1. Raz w roku przyznawana będzie jedna nagroda za wyróżniającą się, oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej.
- * 2. Praca musi być wydrukowana w czasopiśmie naukowym referowanym w Current Content.
- * 3. Praca powinna być opublikowana nie wcześniej niż w ostatnich dwóch latach poprzedzających nadanie nagrody.
- * 4. Preferowane będą prace młodych autorów.
- * 5. Wysokość nagrody w danym roku kalendarzowym ustala Zarząd Fundacji.
- * 6. Zgłaszać pracę do nagrody może każdy.
- * 7. Pracę należy zgłaszać do Zarządu Fundacji ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, pokój 314 do 15 października każdego roku.
- * 8. Ocenę kwalifikującą prace do nagrody przeprowadza Komisja Nagród powołana przez Zarząd Fundacji zasięgając w razie potrzeby opinii specjalistów.
- * 9. Decyzja Komisji ogłaszana będzie w "Postęпах Biologii Komórki".
- * 10. Nagroda wręczana będzie w czasie jednej z konferencji naukowych z zakresu biologii komórki.

XXVI Konferencja szkoleniowa z zakresu biologii komórki

Uprzejmie zawiadamiamy, że Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Anatomicznego i Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików oraz Redakcja Postępów Biologii Komórki organizują doroczną konferencję szkoleniową na temat:

"Mechanizmy regulacji ekspresji genów eukariotycznych",
która odbędzie się w dniu 7 grudnia (sobota) 1996 r. w Warszawie w sali wykładowej im. L. Paszkiewicza w "Anatomicum" Akademii Medycznej przy ul. Chałubińskiego 5. Początek obrad o godz. 10.

Opłata za uczestnictwo 5 NZŁ płatna na miejscu obrad. W ramach opłaty uczestnicy otrzymają suplement 6 PBK zawierający materiały Konferencji.

Program konferencji:

Otwarcie konferencji

Wprowadzenie – *Jacek Kuźnicki*

Struktura chromatyny a regulacja transkrypcji – *Andrzej Jerzmanowski* (Pracownia Biologii Molekularnej Roślin, UW/IBB)

Rola metylacji DNA w ekspresji genów – *Jan Fronk* (Instytut Biochemii UW)

***Xenopus laevis* jako model do badań funkcjonalnych czynników transkrypcyjnych** – *Monika Puzianowska-Kuźnicka* (NIH, NICHD, LME)

Przerwa

Promotory genów kodujących białka o komórkowo-specyficznej ekspresji – *Jacek Kuźnicki* (Inst. Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN)

Rola indukowanych czynników transkrypcyjnych w regulacji ekspresji genów – *Bożena Kamińska-Kaczmarek* (McGill, Department of Psychology, McGill University)

TBP – struktura, funkcje oraz interakcje z innymi czynnikami transkrypcyjnymi
Ewa Bartnik (Zakład Genetyki, UW/IBB)

Podsumowanie

Uczestnikom Konferencji zostaną również udostępnione po niższej cenie zeszyty PBK.

Warszawa, sierpień 1996 r.

Organizatorzy

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. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności, a do Redakcji w Warszawie tylkote artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

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

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach na adres redakcji w Warszawie bądź jednego z Redaktorów (adresy na 2 str. okładki). Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach, na dyskietce przyspieszy publikację.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy w pracy i domowy 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, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. 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 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 niezminionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą, a ponadto mogą zamówić odbitki odpłatnie.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania: Dołączono 2 kopie maszynopisu, Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została tabel i rycin. **tak nie** wysłana do innej redakcji. **tak nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę. **tak nie** Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak nie**
Jest zgoda osób, których informacje niepubli-
kowane są zamieszczone w tekście artykułu **tak nie** Odpowiadam za całość pracy opisaną w zał. maszyn. **tak nie**
Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. **podpis**

TREŚĆ

W tym zeszycie	317
MARLICZ W.: Trombopoetyna – odkrycie, właściwości i potencjalne zastosowanie kliniczne	319
JAŁOSZYŃSKI P., KUJAWSKI M., SZYFTER K.: Nowa technika badania uszkodzeń DNA – <i>comet assay</i>	339
KUPCZYK P., SOWIŃSKI P., TRZECIAK W. H.: Diagnostyka molekularna zespołu nadnerczowo-płciowego	355
SĄSIADK M., PAPROCKA-BOROWICZ M., ŚLĘZAK R.: Zastosowanie technik cytogenetycznych do biologicznego monitorowania narażenia na czynniki mutagenne	373
GBUREK J., GOŁĄB K.: Cystatyny pochodzenia roślinnego	385
TRETYN A.: Białka wiążące GTP: budowa i funkcje	399
ROŻYŃKOWA D.: Apoptoza doświadczalna: Modele indukcji <i>in vitro</i> i zastosowania	421
KOPEĆ-ŚLĘZAK J.: Czynniki regulacyjne apoptozy	445
MADEJA Z., KÓROHODA W.: Niektóre zastosowania metody komputerowej analizy obrazu (cytometrii obrazowej) w biologii komórki	457
ŚLÓSAREK G., BARCISZEWSKI J.: Struktura i funkcja systeminy – peptydu o właściwościach hormonu roślinnego	477
Statut Polskiego Towarzystwa Cytometrii	491
Komunikaty	498

**Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Prenumerata na rok 1996

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1996 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, 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 + ew. 2 suplementy) na rok 1996:
dla instytucji (bibliotek) wynosi 40 zł,
a dla odbiorców indywidualnych 16 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1996 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa/Poland, account No:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Price per year 20 US dollars.

Indeks 369705