

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

**TOM 24 NR-1'97**  
(1–96)

# Postępy Biologii Komórki

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

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI (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*),

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. Chałubińskiego 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. 7,5 Ark. druk. 6,0. Oddano do składu w grudniu 1996 r. Podpisano do druku w marcu 1997 r. Druk ukończono w marcu 1997 r.

## W tym zeszycie • Postępow Biologii Komórki •

- Struktura i funkcja receptora androgenowego i jego udział w nowotworzeniu gruczołu krokowego zostały omówione w artykule na stronie 49. Mutacja genu receptora androgenowego może przyczynić się do uzyskania przez komórki nowotworowe przewagi nad komórkami prawidłowymi. Nie jest jednak wykluczone, że mutacje wykrywane w genie receptora androgenowego są raczej odzwierciedleniem niestabilności genomu komórki nowotworowej.
- W artykule na stronie 67 omówiono budowę i funkcję receptora lutropiny (LH, hCG). Receptor jest glikoproteiną zawierającą domenę zewnątrzkomórkową, domenę przezbłonową złożoną z siedmiu segmentów oraz C-kończącą domenę cytoplazmatyczną. Opisano modele wyjaśniające oddziaływanie hormonu z receptorem i transdukcję sygnału zapoczątkowaną przez gonadotropiny.
- W punktach złamań chromosomów podlegającym aberracjom strukturalnym w ostrych białaczkach szpikowych (AML) zlokalizowano geny odgrywające rolę w leukemogenezie. W wyniku translokacji t(8;12) typowej dla AML M2 dochodzi do fuzji genów *eto* i *aml 1*, co zaburza zależną od AML 1 aktywację genów odpowiedzialnych za hemopoezę. Te i inne rearanżacje genów w AML i ich skutki są szczegółowo omówione w trzecim już z tej serii artykułów (na stronie 3) ostatnio publikowanych w Postępow Biologii Komórki (poprzednie artykuły PBK 23; ss. 169 i 183, z 1996 r.).
- Rodzina genów *bcl-2* jest przedmiotem intensywnych badań z uwagi na ich rolę w procesie apoptozy. Artykuł na stronie 33 nawiązuje do wcześniej opublikowanego artykułu o apoptozie doświadczalnej (PBK 23; 421, 1996).



## NAJCZĘSTSZE ABERRACJE STRUKTURALNE CHROMOSOMÓW W OSTRYCH BIAŁACZKACH SZPIKOWYCH *DE NOVO*

### THE MOST FREQUENT STRUCTURAL CHROMOSOME ABERRATIONS IN *DE NOVO* ACUTE MYELOID LEUKEMIAS

Marzena CZARNECKA<sup>(1)</sup>, Olga HAUS<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego AM Wrocław, <sup>(2)</sup>Zakład Genetyki, Katedra Patofizjologii AM Wrocław

*Streszczenie:* W punktach złamań chromosomów ulegających aberracjom strukturalnym w ostrych białaczkach szpikowych (obs) zlokalizowano geny odgrywające rolę w leukemogenezie. Określone aberracje i odpowiadające im rearanżacje genów wiążą się z określonymi cechami fenotypowymi białaczki. W wyniku translokacji t(8;21), typowej dla obs M2, dochodzi do fuzji genów *eto* i *aml1*, co zaburza zależną od AML1 aktywację genów odpowiedzialnych za hemopoezę. W wyniku korzystnej rokowniczo t(15;17), specyficznej dla obs M3, dochodzi do fuzji genów *pml* i *rara* (receptora alfa kwasu retinowego), co blokuje dojrzewanie komórek szeregu granulocytowego stymulowane przez kwas retinowy. Specyficzne leczenie dużymi dawkami kwasu retinowego przełamuje blok i indukuje remisję choroby. Występującym głównie w obs M5a, niekorzystnym prognostycznie aberracjom 11q23 towarzyszy rearanżacja genu *mll*. W wyniku inv(16)(p13q22) skojarzonej z obs M4Eo dochodzi do powstania genu fuzyjnego *cbfb/myh 11*, którego produkt hamuje działanie genu *aml 1*, zaburzając prawidłową eozynopoezę. t(6;9), w wyniku której dochodzi do fuzji genów *dek* i *can*, zaburzającej transport białek i RNA między jądrem komórkowym a cytoplazmą, kojarzy się z mielodysplazją, bazofilią w szpiku oraz młodym wiekiem chorych.

*Słowa kluczowe:* ostra białaczka szpikowa, aberracje strukturalne chromosomów, rearanżacje genów, fuzja genów, czynnik rokowniczy

*Summary:* In the breakpoints of chromosomes involved in structural aberrations in acute myeloid leukemias (AML) the genes taking part in the leukemogenesis were localized. Particular aberrations and accompanying gene rearrangements are associated with distinct phenotypic features of leukemia. Translocation t(8;21), typical of AML M2, results in a fusion of *eto* and *aml1* genes, which interferes with AML1 - dependent activation of genes responsible for hemopoiesis. t(15;17), a good prognostic factor, specific of AML M3, results in *pml/rara* (retinoic acid receptor alpha) gene fusion, that blocks

granulocytic cells maturation stimulated by retinoic acid. Specific treatment with high doses of retinoic acid overcomes the block and induces remission of the disease. *inv(16)(p13q22)* associated with AML M4Eo results in a fusion gene *cbfb/myh 11*, which product inhibits *aml1* gene function subsequently disturbing normal eosinophilopoiesis. 11q23 aberrations, a bad prognostic factor, present mainly in AML M5a, are accompanied by *ml1* gene rearrangement. *t(6;9)*, associated with *dek* and *can* gene fusion, which interferes protein and RNA transport between cell nucleus and cytoplasm, is associated with myelodysplasia, bone marrow basophilia and young patients age.

*Key words:* acute myeloid leukemia, structural chromosome aberrations, gene rearrangements, gene fusion, prognostic factor

## NAJCZĘSTSZE ABERRACJE STRUKTURALNE CHROMOSOMÓW W OSTRYCH BIAŁACZKACH SZPIKOWYCH *DE NOVO*

Aberracje chromosomowe występują w 64 do 90% przypadków ostrych białaczek (o.b.). Zmiany te mogą mieć charakter aberracji liczbowych lub strukturalnych. Tym drugim z reguły towarzyszą rearanżacje genów, które mogą być obecne nawet wówczas, gdy nie stwierdza się zmian cytogenetycznych. Obecność aberracji chromosomowych oraz ich charakter, warunkujący rozwój określonego typu o.b. (zaangażowanie określonych chromosomów i genów) mają wpływ na przebieg o.b., odsetek osiągniętych remisji całkowitych i czas przeżycia pacjentów. W związku z tym wynik badania cytogenetycznego może wpływać na rodzaj i intensywność zastosowanej u pacjenta terapii. Podstawowe znaczenie ma ocena, czy dana anomalia cytogenetyczna, skojarzona z określonym typem o.b., jest czynnikiem dobrego czy złego rokowania, dobrej czy złej odpowiedzi na leczenie. W latach siedemdziesiątych uważano, że czynnikiem rokowniczym jest tzw. status chromosomowy badanych komórek: NN = prawidłowy kariotyp we wszystkich analizowanych mitozach, AN = jednoczesna obecność mitoz prawidłowych i mitoz z aberracjami klonalnymi lub AA = obecność tylko mitoz z aberracjami klonalnymi. Niezależnie od typu o.b. status NN lub AN wiązano z dobrą prognozą, natomiast status AA – ze złą. Tłumaczono to faktem, iż u chorych ze statusem AA po zastosowaniu intensywnej chemioterapii pozostające w szpiku komórki, będące punktem wyjścia odnowy, także mogą mieć zmiany chromosomowe [48].

W dalszych badaniach analizowano wartość prognostyczną poszczególnych typów aberracji chromosomowych. Stwierdzono, że złożone zmiany kariotypu skojarzone są ze złą prognozą, inwersje – z dobrą, a trisomia 8 – z pośrednią [58]. W 1986 roku "Second MIC Cooperative Study Group", analizując wyniki 10-letnich badań cytogenetycznych kilkudziesięciu laboratoriów świata, określiła zależności pomiędzy konkretnym podtypem morfologicznym i immunologicznym białaczki a charakterem towarzyszącej mu zmiany cytogenetycznej. Aberracjami strukturalnymi najczęściej



Tabela 1. Najczęstsze aberracje chromosomowe w ostrych białaczkach szpikowych

Aberracje	Geny uczestniczące	Występowanie (typ ostrej białaczki szpikowej)	Najważniejsze korelacje hematologiczno-kliniczne
t(9;22) (q34;q11)	<i>bcr</i> <i>abl</i>	M1-mieloblastyczny bez cech różnicowania rzadziej inne	złe rokowanie
t(8;21) (q22;q22)	AML 1 ETO	M2-mieloblastyczny z cechami różnicowania rzadziej inne	duże blasty z ziarnistościami i pałeczkami Auera pozaszpikowe guzy białaczkowe łatwe uzyskiwanie remisji choroby
t(15;17) (q22;q12-21)	PML RARA	M3-promielocytowy	dobre rokowanie specyficzne leczenie kwasem all-trans-retinowym
inv/del (16) (q22)	CBFB MYH 11 MT	M4-mielomonocytowy z nieprawidłową eozynocytopenią	zaburzenia eozynocytopeny dobre rokowanie
rearanżacje 11q23	MLL	M5a-monoblastyczny rzadziej inne	często białaczka dwuliniowa złe rokowanie
t(6;9) (p23;q34)	<i>dek</i> <i>can</i>	M2, M4, inne	młody wiek często po zespole mielodysplastycznym (MDS) bazofilia złe rokowanie
inv/t(3) (q21q26)	?	różne	zaburzenia trombocytopeny nadpłytkowość

spotykany w ostrych białaczkach szpikowych (o.b.s.) *de novo* są, przedstawione w tabeli 1: translokacja t(8;21)(q22;q22), translokacja t(15;17)(q22;q12-q21), inwersja lub delecja inv/del(16)(q22), translokacja t(6;9)(p23;q34), rearanżacje 11q23, inwersja lub translokacja inv/t(3)(q21q26) [18,50] oraz translokacja t(9;22), której szczegółowy opis ukazał się niedawno w "Postęпах Biologii Komórki" [17]. Oprócz wymienionych aberracji strukturalnych w o.b.s. znajduje się jeszcze wiele innych, o mniejszej częstości lub geograficznie ograniczonym zasięgu występowania [18], których nie uwzględniono w niniejszym artykule.

### t(8;21)(q22;q22)

Translokacja ta skojarzona jest głównie z o.b. mieloblastyczną z cechami dojrzewania – M2 [M2/t(8;21) wg MIC], choć była także znajdowana w o.b.s. typu

M1, M4 o.b. eozynofilowej oraz w zespole mielodysplastycznym (MDS) RAEB-t [50,53,59]. Występuje w 10% przypadków o.b.s. M2, częściej (80%) jako jedna z kilku niż jako pojedyncza aberracja i stanowi prawie 40% zmian cytogenetycznych obserwowanych w tym typie o.b.s. [50]. Stwierdzana jest głównie u chorych poniżej 50 roku życia, podczas gdy częstość o.b.s. M2 jest większa w starszym wieku. Sądzono, że rzadko występuje w przebiegu białaczek wtórnych, lecz ostatnio coraz częściej znajdowana jest we wtórnej o.b.s. po leczeniu cytostatykami działającymi na topoizomerazę II - antracyklinami i epipodofilotoksynami [41]. W występowaniu tej zmiany wśród chorych z o.b.s. M2 stwierdza się nierównomierną dystrybucję geograficzną; częstość t(8;21) jest większa w Japonii niż np. w USA [20].

Prawdopodobieństwo błędu polegającego na niewykryciu t(8;21) w badaniu w mikroskopie świetlnym jest niewielkie, ponieważ fragment 8q22-qter biorący udział w tej translokacji jest wystarczająco duży i łatwy do identyfikacji, zwłaszcza w trakcie analizy chromosomów na odbitkach fotograficznych [40].

Punktami złamania w t(8;21) są: 8q22 i 21q22, gdzie zlokalizowano onkogeny: *c-mos* i *hu-ets 2* [51]. Początkowo uważano, że *c-mos* ulega przemieszczeniu na chromosom 21 lub że krytycznym momentem dla powstania choroby jest translokacja *hu-ets-2* na chromosom 8, dane te jednak nie potwierdziły się. W obrębie translokowanego genu *hu-ets 2* nie stwierdzono rearanżacji, które mogłyby być odpowiedzialne za rozwój choroby. Być może przyczynia się do niego zmieniona ekspresja tego genu [48].

Nowsze badania wykazały, że w punkcie złamania chromosomu 21 zlokalizowany jest gen *aml 1*, kodujący czynnik transkrypcji, który reguluje funkcję wielu genów odpowiedzialnych za prawidłową hematopoezę [42], a w obrębie chromosomu 8 – gen *eto* (*eight twenty one*), określane także jako *mtg-8* (*myeloid translocation gene*) [10]. Translokacja pomiędzy chromosomem 8 i 21 doprowadza do fuzji obu genów w obrębie chromosomu 8 [41]. Produkt fuzyjnego genu *aml1/eto* zachowuje zdolność oddziaływania z DNA i zaburza aktywację genów zależną od AML 1. A więc transformacja nowotworowa zależna od fuzji *aml 1/eto* może wynikać ze zmienionej regulacji transkrypcji genów docelowych dla AML 1 [39]. Wykrywanie genu *aml1/eto* może być pomocne w poszukiwaniu t(8;21) w złożonych kariotypach. Jego obecność można stwierdzić u 80–100% pacjentów z M2/t(8;21) w momencie rozpoznania choroby, w czasie długo trwającej remisji i przy nawrocie. Spowodowane jest to prawdopodobnie lepszą przeżywalnością komórek powodowaną przez białkowy produkt fuzji genów *aml 1/eto*. Gen fuzyjny jest także obecny u pacjentów po autologicznym przeszczepie szpiku, co ogranicza wartość wykrywania *aml 1/eto* dla klinicznego monitorowania choroby, zwłaszcza dla wykrywania choroby resztkowej [31].

Natomiast przeprowadzona w okresie remisji analiza cytogenetyczna, której wyniki dotyczą komórek proliferujących, wykazuje w większości przypadków zniknięcie komórek z t(8;21) i powrót do prawidłowego kariotypu. Jeżeli w momencie



osiągnięcia CR stwierdza się nadal obecność t(8;21), czyli brak remisji cytogenetycznej, to ze względu na możliwość wczesnych nawrotów choroby i złe rokowanie u takich chorych zaleca się kontynuowanie bardziej intensywnej chemioterapii [58]. Obecność t(8;21) w komórkach pacjentów w okresie remisji może również zależeć od ekspansji klonu białaczkowego z nieprawidłowym kariotypem w warunkach hodowli. Zjawisko to zostało doświadczalnie udowodnione dla komórek z t(8;21), t(15;17) i aberracjami 11q23 [32].

Wariantowe translokacje, obejmujące przemieszczenia między 8q22 albo 21q22 a nowym partnerem chromosomowym, występują w 4% przypadków i obejmują najczęściej chromosomy 3 i 16 [40].

Analizując translokacje 21q22 zwrócono uwagę na związek interleukiny 5 (IL-5) ze złamaniami w tym prążku. Mimo że gen IL-5 nie jest tu zlokalizowany, u chorych z M2/t(8;21) leczonych IL-5 następuje dojrzewanie i różnicowanie komórek białaczkowych w kierunku eozynofilów. Ten typ białaczki określono jako "*IL-5 - responsive AML*" – białaczkę reagującą na leczenie interleukiną 5. Komórki białaczkowe z rearanżacją 21q22 mają pewne charakterystyczne cechy immunofenotypowe: łączą w sobie cechy mieloidalne (CD 13, CD 33) z cechami linii limfoidalnej B (CD 19) [55].

Dodatkowe zmiany chromosomowe są obecne w 80% przypadków M2/t(8;21) i najczęściej polegają na utracie chromosomu płciowego, co jest trzecią pod względem częstości występowania anomalią liczbową w o.b. [50]. Utrata chromosomu Y, stwierdzana aż u 74% mężczyzn z M2/t(8;21), występuje częściej niż utrata chromosomu X u kobiet (36% przypadków) [48]. Przyczyną utraty tych chromosomów przy obecności t(8;21) jest prawdopodobnie przedwczesne indukowanie ekspresji kinazy białkowej powodującej przejście z fazy G2 do mitozy. Dochodzi w ten sposób do skrócenia fazy syntezy, przez co podział komórki zachodzi, zanim replikacja chromosomów zostanie całkowicie zakończona. Komórka traci chromosomy późnoreplikujące – nieaktywny chromosom X albo chromosom Y [40].

Translokacji t(8;21) mogą towarzyszyć także inne wtórne aberracje: izochromosom długich ramion 17 – i(17q), izochromosom długich ramion chromosomu X – i(Xq) oraz częściowa delecja długich ramion chromosomu 9 – del(9q), obejmująca co najmniej region 9q22 – z reguły 9q21–9q31 [24,50].

W o.b.s. M2 pewne cechy morfologiczne komórek blastycznych sygnalizują obecność t(8;21) – blasty są duże, o niskim wskaźniku jądro-cytoplazmatycznym, z dużymi ziarnistościami w zasadochłonnej cytoplazmie. W znacznym odsetku komórek blastycznych i dojrzewających stwierdza się pałeczki Auera. W płatowatych monocytoidalnych jądrach komórkowych obecne są dwa jąderka położone obwodo. W jądrze i cytoplazmie występują wodniczki. Komórki z t(8;21) mogą różnicować się w kierunku neutrofilów i eozynofilów, które często zawierają mało ziarnistości [54]. W badaniu cytochemicznym komórki te wykazują pozytywną reakcję na peroksydazę oraz niską aktywność fosfatazy alkalicznej, co związane jest

raczej z obecnością ogólnie nieprawidłowego kariotypu niż specyficznej translokacji. Pacjenci z M2/t(8;21) mają wyższy odsetek promielocytów i dojrzałych komórek szeregu granulocytowego, w tym również eozynofików, niższy odsetek prekursorów szeregu erytroblastycznego oraz mieloblastów w szpiku niż pacjenci z M2 bez tej translokacji. Ich komórki białaczkowe wykazują ekspresję antygeny CD 19 [59]. W zakresie parametrów hematologicznych stwierdza się u nich często niski poziom Hb oraz małopłytkowość [24]. Pacjenci z MDS RAEB-t i t(8;21) mają podobne do spotykanych u pacjentów M2/t(8;21) zmiany hematologiczne, kliniczne i cytomorfologiczne, jednak odsetek blastów jest u nich mniejszy od 20%. Z tego powodu zaproponowano nazwanie tego MDS powolnie ewoluującą białaczką M2 [59].

U pacjentów z M2/t(8;21) występuje tendencja do tworzenia się pozaszpikowych guzów białaczkowych. Są to głównie ziarniniaki kwasochłonne (chloroma), położone w obrębie oczodołów i powodujące jednostronny wytrzeszcz gałki ocznej. Guzy mogą być również zlokalizowane nadtwardówkowo w odcinku piersiowym kręgosłupa oraz w obrębie jamy sutkowej kości skroniowej [54]. Powstawanie guzów białaczkowych (określanych obecnie jako mięsak granulocytowy) o tak nietypowej lokalizacji jest prawdopodobnie związane z ekspresją antygeny CD 56 (N-CAM = *neural cell-adhesion molecule*) na komórkach białaczkowych, stwierdzaną w co najmniej 63% przypadków, a być może również z występowaniem pewnych dodatkowych aberracji chromosomowych [30,54].

Obecność t(8;21) w o.b.s. M2 uważana jest za korzystny czynnik rokowniczy [59]. Większość (nawet do 100%) pacjentów z M2/t(8;21) osiąga całkowitą remisję choroby (CR) i ma długi czas przeżycia. Ze względu na dobre rokowanie mogą być oni leczeni jedynie kombinowaną chemioterapią i kwalifikowani do badań nad eksperymentalnym leczeniem według nowych protokołów intensyfikujących remisję, nie wymagają zaś transplantacji szpiku [58]. Fenaux zwrócił jednak uwagę na dużą częstość nawrotów choroby w ciągu pierwszego roku od momentu uzyskania CR, co podważa przekonanie, że t(8;21) u chorych z M2 ma zawsze charakter korzystnej rokowniczo zmiany cytogenetycznej. Uznał, iż u tej grupy chorych, zwłaszcza młodych powinno się stosować intensywną terapię konsolidującą remisję oraz allogeniczny przeszczep szpiku [13]. Niemniej jednak w większości dotychczasowych danych potwierdza się korzystny rokowniczo charakter t(8;21)[58,59].

Pojawienie się mięsaka granulocytowego jako pierwotnej lokalizacji choroby lub wznowy po uzyskanej wcześniej CR zmienia dobrą prognozę związaną z M2/t(8;21). Zastosowanie cytostatyków lub radioterapii doprowadza, co prawda, do szybkiego zmniejszenia się masy guza, nie zapobiega jednak wczesnym nawrotom, również w układzie krwiotwórczym. Uważa się, że w przyszłości duże znaczenie będzie miała identyfikacja podgrupy chorych z antygenem CD 56, którzy staną się kandydatami do leczenia dużymi dawkami arabinozydu cytozyny i następnie przeszczepem szpiku [13].

### t(15;17)(q22;q12-q21)

Translokacja t(15;17) jest specyficzna dla o.b. promielocytowej – M3 i w zależności od badanej populacji pacjentów stwierdzana jest u kilku do nawet 100% chorych, najczęściej między 20 a 40 rokiem życia [50]. Wykrywana jest w hiper- i hipogranularnej postaci M3, a także w promielocytowej postaci przełomu blastycznego przewlekłej białaczki szpikowej. Taki zakres występowania wskazuje na jej związek z zahamowaniem dojrzewania komórek linii mieloidalnej na poziomie promielocyta. W badaniach laboratoryjnych w M3/t(15;17) stwierdza się przy rozpoznaniu prawidłową leukocytozę, obniżony poziom Hb oraz małopłytkowość [58]. Dawniej uważano, że występowanie t(15;17) ogranicza się jedynie do o.b. powstałej *de novo*. Obecnie coraz częściej stwierdza się ją we wtórnej o.b.s. M3 związanej z leczeniem cytostatykami oddziałującymi na topoizomerazę II [44].

Punktami złamań chromosomów biorących udział w tej translokacji są 15q22 oraz 17q12–21 – w pobliżu którego zlokalizowano onkogen *c-erb A* oraz geny: granulocytowego czynnika wzrostu – G-CSF, mieloperoksydazy – MPO i receptora nerwowego czynnika wzrostu – NGF [22]. Początkowo przypuszczano, że za rozwój choroby jest odpowiedzialne złamanie w obrębie genu G-CSF, który indukuje różnicowanie i dojrzewanie linii mieloidalnej, nie wykazano jednak zmian sekwencji kodującej G-CSF w przebiegu t(15;17). Za zaburzoną regulację produkcji G-CSF mogłyby być odpowiedzialne ewentualne rearanżacje w obszarze przylegającym do sekwencji kodującej G-CSF [22].

Onkogen *c-erb A* również nie ulega rearanżacji, pozostając na chromosomie 17. Natomiast gen MPO jest translokowany z chromosomu 17 na 15, co pozwoliło na zlokalizowanie punktu złamania chromosomu 17 między genem MPO a onkogenem *c-erb A* [33].

Najnowsze badania molekularne wyjaśniły mechanizm rozwoju M3/t(15;17). W regionie 17q12 zlokalizowany jest gen *rara* (*Retinoic Acid Receptor Alpha*) kodujący łańcuch alfa zlokalizowanego w jądrze receptora kwasu retinowego (RA) [4,8]. W warunkach prawidłowych kwas retinowy indukuje różnicowanie mieloidalnych komórek prekursorowych przez aktywację receptorów retinoidowych, w tym także alfa [6]. W wyniku translokacji t(15;17) gen *rara* zostaje przeniesiony z chromosomu 17 w sąsiedztwo znajdującego się na chromosomie 15 genu *pml* kodującego czynnika transkrypcji [8]. Złamanie chromosomu 17 zawsze przerywa gen *rara* w drugim intronie, oddzielając od siebie domeny A i B receptora jądrowego, a pozostawiając nietknięte główne domeny odpowiedzialne za wiązanie z DNA i kwasem retinowym. Natomiast złamanie w obrębie genu *pml* może mieć różną lokalizację: bcr 1 (*break-point cluster region 1*) obejmuje intron 6 i ekson 7 (70% przypadków), bcr 2 – ekson 6 (10%), bcr 3 – intron 3, ekson 4 i część 5' intronu 4 (20%) [43].



Nie wiadomo jeszcze, czy różne punkty złamania *pml* mają różne znaczenie prognostyczne [12].

Gen fuzyjny *pml/rara* koduje białko, którego obecność zamiast prawidłowego receptora alfa oraz blokowanie przezeń drugiego, niezmienionego allelu *rara* sprawia, że komórki nie są stymulowane do dojrzewania przez prawidłowy poziom RA [57].

Duże dawki kwasu retinowego (*All Trans Retinoic Acid* = ATRA) indukują u chorych z t(15;17) remisję. Jest ona związana z aktywacją innych przedstawicieli rodziny RAR, np. RXR, lub z mechanizmem przełamania bloku spowodowanego przez białko fuzyjne [57]. Odpowiedzią na leczenie jest dojrzewanie klonu białaczkowego potwierdzone na podstawie nie tylko cech morfologicznych, cytochemicznych czy analizy immunofenotypowej, ale także zmniejszenia ilości nieprawidłowego RARA [23,57].

Chorzy z M3/t(15;17) mają wysoki odsetek odpowiedzi na leczenie i długi czas przeżycia. Równie dobrą odpowiedź na leczenie ATRA wykazują chorzy z wtórną M3/t(15;17), nawet jeśli jest skojarzona z zazwyczaj źle rokującymi aberracjami chromosomów 5 i 7 [19]. Część z nich umiera jednak w początkowym okresie choroby z powodu zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC). Dlatego uważa się, że podawany w niektórych pracach niski odsetek remisji zupełnych w M3/t(15;17) wynika z wczesnych zgonów z powodu krwawień podczas okresu indukcji, a nie z oporności na leczenie RA. Występuje ona tutaj rzadko, co wiąże się z niską ekspresją genu oporności wielolekowej – *mdr-1* w komórkach białaczkowych M3 [9]. W przypadkach komórek o.b.s. M3 opornych na RA stwierdzono *in vitro* korzystne działanie łącznego podawania ATRA i inhibitorów P-glikoproteiny będącej produktem *mdr-1* [26].

Leczenie samym RA może spowodować powikłania w postaci zespołu retinowego, wynikającego z gwałtownego dojrzewania komórek szeregu granulocytowego, a charakteryzującego się m.in. gorączką, naciekami płucnymi i niewydolnością oddechową [23]. Łączne leczenie dużymi dawkami RA i cytostatykami zapobiega jednocześnie dwóm powikłaniom – zespołowi retinowemu i DIC [11,47]. Zjawisko to można tłumaczyć faktem, że właśnie intensywne chemioterapie jest odpowiedzialna za występowanie DIC przez uwalnianie z niszczonego promielocytów czynników działających prokoagulacyjnie [23]. Zmniejszenie częstości występowania DIC u chorych leczonych ATRA zależy od jego bezpośredniego oddziaływania na białka biorące udział w hemostazie oraz od stymulacji dojrzewania klonu białaczkowego i w następstwie nasilenia apoptozy. Proces ten powoduje zmniejszenie liczby komórek białaczkowych, a więc tych, które mogłyby się rozpadać uwalniając czynniki prokoagulacyjne [11,38,47]. Wykazanie obecności nieprawidłowego genu RARA może być w przyszłości wykorzystywane jako marker choroby resztkowej u chorych z o.b.s. M3, co jest tym bardziej istotne, że transkrypty RARA są wy-

krywane u wszystkich chorych osiągających CR po zastosowaniu ATRA jako jedynej terapii [43,57].

W o.b.s. M3 rzadko występują formy wariantowe t(15;17). Komórki, w których występuje translokacja pomiędzy innym niż 15 chromosomem a 17, połączona z rearanżacją *rara*, nie różnicują się pod wpływem ATRA, co świadczy o specyficznym wpływie połączenia *pml/rara* na wiązanie i działanie RA [12,15]. Około 1/3 pacjentów z t(15;17) ma trisomię 8 jako dodatkową zmianę cytogenetyczną, rzadziej występuje delecja długich ramion chromosomu 7 – del(7q) lub izochromosom długich ramion 17 – i(17q) [22,50].

### **inv/del (16)(q22)**

Zmiany strukturalne chromosomu 16 występują głównie w postaci inwersji pericentrycznej lub delecji, rzadziej translokacji, z których najczęstsza jest t(16;16). Aberracje te przebiegają zawsze z zaangażowaniem prążka q22 [50]. W ostatnich latach ukazało się dużo doniesień na temat tzw. translokacji wariantowych, zachodzących między chromosomem 16 a innymi chromosomami, najczęściej 1, 3, 5, 8 [1,2,7,60]. W większości z nich punktem złamania jest 16q22. Badania przy pomocy techniki FISH pozwoliły na odkrycie, że translokacje wariantowe są w istocie translokacjami skojarzonymi z inv(16)(p13q22), wtórnymi w stosunku do niej, a ich punkty złamań w obrębie 16q22 leżą zawsze zewnętrznie w stosunku do punktu złamania biorącego udział w inwersji [60].

Aberracje 16q22 skojarzone są z o.b. mielomonocytową ze wzrostem odsetka eozynofilów w szpiku powyżej 5%. Eozynofile często wykazują morfologiczne i cytochemiczne nieprawidłowości, np. hiposegmentację jądra, obecność azurochłonnych ziarnistości, wzór chromatynowy charakterystyczny dla monocytów i pofałdowanie jądra. Ze względu na zaburzenia eozynocytopoezy ta postać o.b.s. M4 określana jest jako M4 Eo. Morfologiczne cechy komórek białaczkowych w o.b.s. M4Eo z obecnością wariantów translokacyjnych są takie same jak w "klasycznej" M4Eo' z inv/del(16) [1].

Aberracje 16q22 powodują zmiany strukturalne *locus mt* – rodziny genów metalotionein. Kodowana przez nie rodzina białek o niskiej masie cząsteczkowej jest odpowiedzialna za regulację szlaku metabolizmu metali i ochronę przeciwko toksyczności metali ciężkich. W prawidłowych i nieprawidłowych komórkach szpiku, zwłaszcza eozynofilach, lecz również w innych granulocytach oraz monocytach stwierdza się znaczną koncentrację cynku i cynkowych metaloenzymów. Rearanżacja *locus mt* może powodować zaburzenia w wiązaniu i magazynowaniu cynku, który odgrywa rolę w różnicowaniu linii granulocytów i monocytów [51].



Według najnowszych doniesień w wyniku inwersji  $\text{inv}(16)(\text{p}13\text{q}22)$ , która jest najczęstszą aberracją chromosomu 16 w M4Eo, gdyż sprzyja jej znaczna homologia sekwencji DNA długich i krótkich ramion chromosomu 16, dochodzi do fuzji dwóch genów; genu dla podjednostki beta czynnika transkrypcyjnego PEBP2 (gen *cbf beta* = *core binding factor*), którego produkt zwiększa zdolność wiązania DNA i aktywność transkrypcyjną AML 1, oraz genu dla łańcucha ciężkiego miozyny mięśni gładkich (*myh 11*) [7,35,36,42]. Transformacja nowotworowa zależna od fuzji *cbf B/myh 11* wynika, przynajmniej częściowo, z bezpośredniego hamowania działania AML 1 [16,42]. Nie wiadomo jeszcze, czy w wyniku  $\text{del}(16)(\text{q}22)$  również powstają rearanżacje CBF beta.

Jako wtórne aberracje towarzyszące zmianom 16q22 często występują trisomie 8 i 22 [48,50].

Chorzy z M4Eo/ $\text{inv}(16)$  często mają wysoką leukocytozę, a w badaniu fizykalnym stwierdza się hepato- i splenomegalie. W wyniku standardowej chemioterapii uzyskuje się u nich najwyższy wśród opisywanych odsetek CR. Czasami jednak później następuje zajęcie OUN przez masy białaczkowe. W niektórych przypadkach również przy rozpoznaniu stwierdza się komórki białaczkowe w płynie mózgowo-rdzeniowym mimo braku objawów neurologicznych. Z tego powodu profilaktycznie podaje się cytostatyki dokanałowo albo dożylnie w dawkach zapewniających osiągnięcie wysokiego stężenia w OUN, a także naświetla się OUN [48,50].

### Rearanżacje w obrębie długich ramion chromosomu 11 (11q)

Najczęstszymi aberracjami w obrębie 11q są translokacje, występujące głównie w o.b.s. o typie monocytowym – M5. Aberracje 11q, różnią się od grupy tzw. stałych translokacji (np.  $\text{t}(8;21)$ ), w których stałe są punkty złamania oraz partner chromosomowy translokacji. Punkt złamania 11q jest zmienny; najczęściej jest nim 11q23, rzadziej q13 lub q14. W translokacjach z 11q23 uczestniczą najczęściej następujące punkty złamań: 6q27, 9p22, 10p12, 17q21, 19p13 [3].

W ponad 80% przypadków rearanżacji 11q w o.b.s. M5 *de novo* punktem złamania jest 11q23. Wtórny o.b.s. M5, głównie związanym z leczeniem cytostatykami działającymi na topoiomerazę II, także towarzyszą rearanżacje 11q23, najczęściej  $\text{del}(11)(\text{q}23)$  lub  $\text{t}(9;11)(\text{p}22;\text{q}23)$  [46]. W związku z tym aberracje 11q23 traktuje się jako charakterystyczne dla o.b.s. M5, zwłaszcza M5a (M5a/ $\text{t}(11\text{q})$  wg MIC), choć złamania w punkcie 11q23 i translokacje z ponad 25 różnymi partnerami chromosomowymi obserwowano w różnych innych nowotworach hematologicznych [3,50].

Rearanżacje 11q23 wykazują nietypowy rozkład w zależności od wieku pacjentów, z przewagą występowania w wieku dziecięcym. W białaczkach noworodkowych są najczęstszymi aberracjami, być może z powodu skojarzenia ich z najczęściej spotykanymi w okresie noworodkowym podtypami o.b. [49].

Ze zmianami 11q23 skojarzone jest złe rokowanie. Co prawda odsetek osiągniętych CR waha się od 71 do 80%, ale czas przeżycia pacjentów jest krótki (3–19 miesięcy). Lepsze rokowanie związane jest jedynie z translokacją t(9;11) u dzieci [3,24].

W regionie 11q23 zlokalizowane są onkogeny: *ets-1*, *mll* (*myeloid/lymphoid leukemia gene*) oraz miejsca łamliwe FRA 11B i FRA 11 G [51]. Aberracjom 11q23 towarzyszą rearanżacje kodującego czynnika transkrypcyjnego genu *mll*, które można już oceniać metodami genetyki molekularnej, np. FISH [3,25,27]. Ma to duże znaczenie w przypadkach, gdy rearanżacja wykrywana jest pomimo prawidłowego kariotypu. Mimo braku zmian cytogenetycznych takich pacjentów kwalifikuje się do grupy o gorszym rokowaniu [5,52].

Badania molekularne ostatnich lat wykazały, że większość delecji terminalnych 11q23 jest submikroskopowymi translokacjami. Translokacje z 11q23 przebiegają prawie zawsze z zaangażowaniem genu *mll* oraz wielu zróżnicowanych strukturalnie i funkcjonalnie genów. Produkt fuzji *mll* z innym genem bądź neutralizuje działanie prawidłowego MLL, bądź działa jako nowy czynnik transkrypcji [3].

Immunofenotypowo stwierdza się często ekspresję antygenów linii mieloidalnej i limfoidalnej. Te przypadki są klasyfikowane jako białaczka wieloliniowa [24]. Translokacje obejmujące 11q23 są znajdowane także w T-ALL [24,50]. Wykrywanie ich, w o.b. zarówno szpikowych, jak i limfatycznych, świadczy, że rearanżacja genu *mll* prawdopodobnie dotyczy komórek macierzystych szpiku [5].

### t(6;9)(p23;q34)

Translokacja ta pojawia się w 1% przypadków o.b.s. *de novo*. Z reguły występuje w przebiegu o.b.s. M2 lub M4, ale spotykana jest też w innych typach nowotworów hematologicznych, co świadczy, że powstaje na poziomie komórki multipotencjalnej [34]. Występuje z reguły jako jedyna aberracja, co podkreśla jej rolę w procesie leukemogenezy. Sporadycznie pojawiające się dodatkowe aberracje lub ewolucja kariotypu nie mają wpływu na najczęściej złą odpowiedź na leczenie pacjentów z t(6;9) [50].

t(6;9) skojarzona jest z bazofilią w szpiku oraz młodym wiekiem chorych (średnio 28 lat). U około 20% pacjentów z tą translokacją o.b.s. rozwija się na podłożu MDS, co sugeruje związek tej aberracji z poprzednim narażeniem na działanie czynników mutagennych [34,50]. Spośród dotychczas opisanych przypadków o.b.s. z t(6;9) tylko w 36% stwierdzono bazofilię, zawsze w przypadkach z MDS. Sugeruje się więc, że bazofilia może być związana raczej z mielodysplazją niż z obecnością t(6;9) [34].

W wyniku t(6;9) dochodzi do fuzji genów; *can* (obecnie określanego jako *nup 214* – gen nukleoporyny 214) – zlokalizowanego w 9q34 i *dek* – zlokalizowanego w

6p23 [56]. Gen fuzyjny powstały z połączenia N-końcowej części genu *dek* i C-końcowej genu *nup 214* koduje białko zlokalizowane głównie w obrębie jądra komórkowego. Natomiast prawidłowy produkt *nup 214* jest zlokalizowany po cytoplazmatycznej stronie kompleksu nukleoporyn (*nuclear pore complex*), który ułatwia wybiórczy dwukierunkowy transport białek i RNA między jądrem a cytoplazmą. Prawdopodobnie, oprócz zmienionej funkcji genu fuzyjnego, również jego zmieniona lokalizacja jest odpowiedzialna za zmianę cech biologicznych komórek z t(6;9) [14,29].

### **inv/t(3)(q21)(q26)**

Inwersja *inv(3)(q21q26)* oraz translokacja *t(3;3)(q21;q26)* mogą być związane z różnymi typami o.b.s. *de novo* lub rozwijających się po MDS, zwłaszcza M1, M2, M4, M7. Pacjenci, których komórki białaczkowe cechują się tymi aberracjami, mają względną lub bezwzględną nadpłytkowość z obecnością nieprawidłowych megakariocytów, najczęściej mikromegakariocytów. Innymi aberracjami długiego ramienia chromosomu 3 (3q) są warianty translokacyjne między 3q21 albo 3q26 a innymi, niż 3, chromosomami [21,50].

Mechanizm nadpłytkowości w białaczkach z aberracjami 3q21 i 3q26 nie jest jeszcze poznany. Może on być związany z ewentualną rearanzacją genu transferyny zlokalizowanego w 3q21 lub genu dla receptorów transferyny zlokalizowanego w 3q26 [24]. Rearanzacje 3q21 i 3q26 są związane z opornością na leczenie i małym odsetkiem CR [12]. Natomiast insercje lub duplikacje (3)(q21q26) tworzą odrębną, heterogenną cytogenetycznie podgrupę, której skoja rzenia z klinicznymi i hematologicznymi cechami choroby wymagają jeszcze dalszej analizy, w zależności od punktów złamań wbudowanego lub podwojonego fragmentu chromosomów [21].

Rola badań cytogenetycznych, w połączeniu lub bez badań molekularnych, w rozpoznawaniu oraz prognozowaniu przebiegu o.b.s. jest obecnie coraz szerzej uznawana [28]. Klasyfikacja aberracji chromosomowych jest metodą wystandaryzowaną i dostępną kontroli jakościowej [37,45]. Ze względu na znaczenie rokownicze zmian cytogenetycznych wykrywanych w o.b.s. bardzo ważne jest jak najszybsze uzyskanie wyniku badania cytogenetycznego, co pozwala na podjęcie odpowiednich decyzji terapeutycznych. Mimo licznych zastosowań klinicznych cytogenetyka ostrych białaczek jest jeszcze nauką stosunkowo młodą. Ciągłe dochodzi do identyfikacji nowych aberracji chromosomowych i nowych jednostek hematologiczno-klinicznych z nimi związanych. Intensywnie rozwijające się metody molekularne pozwalają na wyjaśnienie molekularnego podłoża wielu aberracji chromosomowych, a co za tym idzie – na przynajmniej częściowe wyjaśnienie etiopatogenezy białaczek.



## LITERATURA

- [1] BERGER R, DERRŹ J, LE CONIAT M, HEBERT J, ROMANA S, JONVEAUX P. Inversion-associated translocations in acute myelomonocytic leukemia with eosinophilia. *Gene Chromosome Cancer* 1995; **12**: 58–62.
- [2] BERGER R, DOMBRET H. New variant translocation in acute myelomonocytic leukemia with bone marrow eosinophilia. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **58**: 204–205.
- [3] BERNARD OA, BERGER R. Molecular basis of 11q23 rearrangements in hematopoietic malignant proliferations. *Gene Chromosome Cancer* 1995, **13**, 75–85.
- [4] BORROW J, GODDARD AD, SHEER D, SOLOMON E. Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science* 1990; **249**: 1577–1580.
- [5] CALIGIURI MA, SCHICHMAN SA, STROUT MP, MRÓZEK K, BAER MR, FRANKEL SR, BARCOS M, HERZIG GP, CROCE CM, BLOOMFIELD CD. Molecular rearrangement of the MLL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations. *Cancer Res* 1994; **54**: 370–373.
- [6] COLLINS SJ, ROBERTSON KA, MUELLER L. Retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells is mediated directly through the retinoic acid receptor (RAR- $\alpha$ ). *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 2154–2163.
- [7] DAUVERSE JG, JUMELET EA, WESSELS JW, SARIS JJ, HAGEMEIJER A, BEVERSTOCK GC, VAN OMMEN JB, BREUNING MH. Extensive cross-homology between the long and the short arm of chromosome 16 may explain leukemic inversions and translocations. *Blood* 1992; **79**: 1299–1304.
- [8] DE THE H, CHOMIENNE C, LANOTTE M, DEGOS L, DEJEAN A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 1990; **347**: 558–561.
- [9] DRACH D, ZHAO S, DRACH J, ANDREEFF M. Low incidence of MDR 1 expression in acute promyelocytic leukemia. *Br J Haematol* 1995; **90**: 369–372
- [10] ERICKSON PF, ROBINSON M, OWENS G, DRABKIN HA. The ETO portion of acute myeloid leukemia t(8;21) fusion transcript encodes a highly evolutionary conserved putative transcription factor. *Cancer Res* 1994; **54**: 1782–1786.
- [11] FENAUX P, CHASTANG C, CHOMIENNE C, DEGOS L - for the European APL Group. Tretinoin with chemotherapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Lancet* 1994; **343**: 1033–1036.
- [12] FENAUX P, CHOMIENNE C. Biology and treatment of acute promyelocytic leukemia. *Current Opinions Oncol* 1996; **8**: 3–12.
- [13] FENAUX P, LAI JL, PREUDHOMME C, JOUET JP, DEMINATTI H, BAUTERS F. Is translocation (8;21) a "favourable" cytogenetic rearrangement in acute myeloid leukemia?" *Nouv Rev Fr Hematol* 1990; **32**: 179–182.
- [14] FORNEROD M. Relocation of the carboxyterminal part of CAN from the nuclear envelope to the nucleus as a result of leukemia-specific chromosome rearrangements. *Oncogene* 1995; **10**: 1739–1748.
- [15] GUIDEZ F, HUANG W, TONG JH, DUBOIS C, BALITRAND N, WAXMAN S, MICHAUX JL, MARTIAT P, DEGOS L, CHEN Z, CHOMIENNE C. Poor response to all-trans retinoic acid therapy in a t(11;17) PLZF-RARA patient. *Leukemia* 1994; **8**: 312–317.
- [16] HAJRA A, LIU PP, SPECK NA, COLLINS FS. Overexpression of core-binding factor (CBF) reverses cellular transformation by the CBF beta-smooth muscle myosin heavy chain chimeric oncoprotein. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 4980–4989.
- [17] HAUS O. Cytogenetyka przewlekłej białaczki szpikowej. I. Przewlekła białaczka szpikowa Ph-dodatnia [Ph(+)/CML]. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 169–182.

- [18]HEIM S, MITELMAN F. *Cancer Cytogenetics*. 2nd ed. New York: Willey-Liss 1995.
- [19]HOFFMANN L, MOLLER P, PEDERSEN-BJERGAARD J, WAAGE A, PEDERSEN M, HIRSCH F. Therapy-related acute promyelocytic leukemia with t(15;17)(q22;q12) following chemotherapy with drugs targeting DNA topoisomerase II. A report of two cases and a review of the literature. *Ann Oncol* 1995; **6**: 781–788.
- [20]JOHANSSON B, MERTENS F, MITELMAN F. Geographic heterogeneity of neoplasia-associated chromosome aberrations. *Gene Chromosome Cancer* 1991; **3**: 1–7.
- [21]JOTTERAND BELLOMO M, PARLIER V, MUHLEMATTER D, GROB JP, BERIS PH. Three new cases of chromosome 3 rearrangement in bands q21 and q26 with abnormal thrombopoiesis bring further evidence to the existence of a 3q21q26. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **59**: 138–160.
- [22]KADAM PR, MERCHANT AA, ADVANI SH. Cytogenetic findings in patients with acute promyelocytic leukemia and a case of CML blast crisis with promyelocytic proliferation. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; **50**: 109–117.
- [23]KANAMARU A, TAKEMOTO Y, TANIMOTO M, MURAKAMI H, ASOU N, KOBAYASHI T, KURIYAMA K, OHMOTO E, SAKAMAKI H, TSUBAKI K, HI-RAOKA A, YAMADA O, HAKUMEI O, SAITO K, MATSUDA S, MINATO K, UEDA T, OHNO R and The Japan Leukemia Study Group. All-transretinoic acid for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1995; **85**: 1202–1206.
- [24]KANEKO Y. Chromosome abnormalities, clinical features and molecular mechanisms in leukemia. *Jpn Soc Path* 1991; **4**: 713–719.
- [25]KATOH M, NAKAGAWA Y, YAWATA T, KUMANO S, KOBAYASHI E, KURIMASA A, KUGOH H, OSHIMURA M. Cosmids and transcribed sequences from chromosome 11q23. *Jpn J Human Genet* 1995; **40**: 307–317.
- [26]KIZAKI M, UENO H, YAMAZOE Y, SHIMADA M, TAKAYAMAN, MUTO A, MATSUSHITA H, NAKAJIMA H, MORIKAWA M, KOEFFLER P, IKEDA Y. Mechanisms of retinoid resistance in leukemic cells: possible role of cytochrome P 450 and P-glycoprotein. *Blood* 1996; **87**: 725–733.
- [27]KOBAYASHI H, EPISONA RIII, FERNAND AA, BOGY C, DIAZ MO, LE BEAU MM, ROWLEY JD. Analyses of deletions of the long arm of chromosome 11 in hematologic malignancies with FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; **8**: 246–252.
- [28]KOWALCZYK JR. Cytogenetyka ostrzych białaczek. *Nowotwory* 1994, **44**, supl. 1: 5–10.
- [29]KRAEMER D, WOZNIAK RW, BLOBEL G, RADU A. The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1519–1523.
- [30]KRISHNAN K, ROSS CW, ADAMS PT, PEREIRA A, ROTH MS. Neural cell-adhesion molecule (CD 56)-positive, t(8;21) acute myeloid leukemia (AML, M-2) and granulocytic sarcoma. *Ann Hematol* 1994; **69**: 321–323.
- [31]KUSEC R, LACZIKA K, KNOBL P, FRIEDL J, GREINIX H, KALHS P, LINKESCH W, SCHWARZINGER I, MITTERBAUER G, PURTSCHER B, HAAS OA, LECHNER K, JAEGER U. PCR AML1/ETO fusion mRNA can be detected in remission blood samples of all patients with t(8;21) acute myeloid leukemia after chemotherapy or autologous bone marrow transplantation. *Leukemia* 1994; **8**: 735–739.
- [32]LI Y-S, LE BEAU MM, MICK R, ROWLEY JD. The proportion of abnormal karyotypes in acute leukemia samples related to method of preparation. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; **52**: 93–100.
- [33]LIANG JC, CHANG KS, SCHROEDER WT, FREIREICH EJ, STASS SA, TRUJILLO JM. The myeloperoxidase gene is translocated from chromosome 17 to 15 in a patient with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; **30**: 103–107.



- [34] LILLINGTON DM, MACCALLUM PK, LISTER TA, GIBBONS B. Translocation t(6;9)(p23;q34) in acute myeloid leukemia without myelodysplasia or basophilia: two cases and a view of literature. *Leukemia* 1993; **7**: 527–531.
- [35] LIU P, HAJNA A, WIJMENGA C, COLLINS F. Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. *Blood* 1995; **85**: 2289–2302.
- [36] LIU P, TARLE SA, HAJRA A, CLAXTON DF, MARLTON P, FREEDMAN M, SICILIANO MJ, COLLINS FS. Fusion between transcription factor CBFbeta/PEBP2beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 1993; **261**: 1041–1044.
- [37] MACINTYRE E, FLANDRIN G. Biological classification of acute leukemias: federalisation or centralisation? *Leukemia* 1995; **9**: 2152–2154.
- [38] MARTIN SJ, BRADLEY JG, COTTER TG. HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clin Exp Immunol* 1990; **79**: 448–451.
- [39] MEYERS S, LENNY N, HIEBERT SW. The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B - dependent transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 1974–1982.
- [40] MINAMIHISAMATSU M, ISHIKARA T. Translocation (8;21) and its variants in acute nonlymphocytic leukemia. The relative importance of chromosomes 8 and 21 to the genesis of the disease. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; **33**: 161–173.
- [41] NUCIFORA G, ROWLEY JD. The AML1 and ETO genes in acute myeloid leukemia with a t(8;21). *Leukemia Lymphoma* 1994; **14**: 353–362.
- [42] OKUDA T, VAN DEURSEN J, HIEBERT SW, GROSVELD G, DOWNING JR. AML 1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal liver hematopoiesis. *Cell* 1996; **84**: 321–330.
- [43] PANDOLFI PP, ALCALAY M, FAGIOLI M, ZANGRILI D, MENCARELLI A, DIVERIO D, BIONDI A, LO COCO F, RAMBALDI A, GRIGNANI F, ROCHETTE-EGLY C, GAUB M-P, CHAMBON P, PELICCI PG. Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RARA transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RARA isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J* 1992; **11**: 1397–1407.
- [44] PEDERSEN-BJERGAARD J. Acute promyelocytic leukemia with t(15;17) following inhibition of DNA topoisomerase II. *Ann Oncol* 1995; **6**: 751–753.
- [45] PUI C-H, CAMPANA D, CRIST WM. Toward a clinically useful classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995; **9**: 2154–2157.
- [46] PUI C-H, RELLING MV, RIVERA GK, HANCOCK ML, RAIMONDI SC, HESLOP HE, SANTANA VM, RIBEIRO RC, SANLUND JT, MAHMOUD HH, EVANS WE, CRIST WM, KRANCE RA. Epipodophyllotoxin - related acute myeloid leukemia: a study of 35 cases. *Leukemia* 1995; **9**: 1990–1996.
- [47] SAITO T, KOYOMAT T, NAGATA K, KAMIYAMA R, HIROSAWA S. Anticoagulant effects of retinoic acids on leukemia cells. *Blood* 1996; **87**: 657–665.
- [48] SANDBERG AA. The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia. 2nd ed. [wyd] Elsevier, New York, 1990.
- [49] SANSONE R, NEGRI D. Cytogenetic features of neonatal leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **63**: 56–61.
- [50] Second MIC Cooperative Study Group: Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukemias. *Br J Haematol* 1988; **68**: 487–494.
- [51] SOLE F, CABALLIN MR, COLL MD, WOESSNER S, BESSES C, SANS-SABRAFEN J, EGOZCUE J. Cytogenetic studies in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; **60**: 117–124.
- [52] SORENSEN PH, CHEN CS, SMITH FO, ARTHUR DC, DORNER PH, BERNSTEIN JD, KORSMEYER SJ, HAMMOND GD, KERSEY JH. Molecular rearrangements of the MLL gene are present in most cases of infant acute myeloid leukemia and are strongly correlated with monocytic or myelomonocytic phenotypes. *Am Soc Clin Invest* 1994; **93**: 429–437.

- [53]SUCIU S, KUSE R, WEH HJ, HOSSFELD DK. Results of chromosome studies and their relation to morphology, course and prognosis in 120 patients with *de novo* myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; **44**: 15–26.
- [54]TALLMAN MS, HAKIMIAN D, SHAW JM, LISSNER GS, RUSSELL EJ, VARIAKOJIS D. Granulocytic sarcoma is associated with the 8;21 translocation in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 1993; **11**: 690–697.
- [55]TOUW I, DONATH K, POWWELS U, van BUITENEN C, SCHIPPER P, SANTINI V, HAGEMEIJER A, LOWENBERG B, DELWEL R. Acute myeloid leukemias with chromosomal abnormalities involving the 21q22 region identified by their *in vitro* responsiveness to interleukin-5. *Leukemia* 1991; **5**: 687–692.
- [56]VON LINDERN M, FORNEROD M, VAN BAAL S, JAEGLE M, DE WIT T, BUIJS A. The translocation (6;9) associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes *dek* and *can*, and the expression of a chimeric leukemia-specific *dek-can* mRNA. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 1687–1697.
- [57]WARRELL RP, FRANKEL SR, MILLER WH, SCHEINBERG DA, ITRI IM, HITTELMAN WN, VYAS R, ANDREEFF M, TAFURI A, JAKUBOWSKI A, GABRILOVE J, GORDON MS, DMITROVSKY E. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans retinoic acid). *N Engl J Med* 1991; **324**: 1385–1393.
- [58]WEH HJ, KUSE R, HOFFMANN R, SEEGER D, SUCIU S, KABISH H, RITTER J, HOSSFELD DK. Prognostic significance of chromosome analysis in *de novo* acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 1988; **56**: 19–26.
- [59]YAMASAKI H, ERA T, ASOU N, SANADA I, MATUTES E, YAMAGUCHI K, TAKATSUKI K. High degree of myeloid differentiation and granulocytosis is associated with t(8;21) smoldering leukemia. *Leukemia* 1995; **9**: 1147–1153.
- [60]YIP M-Y, SHARMA P, WHITE L. Acute myelomonocytic leukemia with bone marrow eosinophilia and inv(16)(p13q22), t(1;16)(q32;q22). *Cancer Genet Cytogenet* 1991; **51**: 235–238.

Redaktor prowadzący: Maciej Zabel

Otrzymano: 21 sierpnia 1996 r.

Przyjęto: 30 stycznia 1997 r.

Adres autora: Olga Haus, Zakład Genetyki AM  
450-368 Wrocław, ul. Marcinkowskiego 1

## ZASTOSOWANIE PROTOPLASTÓW BURAKA CUKROWEGO (*BETA VULGARIS* L.) W MANIPULACJACH GENETYCZNYCH\*

### APPLICATION OF SUGAR BEET (*BETA VULGARIS* L.) PROTOPLASTS IN GENETIC MANIPULATIONS

Aleksandra NIKLAS\*\*

Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Korzeniowych,  
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Bydgoszcz

*Streszczenie:* Burak cukrowy (*Beta vulgaris* L.) jest najważniejszym pod względem ekonomicznym gatunkiem w obrębie rodziny *Chenopodiaceae*. Doskonalenie materiałów hodowlanych zachodzi przy wykorzystaniu metod tradycyjnego krzyżowania i oceny potomstwa wymagających znacznego nakładu pracy i czasu. Rozwój metod biotechnologicznych, szczególnie szybki w ostatnich kilku latach, stwarza nowe możliwości zwiększenia zmienności genetycznej tego gatunku. Znaczącą rolę wśród technik *in vitro* odgrywa kultura protoplastów, stanowiąca jeden z ważnych etapów szeroko pojętej modyfikacji genetycznej. Podstawowe problemy, których rozwiązanie staje się możliwe dzięki wykorzystaniu techniki protoplastów w programach hodowlanych, obejmują: (i) wprowadzenie do *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* nowego typu męskiej sterility z dzikiego gatunku *Beta vulgaris* ssp. *maritima*, (ii) indukcję roślin typu O, niezbędnych do odtwarzania linii cytoplazmatycznie męskosterylnych (CMS), a także (iii) otrzymywanie roślin transgenicznych odpornych na choroby i herbicydy. Realizacja wymienionych zamierzeń wymaga zatem doskonalenia procedur kultury i regeneracji protoplastów, jak również opracowania protokołów hybrydyzacji somatycznej w obrębie rodzaju *Beta*.

*Słowa kluczowe:* burak cukrowy, protoplast, hybrydyzacja somatyczna, transformacja genetyczna.

*Summary:* Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) is the most important economic species of the family *Chenopodiaceae*. The progress in sugar beet breeding is achieved by traditional crossing and testing of the progeny

\*Praca wykonana w ramach grantu KBN 5 S 301 018 07.

\*\*A. Niklas jest doktorantką Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin. Adres stały: Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Akademia Techniczno-Rolnicza, ul. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz

which is troublesome and time-consuming. The spectacular development of biotechnological methods during the last several years creates new possibilities to increase the genetic base of this species. Protoplast culture has a special place among *in vitro* techniques predestinated for genetic manipulations. In the case of sugar beet, some problems may be solved due to the involvement of protoplast technique into breeding programmes: (i) the introduction of male sterility traits from wild species *Beta vulgaris* ssp. *maritima* to *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, (ii) the induction new O type plants necessary for the reproduction of cytoplasmic male sterile ones (CMS), and (iii) obtaining of transformants resistant to diseases and herbicides. These tasks require the improvement of protocols for protoplast culture and regeneration, as well as the elaboration of procedure for somatic hybridization within the genus *Beta*.

*Key words:* sugar beet, protoplast, somatic hybridization, genetic transformation.

## WSTĘP

Burak cukrowy jest najważniejszym gospodarczo gatunkiem w obrębie rodziny *Chenopodiaceae*. Obok trzciny cukrowej, stanowi podstawowe źródło światowej produkcji cukru, który wykorzystywany jest do konsumpcji oraz jako surowiec w przemyśle chemicznym, farmaceutycznym i fermentacyjnym. Liście, wysłodki buraczane i melasa stanowią wartościowy pokarm dla zwierząt [2]. Ze względu na dwuletni cykl uprawy hodowla buraka cukrowego jest czasochłonna, ponadto wymaga dużych obszarów uprawowych. Wiele użytkowych cech tego gatunku, w tym plon korzeni i liści, zawartość cukru oraz składników melasotwórczych uwarunkowanych jest poligenicznie, co znacznie utrudnia hodowlę nowych odmian metodami konwencjonalnymi. Szybki rozwój metod biotechnologicznych, a w szczególności biologii i genetyki molekularnej, poszerza możliwości doskonalenia buraka cukrowego w wyniku manipulacji *in vitro* na poziomie poszczególnych organów, tkanek czy protoplastów.

Hodowla twórcza buraka cukrowego ma na celu połączenie w nowej odmianie pozytywnych cech form rodzicielskich, na przykład wysokiej plenności, dużej zawartości cukru i odporności na choroby. W tradycyjnym rolnictwie celowi temu służą metody hodowlane, takie jak krzyżowanie czy indukowanie mutacji, a następnie wyszukiwanie w ich potomstwie roślin o pożądanym genotypach. Konsekwencją takiego postępowania jest rozszerzenie zmienności genetycznej materiału hodowlanego. Wiele cech ważnych rolniczo, w tym cytoplazmatyczna męska sterylność, odporność na patogeny, herbicydy czy toksyny, występuje u dzikich gatunków [11, 74]. Trudności w przeniesieniu tych cech do form uprawnych wynikają z działania różnorodnych mechanizmów uniemożliwiających krzyżowanie form filogenetycznie odległych [21]. Niektóre bariery biologiczne udaje się jednak przełamać w wyniku pozageneratywnego przenoszenia genów. Użycie do tego celu komórek somatycznych powoduje, że pominięte zostają etapy rozmnażania płciowego, w których dochodzi do ujawnienia się niezgodności prezygotycznej i postzygotycznej [22, 41, 43, 76, 77]. Ponadto możliwe staje się nie tylko łączenie całych genomów,



ale również ich fragmentów. Opracowanie i doskonalenie metod przenoszenia poszczególnych chromosomów, wprowadzania pojedynczych genów lub fuzjowania genomu jądrowego jednego gatunku z genomem organelli (cytoplazmą) drugiego jest w tej chwili priorytetowym zadaniem w wielu laboratoriach biotechnologicznych.

Technikę kultury i modyfikacji genetycznej protoplastów próbuje się zastosować w celu wprowadzenia do *B. vulgaris* ssp. *vulgaris* nowego typu męskiej sterility z dzikiego gatunku *Beta vulgaris* ssp. *maritima* [41, 49], indukowania linii dopełniających typu O [29], a także produkcji roślin transgenicznych odpornych na choroby, zwłaszcza rizomanię [28, 36], i herbicydy [28, 73].

## SOMATYCZNA HYBRYDYZACJA W OBRĘBIE RODZAJU *BETA*

Postęp hodowlany w uzyskiwaniu mieszańców somatycznych dotyczy wielu gatunków roślin, głównie w obrębie rodziny *Solanaceae*, *Papilionaceae*, *Cruciferae*, *Cucurbitaceae* oraz rodzaju *Citrus* [1, 16, 17, 48, 50, 59, 61, 63]. Wyniki doświadczeń stwarzają podstawy do wykorzystania techniki protoplastów w celu tworzenia mieszańców somatycznych buraka cukrowego.

### Wprowadzenie mtDNA z *Beta vulgaris* ssp. *maritima* do *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*

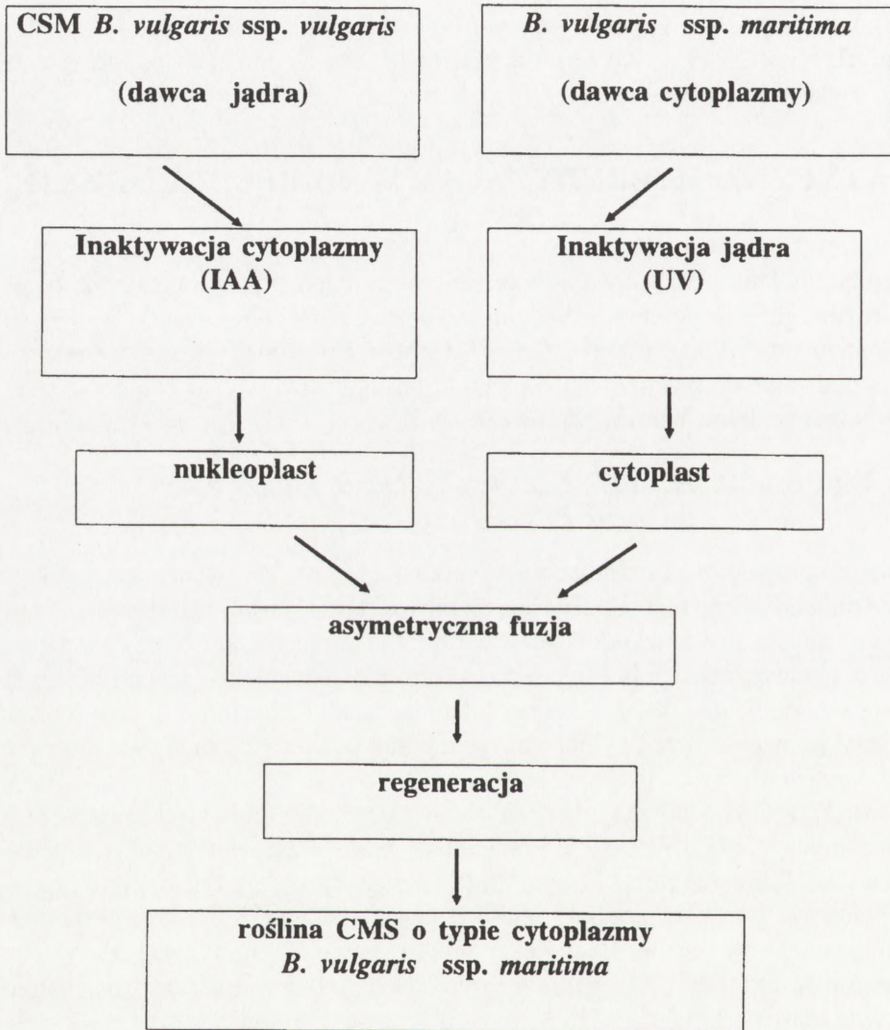
Odmiany uprawne, uszlachetniane w wyniku zabiegów hodowlanych, charakteryzują się niekiedy obniżoną odpornością na niekorzystne warunki środowiska, częściej atakowane są przez szkodniki czy bardziej podatne na choroby. Zawężenie zmienności genetycznej w odniesieniu do określonych cech użytkowych może być przyczyną epidemii, takich jak: zaraza ziemniaczana, wirus mozaiki trzciny cukrowej, czy porażenie heterozyjnej kukurydzy zawierającej cytoplazmę T, przez *Helminthosporium maydis* [41].

Hodowla heterozyjna buraka opiera się na wykorzystaniu linii cytoplazmatycznie męskosterylnych (CMS). Wszystkie komponenty CMS mają wspólne pochodzenie od form wyodrębnionych przez Owena [53] i charakteryzują się tym samym typem sterylnej plazmy. Wynika to z braku zmienności w obrębie genów mitochondrialnych warunkujących powstawanie nieplodnego pyłku. Istnieje zatem konieczność poszukiwania nowych źródeł CMS, zwłaszcza wśród form dzikich tego gatunku. Analiza restrykcyjna mitochondrialnego DNA (mtDNA), w obrębie rodzaju *Beta*, wykazała istnienie innego typu męskiej sterility u buraka nadmorskiego *Beta vulgaris* ssp. *maritima* [27, 41]. Podgatunek ten krzyżuje się z *B. vulgaris* ssp. *vulgaris*, dlatego podjęto próbę przeniesienia męskiej sterility do genomu formy uprawnej buraka cukrowego drogą tradycyjnego krzyżowania. Wymaga to od 5 do 8 krzyżowań



introgressywnych i nie ma całkowitej pewności wyeliminowania niepożądanych genów jądrowych pochodzących z *B. vulgaris* ssp. *maritima* [12].

Rozwiązaniem może być metoda asymetrycznej fuzji protoplastów, umożliwiającą bezpośrednie wprowadzenie mtDNA z dzikiej formy buraka nadmorskiego do męskosterylnych linii buraka cukrowego obecnie uprawianych [41] (rys. 1). Taką pro-



Rys. 1. Wprowadzanie mtDNA z *B. vulgaris* ssp. *maritima* do *B. vulgaris* ssp. *vulgaris*:  
 CMS – cytoplazmatyczna męska sterylność, mtDNA – mitochondrialny DNA, IAA – kwas jodoocetowy,  
 UV – promieniowanie ultrafioletowe

cedurę zastosowano z powodzeniem dla niektórych gatunków w obrębie rodziny *Cruciferae*, *Solanaceae*, *Gramineae* i otrzymano nowe linie CMS [37, 38, 58, 69, 70, 78].

### **Indukowanie linii typu O *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris***

Poszukiwanie linii dopełniających w populacjach jednonasiennych zapylaczy jest kłopotliwe i czasochłonne. Tradycyjna selekcja linii O wymaga licznych, indywidualnych krzyżowań roślin sterylnych z zapylaczami i analizy uzyskanego potomstwa. Trwa to 6–8 lat i jest bardzo kosztownym elementem hodowli buraka. Tworzenie linii dopełniających może przebiegać także w wyniku fuzji asymetrycznej cytoplastu formy płodnej z nukleoplastem linii męskosterylnej (rys. 2), a cykl ten może trwać około jednego roku.

### **Inaktywacja jądrowego i mitochondrialnego DNA protoplastów buraka cukrowego**

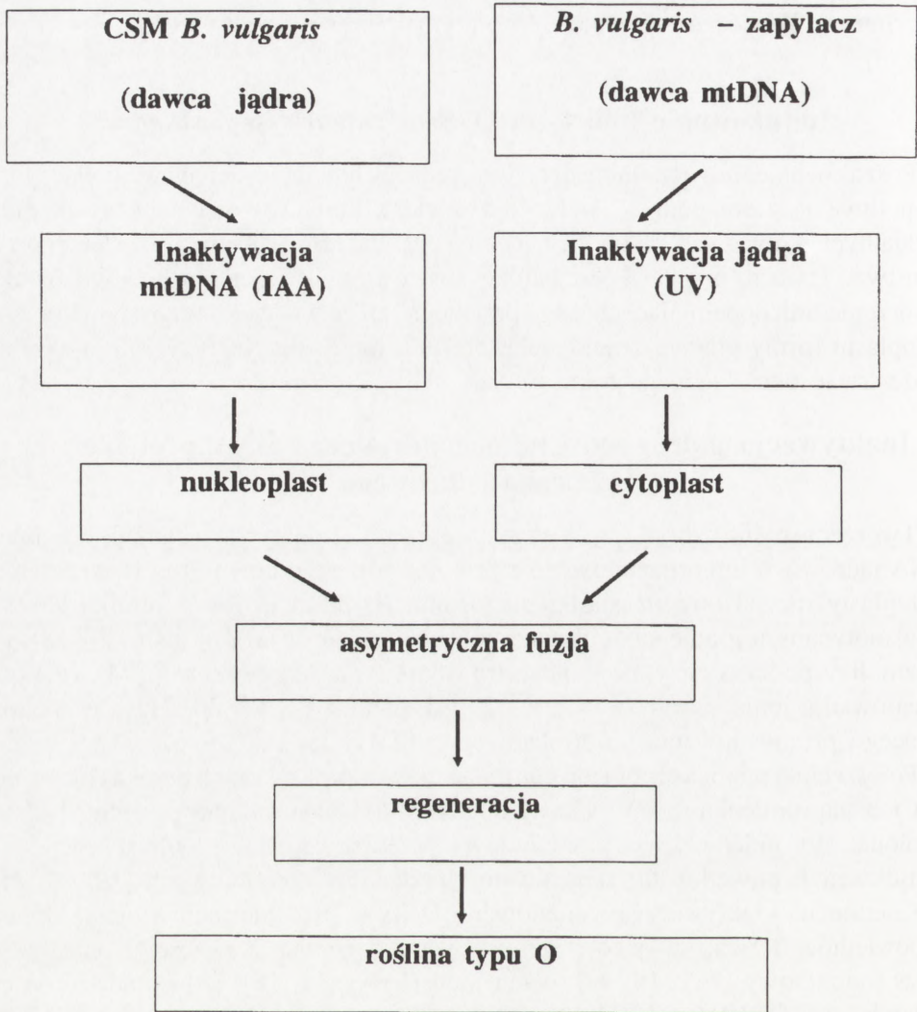
Tworzenie roślin cybrydowych wymaga uprzedniej inaktywacji bądź też eliminacji DNA jądrowego lub organellowego z protoplastów wybranej formy rodzicielskiej. Cytoplasty można otrzymać kilku metodami: (i) ultrawirowania protoplastów w izoosmotycznym gradiencie cukrów i mechanicznego usunięcia jądra [3, 18], (ii) plazmolizy podczas enzymatycznego trawienia ściany komórkowej [74], (iii) promieniowania jonizującego X [4, 21, 62, 74], gamma [4, 19, 20, 21], czy niejonizującego promieniowania ultrafioletowego UV [7, 19, 20, 21, 62, 71].

Powszechną metodą eliminacji chromosomów w protoplastach buraka cukrowego jest ich napromienianie UV. Czas i intensywność naświetlania powinny być tak ustalone, aby uniemożliwiały prawidłowy przebieg replikacji i transkrypcji, a w konsekwencji powodowały zahamowanie podziałów komórkowych [19, 20, 21].

Chemiczna inaktywacja organellowego DNA w protoplastach wymaga doboru odpowiedniego związku, jego stężenia i czasu działania. Najczęściej stosuje się kwas jodoctowy (IA) [10, 43], octan jodu (IAA) [11, 18], jodoctan (IOA) lub rodaminę 6-G [18]. Rodzaj inhibitora i dawkę określa się w zależności od testowanego gatunku i genotypu [10]. Według Halla [22] i Melchera [51] mitochondria są organellami najbardziej wrażliwymi na te związki chemiczne, a fizjologiczną konsekwencją ich działania jest zaburzenie procesów oddechowych i zahamowanie podziałów komórkowych.

## **TRANSFORMACJA GENETYCZNA BURAKA CUKROWEGO**

Inżynieria genetyczna umożliwia wyizolowanie określonego genu z genomu dawcy, jego klonowanie poza organizmem, a następnie wprowadzenie do genomu biorcy. Produkcja roślin transgenicznych może odbywać się za pośrednictwem *Agrobac-*



Rys. 2. Indukowanie nowych roślin typu O: CMS – cytoplazmatyczna męska sterylność, mtDNA – mitochondrialny DNA, IAA – kwas jodooctowy, UV – promieniowanie ultrafioletowe

*terium* (transformacja wektorowa) lub w wyniku bezpośredniego transferu DNA (transformacja bezpośrednia).

### Transformacja wektorowa

Warunkiem efektywnej transformacji genetycznej jest zintegrowanie fragmentu DNA dawcy z genomem biocy, a w następstwie ekspresja pożądanej cechy w



kolejnych pokoleniach. Prace badawcze prowadzone w różnych laboratoriach wskazują, że w przypadku wielu roślin uprawnych, w tym buraka cukrowego, z sukcesem można stosować transformację wektorową za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* [8, 39] lub *Agrobacterium rhizogenes* [55]. Zaletą transformacji za pomocą wektorów bakteryjnych jest możliwość szybkiej regeneracji roślin z dowolnych eksplantatów. W przypadku buraka uzyskano regeneranty z wielu organów, między innymi z liścieni [9, 40], liści [8, 40, 42, 52, 54, 64], ogonków liściowych [14, 40, 42, 68] i hypokotyli [40], które są najczęściej wykorzystywane do inokulacji z *Agrobacterium*.

Szczepy *Agrobacterium* mogą być także użyte do przenoszenia genów do protoplastów [36, 57]. Kallerhof i współ. [36] transformowali zawiesinę protoplastów buraka za pośrednictwem wektora binarnego niosącego gen warunkujący powstawanie otoczki białkowej wirusa żółtej nekrozy nerwów (BNYVV), gen odporności na kanamycynę i reporterowy gen  $\beta$ -glukoronidazy (GUS). Uzyskane wyniki wskazują, że gen syntezy otoczki białkowej chroni komórki przed epidemią rizomanii, jedną z najpoważniejszych chorób wirusowych atakujących plantacje uprawne buraka. Autorzy donoszą również o możliwości transformowania protoplastów buraka za pomocą glikolu polietylenowego (PEG) lub w wyniku elektroporacji w celu wprowadzenia odporności na tę chorobę.

### Transformacja bezpośrednia

Rośliny transgeniczne można również otrzymywać wprowadzając DNA do komórek lub protoplastów za pomocą elektroporacji, fuzji z liposomami, mikrowstrzeliwania [67], sonikacji [31, 32, 67], czy też w obecności glikolu polietylenowego [13, 26, 67]. Sposoby bezpośredniego transformowania są szczególnie skuteczne w odniesieniu do protoplastów, które pozbawione są ściany komórkowej utrudniającej swobodne przemieszczanie się DNA [45, 47]. Bezpośrednie pobieranie DNA umożliwia wprowadzenie genów zwłaszcza do tych gatunków, które nie są podatne na infekcję *Agrobacterium* bądź też nie ulegają transformacji w dostatecznym stopniu. Burak cukrowy jest skutecznie transformowany za pośrednictwem bakterii. Jednakże podjęto próby bezpośredniego wprowadzania DNA do protoplastów tego gatunku w drodze elektroporacji i sonikacji.

Elektroporacja polega na poddawaniu zawiesiny protoplastów i egzogennej DNA działaniu elektrycznych mikroimpulsów prostokątnych, zanikających wykładniczo lub impulsów prądu przemiennego. Proces poracji na skutek wzbudzenia pola elektromagnetycznego powoduje, że w błonach plazmatycznych tworzą się mikropory, przez które może przenikać DNA [34, 47]. Pomiary stopnia przepuszczalności fenylosafraniny, barwnika nieprzenikającego w warunkach fizjologicznych przez błony plazmatyczne sugerują, że powstawanie porów jest procesem odwracalnym [45]. Efektywność elektroporacji można określić za pomocą enzymów re-

porterowych, w tym transferazy chloramfenikolu (CAT). Aktywność CAT zależy od stężenia plazmidu, gęstości protoplastów, parametrów pola elektrycznego oraz stanu fizjologicznego protoplastów [44]. Joersbo i Brundstedt [30] porównali różne impulsy pola elektrycznego i wskazali, że drgania prądu zmiennego wpływają pozytywnie na ekspresję genu CAT. Lindsey i Jones [46], po zastosowaniu krótkich impulsów prostokątnych oraz pojedynczych, długich, wykładniczo zanikających uzyskali z protoplastów buraka kolonie wykazujące trwałą ekspresję, którą określono na podstawie testów odpornościowych na kanamycynę i wykonując analizę hybrydyzacyjną – Southern blot. W wyniku elektroporacji udało się również wprowadzić gen odporności na antybiotyk do tytoniu, a następnie przenieść tę cechę, również dzięki bezpośredniej transformacji, do protoplastów buraka cukrowego [15].

Sonikacja stosowana jest w celu transformowania tkanek roślinnych, zawiesin komórkowych i protoplastów [31, 32, 33, 35]. Oprócz zwiększenia przepuszczalności błon, ultradźwięki mogą stymulować syntezę białek [32]. Joersbo i Brunstedt [28] zastosowali nieznaną wcześniej metodę inokulacji protoplastów buraka cukrowego w obecności wirusa żółtej nekrozy nerwów (BNYVV) stymulowaną ultradźwiękami.

Hall i in. [26] oraz Denys i in. [13] przedstawili wyniki doświadczeń zmierzających do wprowadzenia do protoplastów buraka cukrowego genu odporności na herbicyd Basta w obecności glikolu polietylenowego. Odtworzone rośliny buraka, wszystkich testowanych genotypów, okazały się płodnymi formami diploidalnymi. Analiza PCR i hybrydyzacja Southern blot wykazała, że w 40–50% nastąpiło zintegrowanie genu odporności na herbicyd z genomem buraka. Obecnie prowadzone są doświadczenia polowe, w których testuje się ekspresję tej cechy w kolejnych pokoleniach roślin i bada sposób jej dziedziczenia [13].

## OSIĄGNIĘCIA I PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA TECHNIKI PROTOPLASTÓW W HODOWLI BURAKA CUKROWEGO

Postęp w pracach dotyczących regeneracji protoplastów buraka cukrowego szczególnie wyraźnie zaznaczył się w ostatnich sześciu latach. Podobnie jak w przypadku somatycznej hybrydyzacji czy transformacji genetycznej podstawowy problem stanowią trudności związane z indukcją morfogenezy lub embriogenezy kalusa uzyskanego z protoplastów buraka [24]. Niedawno pojawiły się pierwsze informacje o regeneracji *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* z totipotentnych protoplastów. Steen i współ. [72] zregenerowali genotyp 68-3 w wyniku somatycznej embriogenezy. W pracy brak jakichkolwiek danych o procedurze izolacji protoplastów i ich regeneracji. Krens i współ. [41] oraz Pedersen i współ. [56] indukowali morfogenezę linii SVP no. 31-188-NF z mezofilowych protoplastów izolowanych z 6–8-tygodniowych sie-



wek. W celu zwiększenia reproduktywności izolacji i regeneracji Pedersen i współ. [56], a także Lenzner i współ. [43] wykorzystali jako tkankę donorową liście pochodzące z kultur *in vitro*. Hall i współ. [23] informują o udanych próbach regeneracji z protoplastów mezofilowych aż 5–7 linii buraka. Również Pedersen i współ. [56] zregenerowali *Beta vulgaris* ssp. *maritima*, linię Bm-F z protoplastów izolowanych z ogonków liściowych. Do spektakularnych osiągnięć należy opracowanie przez Krensa i in. [25] szczegółowej metody selekcji totipotentnych protoplastów z komórek przyszparkowych buraka. Należy jednak podkreślić, że i w tym przypadku procedura regeneracji protoplastów dotyczy tej samej linii buraka cukrowego, którą już wcześniej odtworzono z protoplastów mezofilowych. Odpowiedni dobór tkanki do izolacji protoplastów nie stanowi jedyne ograniczenia, które niesie cykl eksplantat - protoplast - zregenerowana roślina. Nadal w sferze badań pozostają problemy związane z częstotliwością podziałów mitotycznych komórek oraz brakiem jednolitej procedury regeneracyjnej dla innych linii i genotypów buraka [43]. Zdolności do podziałów, tworzenia kalusa i regeneracji z protoplastów buraka cukrowego zależą od wielu czynników, wśród których główną rolę odgrywa właśnie genotyp [49].

Podjęto również próby asymetrycznej fuzji za pomocą glikolu polietylenowego (PEG) oraz impulsów pola elektrycznego. Wydajność fuzji chemicznych i fizycznych dla protoplastów buraka nie przekracza jak dotąd 1,12% [22, 43]. Ponadto nie potwierdzono mieszańcowego charakteru tkanki kalusowej uzyskanej w wyniku tych doświadczeń. W świetle przedstawionych doniesień literaturowych wydaje się uzasadnione doskonalenie warunków izolacji i regeneracji z totipotentnych protoplastów dla poszczególnych genotypów buraka cukrowego oraz jednocześnie podejmowanie prób zastosowania fuzji i transformacji protoplastów jako niekonwencjonalnej metody pomocnej w realizacji programów hodowlanych.

## LITERATURA

- [1] AKAGI H, TAGUCHI T, FUJIMURA T. Stable inheritance and expression of the CMS traits introduced by asymmetric protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 1995; **91**: 563–567.
- [2] ATANASOV AJ. Sugar beet. [w] Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV [red] Macmillan Publishing Company. New York, Collier Macmillan Company. London 1986: 652–673
- [3] VAN ARK HF, HALL RD, CREEMERS-MOLENAAR J, KRENS FA. High yields of cytoplasts from protoplasts of *Lolium perenne* and *Beta vulgaris* using gradient centrifugation. *Plant Cell Tissue Org Cult* 1992; **31**: 223–232.
- [4] BABIYCHUK E, KUSHNIR S, GLEBA YY. Spontaneous extensive chromosome elimination in somatic hybrids between somatically congruent species *Nicotiana tabacum* L. and *Atropa belladonna*. *Theor Appl Genet* 1992; **84**: 87–91.
- [5] BHAT SR, FORD-LLOYD BV, CALLOW IA. Isolation of protoplasts and regeneration of callus from suspension cultures of cultivated beets. *Plant Cell Rep* 1985; **2**: 348–350.

- [6] BHAT SR, FORD-LLOYD BV, CALLOW IA. Isolation and culture of mesophyll protoplasts of garden, fodder and sugar beets using a nurse culture system: callus formation and organogenesis. *J Plant Physiol* 1986; **124**: 419–423.
- [7] BORNMAN JF, BORNMAN CHH, BJÖRN LO. Effects of ultraviolet radiation on viability of isolated *Beta vulgaris* and *Hordeum vulgare* protoplasts. *Z Pflanzenphysiol Bd* 1982; **105**: 289–296.
- [8] BROWN SJ, GARTLAND KMA, SLATER A, HALL JF, ELLIOTT MC. Plant growth regulator manipulations in sugar beet. [w] Nijkamp HJJ, Van Der Plas LHW, Van Aartrijk J [red] Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London 1990: 486–491.
- [9] CATLIN WD. The effect of antibiotics on the inhibition of callus induction and plant regeneration from cotyledones of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Rep* 1990; **9**: 285–288.
- [10] CELLA R, CARBONERA D, IADAROLA P. Characterization of intraspecific somatic hybrids of carrot obtained by fusion of iodoacetate-inactivated A2CA-resistant and sensitive protoplasts. *Z Pflanzenphysiol Bd* 1983; **112**: 449–457.
- [11] CREEMERS-MOLENAAR J, HALL RD, KRENS FA. Asymmetric protoplast fusion aimed at intraspecific transfer of cytoplasmic male sterility (CMS) in *Lolium perenne* L. *Theor Appl Genet* 1992; **84**: 763–770.
- [12] DALKE L, SZOTA M. Utilizing male sterility from *Beta maritima* in sugar beet breeding. *J Sugar Beet Res* 1993; **4**: 253–260.
- [13] DENYS P, HALL R, ROSQUIN I, WEYENS G, LATHOUWERS J, LOMMEL M, DUNWELL J, LEFEBVRE M. Screening independent transformants of sugar beet expressing the enzyme phosphinothricine-acetyl-transferase (Pat) for a high level of tolerance to the herbicide glufosinate-ammonium. Proc 59th Winter Congress IIRB, Brussels 1996: 567–569.
- [14] DETREZ C, SANGWAN RS, SANGWAN-NORREEL BS. Phenotypic and karyotypic status of *Beta vulgaris* plants regenerated from direct organogenesis in petiole culture. *Theor Appl Genet* 1989; **77**: 462–468.
- [15] GALLOIS P, LINDSEY K, MALONE R, KREIS M, JONES MGK. Gene rescue in plants by direct gene transfer of total genomic DNA into protoplasts. *Nucleic Acids Res* 1992; **15**: 3977–3982.
- [16] GROSSER JW, MOURAO-FO FAA, GMITTER FG, LOUZADA ES, JIANG J, BAERGEN K, QUIROS A, CABASSON C, SCHELL JI, CHANDLER JL. Allotetraploid hybrids between *Citrus* and seven related genera produced by somatic hybridization. *Theor Appl Genet* 1996; **92**: 577–582.
- [17] HAGIMORIM, NAGAOKA M, KATO N, YOSHIKAWA H. Production and characterization of somatic hybrids between the Japanese radish and cauliflower. *Theor Appl Genet* 1992; **84**: 819–824.
- [18] HALL RD. The development of an in vitro protocol for the production of male sterile sugarbeet. *Bijl Proph* 1989; **2**: 121.
- [19] HALL RD, ROUWENDAL GJA, KRENS FA. Asymmetric somatic cell hybridization in plants: I. The early effects of (sub)lethal doses of UV and gamma radiation on the cell physiology and DNA integrity of cultured sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts. *Mol Gen Genet* 1992; **234**: 306–314.
- [20] HALL RD, ROUWENDAL GJA, KRENS FA. Asymmetric somatic cell hybridization in plants: II. Electrophoretic analysis of radiation-induced DNA damage and repair following the exposure of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts to UV and gamma rays. *Mol Gen Genet* 1992; **234**: 315–324.
- [21] HALL RD, KRENS FA, ROUWENDAL GJA. DNA radiation damage and asymmetric somatic hybridization: Is UV a potential substitute or supplement to ionising radiation in fusion experiments? *Physiol Plant* 1992; **85**: 319–324.
- [22] HALL RD, PEDERSEN CH, KRENS FA. Progress towards the development of a general somatic hybridization protocol for *Beta*. *J Sugar Beet Res* 1993; **4**: 275–290.

- [23] HALL RD, PEDERSEN CH, KRENS FA. Improvement of protoplast culture protocols for *Beta vulgaris* L. (sugar beet). *Plant Cell Rep* 1993; **12**: 339–342.
- [24] HALL RD, PEDERSEN C, KRENS FA. Regeneration of plants from protoplasts of *Beta vulgaris*. [w] *Biotechnology in Agriculture and Forestry 29* [red] Bajaj YPS 1993: 16–37.
- [25] HALL RD, VERHOEVEN HA, KRENS FA. Computer-assisted identification of protoplasts responsible for rare division events reveals guard-cell totipotency. *Plant Physiol* 1995; **107**: 1379–1386.
- [26] HALL RD, RIKSEN T, KRENS FA, VERHOEVEN HA, LATHOUWERS J, LOMMEL M, ROSQUINI, WEYENS G, LEFEBVRE M, DUNWELL JM. A transformation system for sugar beet based on a single cell type. Proc 59th Winter Congress IIRB, Bruksela 1996: 571–575
- [27] HALLDEN C, BRYNGELSSON, BOSEMARK NO. Two new types of cytoplasmic male sterility found in wild *Beta* beets. *Theor Appl Genet* 1988; **75**: 561–568.
- [28] JANSEN R. Transformation von Zuckerrüben. Proc 53th Winter Congress IIRB, Bruksela, 1990: 39–40.
- [29] JAŹDŹEWSKA E, NIKLAS A, MAJEWSKA-SAWKA A. Progress towards sugar beet improvement through somatic hybridization. 1. Inactivation of nuclei and cytoplasm in donor and recipient protoplasts. *Acta Soc Bot Pol* 1996; **64**: 341–347.
- [30] JOERSBO M, BRUNSTEDT J. Direct gene transfer to plant protoplasts by electroporation by alternating, rectangular and exponentially decaying pulses. *Plant Cell Rep* 1990; **8**: 701–705.
- [31] JOERSBO M, BRUNSTEDT J. Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication. *Plant Cell Rep* 1990; **9**: 207–210.
- [32] JOERSBO M, BRUNSTEDT J. Protein synthesis stimulated in sonicated sugar beet cells and protoplasts. *Ultrasound Med Biol* 1990; **7**: 719–724.
- [33] JOERSBO M, BRUNSTEDT J. Inoculation of sugar beet protoplasts with beet necrotic yellow vein virus particles by mild sonication. *J Virol Meth* 1990; **29**: 63–70.
- [34] JOERSBO M, BRUNSTEDT J. Electroporation: Mechanism and transient expression, stable transformation and biological effects in plant protoplasts. *Physiol Plant* 1991; **81**: 256–264.
- [35] JOERSBO M, BRUNSTEDT J. Sonication: A new method for gene transfer to plants. *Physiol Plant* 1992; **85**: 230–234.
- [36] KALLERHOFF J, PEREZ P, BOUZOUBAA S, TAHAR SB, PERRET J. Beet necrotic yellow vein virus coat protein-mediated protection in sugarbeet (*Beta vulgaris*) protoplasts. *Plant Cell Rep* 1990; **9**: 224–228.
- [37] KIRTI PB, MOHAPATRA T, BALDEV A, PRAKASH S, CHOPRA VL. A stable cytoplasmic male-sterile line of *Brassica juncea* carrying restructured organelle genomes from somatic hybrid *Trachystoma baliu* + *B. juncea*. *Plant Breed* 1995; **114**: 434–438.
- [38] KIRTI PB, MOHAPATRA T, BALDEV A, GAIKWAD K, PRAKASH S, CHOPRA VL. Synthesis of alloplasmic male sterile lines of *Brassica juncea* through protoplast fusion and their improvement. 14th International Congress of Sexual Plant Reproduction, Australia, 1996: 25.
- [39] KRENS FA, ZIJLSTRA C, MOLLEN W, JAMAR D, HUIZING HJ. Transformation and regeneration in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) induced by shooter mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *Euphytica* 1988; **6**: 185–194.
- [40] KRENS FA, JAMAR D. The role of explant source and culture conditions on callus induction and shoot regeneration in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *J Plant Physiol* 1989; **134**: 631–655.
- [41] KRENS FA, JAMAR D, ROUWENDAL GJA, HALL RD. Transfer of cytoplasm from new *Beta* CMS sources to sugar beet by asymmetric fusion: 1. Shoot regeneration from mesophyll protoplasts and characterization of regenerated plants. *Theor Appl Genet* 1990; **79**: 390–396.
- [42] KONWAR BK, COUTTS RHA. Rapid regeneration of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants from *in vitro* cultures. Progress in Plant Cellular and Molecular Biology – VIIth Inter Congr Plant Tissue Cell Cult 1990: 114–118.



- [43] LENZNER S, ZOGLAUER K, SCHIEDER O. Manipulation of sugar beet protoplasts: regeneration, CMS-transfer and direct gene transfer. VIIIth Inter Assoc Plant Tissue Cult Congr, Florence 1994: 16.
- [44] LINDSEY K, JONES MGK. Transient gene expression in electroporated protoplasts and intact cells of sugar beet. *Plant Mol Biol* 1987; **10**: 43–52.
- [45] LINDSEY K, JONES MGK. The permeability of electroporated cells and protoplasts of sugar beet. *Planta* 1987; **172**: 346–355.
- [46] LINDSEY K, JONES MGK. Stable transformation of sugarbeet protoplasts by electroporation. *Plant Cell Rep* 1989; **8**: 71–74.
- [47] LINDSEY K, JONES MGK. Electroporation of cells. *Physiol Plant* 1990; **79**: 168–172.
- [48] ŁOJKOWSKA E. Zastosowanie fuzji protoplastów i selekcji genotypów na poziomie kultur *in vitro* w hodowli roślin odpornych na patogeny bakteryjne. VII Ogólnopolska Konferencja Kultur *in vitro*, Katowice-Ustroń, 1994: 73.
- [49] MAJEWSKA-SAWKA A, NAKASHIMA H, MORI K. Isolation and culture of suspension-derived protoplasts of *Beta vulgaris* L. *Biol Plant* 1994; **36**: 9–13.
- [50] MALEPSZY S, PŁADER W, BURZA W, DZIADCZYK E. Wytworzenie nowych form roślin warzywnych za pomocą fuzji protoplastów. I Ogólnopolska Konferencja Biotechnologii Roślin i Przetwórstwa, 1993: 39–41.
- [51] MELCHERS G, MOHRI Y, WATANABE K, WAKABAYASHI S, HARADA K. One-step generation of cytoplasmic male sterility by fusion of mitochondrial-inactivated tomato protoplasts with nuclear-inactivated *Solanum* protoplasts. *Proc Natl Acad Sci* 1992; **89**: 6832–6836.
- [52] MIKAMI T, SUDOH R, NAGAO E, KINOSHITA T. Genotypic variation in the *in vitro* morphogenesis from leaf explants of *Beta vulgaris* L. and *B. maritima* L. *Euphytica* 1989; **40**: 271–273.
- [53] OWEN FV. Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beets. *J Agric Res* 1945; **71**: 423–440.
- [54] OWENS LD, EBERTS DR. Sugarbeet leaf disc culture: an improved procedure for inducing morphogenesis. *Plant Cell Tissue Org Cult* 1992; **31**: 195–201.
- [55] PAUL H, ZIJJSTRA C, LEEUWANGH JE, KRENS FA, HUIZING HJ. Reproduction of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* Schm. on transformed root cultures of *Beta vulgaris* L. *Plant Cell Rep* 1987; **6**: 379–381.
- [56] PEDERSEN CH, HALL RD, KRENS FA. Petioles as the tissue source for isolation and culture of *Beta vulgaris* and *Beta maritima* protoplast. *Plant Sci* 1993; **95**: 89–97.
- [57] PEERBOLTE R, KRENS FA, MANS RMW, FLOOR M, HOGE JHC, WULLEMS GJ, SCHILPEROORT RA. Transformation of plant protoplasts with DNA: cotransformation of non-selected calf thymus carrier DNA and meiotic segregation of transforming DNA sequences. *Plant Mol Biol* 1985; **5**: 235–246.
- [58] PINTO FM, CHUPEAU Y, CABRERA VM. Molecular genetic characterization of plant somatic hybrids. *In Vitro Cell Dev Biol* 1995; **31**: 96–100.
- [59] PRZEWOŹNY T. Izolacja i fuzja protoplastów ziemniaka. VII Ogólnopolska Konferencja Kultur *in vitro*, Katowice-Ustroń, 1994: 73.
- [60] PUIITE KJ. Progress in plant protoplast research. *Physiol Plant* 1992; **85**: 403–410.
- [61] PUPILLI F, SCARPA GM, DAMIANI F, ARCIONI S. Production of interspecific somatic hybrid plants in the genus *Medicago* through protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 1992; **84**: 792–797.
- [62] RAINERI D, JORDAN P, KUMAR A. Restoration of fertility in cytoplasmic male-sterile *Nicotiana tabacum* (cytoplasm N. *bigelovii*) by protoplast fusion with X-irradiated protoplasts of *N. tabacum*, SR-1. *J Exp Bot* 1992; **247**: 195–203.
- [63] ROEST S, GILISSEN LJW. Plant regeneration from protoplasts: a literature review. *Acta Bot Neerl* 1983; **38**: 1–23.



- [64] ROGOZIŃSKA J, GOŚKA M. Induction of differentiation and plant formation in isolated sugarbeet leaves. *Bull Acad Pol Sci* 1978; **5**: 343–345.
- [65] SAUNDERS JW, DOLEY WP. One step shoot regeneration from callus of whole plant leaf explants of sugarbeet lines and a somaclonal variant for *in vitro* behavior. *J Plant Physiol* 1986; **124**: 473–479.
- [66] SAUNDERS JW, SHIN K. Germplasm and physiologic effect of high-frequency hormone autonomous callus and subsequent shoot regeneration in sugarbeet. *Crop Sci* 1986; **26**: 1240–1245.
- [67] SAWAHHEL WA, COVE DJ. Gene transfer strategies in plants. *Biotech Adv* 1992; **10**: 393–412.
- [68] SCHLANGSTEDT M, ZOGLAUER K, LENZNER S, HERMANS B, JACOBS M. Improvement of sugar beet (*Beta vulgaris*) protoplast culture: leaf petioles as a protoplast source. *J Plant Physiol* 1994; **143**: 227–233.
- [69] SPANGENBERG G, WANG ZY, LEGRIS G, MONTAVON P, TAKAMIZO T, PEREZ-VICENTE R. Intergeneric symmetric and asymmetric somatic hybridization in *Festuca* and *Lolium*. *Euphytica* 1995; **85**: 235–245.
- [70] SPANGENBERG G, WANG ZY, KAUL V, NAGEL J. Somatic embryogenesis, somatic hybridization and genetic transformation in pasture grasses. 14th International Congress of Sexual Plant Reproduction, Australia, 1996: 68.
- [71] STAXEN I, BERGOUNIOUX C, BORNMAN JF. Effect of ultraviolet radiation on cell division and microtubule organization in *Petunia hybrida* protoplasts. *Protoplasma* 1993; **113**: 70–76.
- [72] STEEN P, KEIMER B, D'HALLUIN K, PEDERSEN CH. Variability in plants of sugar beet (*B. vulgaris* L.) regenerated from callus, cell-suspension and protoplasts. *Genet Manipul Plant Breed* 1986: 633–635.
- [73] STEEN P, PEDERSEN CH. Gene transfer for herbicide resistance. *J Sugar Beet Res* 1993; **4**: 267–274.
- [74] SUNDBERG E, GLIMELIUS K. Production of cybrid plants within *Brassicaceae* by fusing protoplasts and plasmolytically induced cytoplasts. *Plant Sci* 1991; **79**: 205–216.
- [75] SZABADOS L, GAGGERO C. Callus formation from protoplasts of a sugarbeet cell suspension culture. *Plant Cell Rep* 1985; **4**: 195–198.
- [76] WOLTERS AM, JACOBSEN E, O'CONNELL M, BONNEMA G, SREE RAMULU K, JONG H, SCHOEMAKERS H, WIJBRANDI J, KOORNNEEF M. Somatic hybridization as tool for tomato breeding. *Euphytica* 1994; **79**: 265–277.
- [77] XU YS, PEHU E. Analysis of chloroplast and mitochondrial DNA in asymmetric somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and irradiated *S. brevidens*. *Trans Res* 1994; **3**: 256–259.
- [78] YANG ZQ, SHIKANAI T, YAMADA Y. Asymmetric hybridization between cytoplasmic male-sterile (CMS) and fertile rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts. *Theor Appl Genet* 1988; **76**: 801–808.

*Redaktor prowadzący: Szczepan Biliński.*

*Otrzymano: 31 stycznia 1996 r.*

*Przyjęto: 17 listopada 1996 r.*

*Adres autora: Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Korzeniowych, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 85-950 Bydgoszcz, ul. Powstańców Wielkopolskich 10*



## RODZINA GENÓW *bcl-2*

### *bcl-2* GENE FAMILY

Zofia Monika RUPNIEWSKA\*, Danuta ROŻYŃKOWA\*\*,  
Maria KUROWSKA\*\*\*

\*Klinika Hematologii AM w Lublinie; \*\* Zakład Genetyki Człowieka AM w Lublinie; \*\*\* Klinika Interny II Katedry Chorób Wewnętrznych AM w Lublinie

*Streszczenie:* Rodzina genów *bcl-2* jest obecnie przedmiotem intensywnych badań z uwagi na ich rolę w procesie apoptozy. Apoptoza – zaprogramowana genetycznie śmierć komórki – jest fizjologicznym procesem przebiegającym w kilku etapach i kończącym się destrukcją i fagocytozą komórki. Część genów z rodziny *bcl-2* hamuje ten proces, część go ułatwia. Także inne geny i cytokiny wpływają na apoptozę.

*Summary:* *bcl-2* gene family is at present intensively studied on account of his function in apoptosis. Apoptosis – genetically programed cell death – is a physiological process proceeding in several stages and finishes in destruction and phagocytosis of cell. Some genes with *bcl-2* related sequences suppress apoptosis, the another act in opposition and allow apoptosis to proceed. Also other genes and cytokines control apoptosis.

### GENY *bcl*

Pięć genów *bcl* nie ma, poza nazwą nic wspólnego ze sobą, chociaż być może *bcl-5* i *bcl-6* są tym samym genem. Prawdopodobnie istnieje także kooperacja pomiędzy *bcl-1* i *bcl-2* oraz *bcl-2* i *bcl-6*. Nazwa genów *bcl* (*B-Cell Leukaemia/Lymphoma*) pochodzi stąd, że pierwotnie wykryto je w różnych białaczkach i/lub chłoniakach wychodzących z komórek B. Geny te i ich produkty przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Proto-onkogeny BCL ich lokalizacja chromosomowa, produkty i dotychczas poznane działanie

Proto-onkogen	Lokalizacja chromosomowa	Produkt	Działanie	Piśmiennictwo
<i>bcl-1</i> <i>prad-1</i> (parathyroid adenoma -1)	11q13	Cyklina D1 jądra komórkowego	W fazie G1 cyklu komórkowego	[30]
<i>bcl-2</i>	18q21	Białko BCL-2 alfa błony mitochondria- lnej, otoczki jądrowej i częściowo siateczki endoplazmatycznej Białko BCL-2 beta występuje w cytozolu	BCL-2 alfa blokuje apoptozę być może w torze antyoksyda- cyjnym (w domenie przezbro- nowej znajduje się ciąg hydrofobowych aminokwasów) BCL-2 beta jest pozbawiony zdolności hamowania apoptozy	[20, 50, 52]
<i>bcl-3</i>	19q13.1	Białko jądrowe (z rodziny I kappa B) o motywie CDC 10, jak również czynnika transkrypcyjnego z mo- tywem <i>helix-loop-helix</i> c-MYC i E2A	Czynnik transkrypcyjny	[24, 34]
<i>bcl-5</i>	3q27	Białko przypominające białko kodowane przez gen Krüppela <i>Drosophila</i> , odpowiada- jące białku palca cynkowego ( <i>Krüppel-like</i> <i>Zinc-Finger Protein</i> )	Przypuszczalny czynnik transkrypcyjny	[34]
<i>bcl-6</i>	3q27 (identyczna z lokalizacją <i>bcl-5</i> )	Białko jądra komórkowego o motywie palca cynkowego	Przypuszczalny czynnik transkrypcyjny	[22, 62]

## APOPTOZA

W pracy niniejszej omawiamy jedynie rodzinę genów *bcl-2*. W klasyfikacji proto-onkogenów Korsmeyera [27] *bcl-2* został zaliczony do genów programowanej śmierci komórki – hamujących apoptozę (kontrola negatywna) w przeciwieństwie do p 53, genu drogi ku śmierci, który ułatwia apoptozę (kontrola pozytywna). Geny te przedstawiono w tabeli 2.



Tabela 2. Rodzaje komórkowych onkogenów wg Korsmeyera [27]

Grupa	Geny
Grupa I	Geny kodujące czynniki wzrostu i proliferacji, np. gen <i>g</i> , <i>m-csf</i> , geny kodujące czynniki transkrypcji lub ogniwa transdukcji sygnałów, np. gen <i>myc</i> , <i>ras</i> , <i>abl</i> decyduje zwiększenie funkcji
Grupa II	Geny supresji nowotworów – geny przeciwnowotworowe, hamowanie wzrostu i proliferacji, np. <i>rb</i> , <i>p 53</i> , decyduje utrata funkcji
Grupa III	Geny programowanej śmierci komórki (apoptozy); geny hamujące apoptozę np. <i>bcl-2</i> , decyduje zwiększenie funkcji; geny drogi ku śmierci sprzyjające apoptozie np. <i>p 53</i> , decyduje utrata funkcji

Należy tu krótko wspomnieć o apoptozie. Nazwa apoptoza pochodzi z języka greckiego i opisuje opadanie np. płatków kwiatów lub liści z drzew [23]. Proces ten w przeciwieństwie do śmierci nekrotycznej spowodowanej zdarzeniem nagłym i niespodziewanym jest przygotowany przez samą komórkę.

Apoptozę można podzielić na dwa etapy:

- w pierwszym komórka dochodzi do indukcji procesu samounicestwienia, w wyniku informacji dochodzących z wnętrza komórki, jak i sygnałów zewnętrznych;
- w drugim etapie następuje uaktywnienie genów, których produkty biorą udział w samounicestwieniu komórki.

Indukcja apoptozy i przebieg zdarzeń molekularnych w komórkach należących do różnych tkanek jest odmienna i nawet jest inna w limfocytach B (gdzie ważną rolę odgrywa antygen CD 40) i limfocytach T ( udział produktów genów FAS/APO-1 (CD 95) i receptora komórki T) [45].

Komórki ulegające apoptozie przechodzą bardzo charakterystyczny ciąg przemian morfologicznych prowadzących ostatecznie do fragmentacji jądra i cytoplazmy z powstaniem tzw. ciałek apoptycznych. Ciała te są ostatecznie fagocytowane przez układ monocytów-makrofagów, dzięki czemu nie dochodzi do odczynów zapalnych charakteryzujących proces martwicy komórek, a sam proces apoptozy jest trudny do dostrzeżenia [23, 59, 60].

Apoptoza u kręgowców odgrywa kluczową rolę w ontogenezie i organogenezie (np. w rozwoju układu immunologicznego) [41, 60]. W ustroju dorosłym utrzymuje właściwą homeostazę tkankową zapobiegając np. rozrostom klonów autoreaktywnych i nowotworowych, a także zapewnia selekcję komórek o najwłaściwszym repertuarze receptorów np. w układzie limfo-hemopoetycznym [1, 53, 55].

## CHARAKTERYSTYKA *bcl-2*

Gen *bcl-2* jest jednym z lepiej poznanych genów. W piśmiennictwie polskim w latach ostatnich pojawiło się szereg prac na temat tego genu [16, 26, 44]. *bcl-2*

koduje dwa białka: p BCL-2 alfa i p BCL-2 beta. Oba białka mają identyczne 195 pierwszych aminokwasów, ale p BCL-2 beta jest pozbawiony domeny przezłonowej końca karboksylowego. Zachowanie w procesie ewolucji końca karboksylowego p BCL-2 alfa, złożonego z 17 hydrofobowych aminokwasów, który poza ssakami wykryto także u ptaków, wskazuje na jego znaczenie w domenie przezłonowej. Obecność końca karboksylowego w p BCL-2 alfa warunkuje kilka charakterystycznych cech tego białka, różniących go od p BCL-2 beta [52, 54]:

- *Po pierwsze:* jego masa cząsteczkowa jest wyższa od p BCL-2 beta (26kD versus 22 kD).

- *Po drugie:* jego lokalizacja w obrębie struktur komórkowych jest odmienna (p BCL-2 alfa jest białkiem przezłonowym występującym w wewnętrznej i zewnętrznej błonie mitochondrialnej, a przy wzmożonej ekspresji – w siateczce endoplazmatycznej oraz w otoczce jądrowej; p BCL-2 beta jest rzadko wykrywalny w strukturach komórkowych i występuje w cytosolu).

- *Po trzecie:* jego czynnością w warunkach pozbawienia komórek cytokiny. Mianowicie p BCL-2 alfa ma zdolność przedłużania życia komórki przez blokowanie apoptozy nawet przy braku interleukiny 3 (IL-3). Natomiast w doświadczeniach na linii hemopoetycznej 32 D p BCL-2 beta nie przedłużało życia komórek pozbawionych IL-3.

- *Po czwarte:* w związku z wewnątrz komórkową lokalizacją i zdolnością hamowania apoptozy p BCL-2 alfa może być odpowiedzialne za wielolekową odporność komórek na chemioterapię. Wykazano bowiem, że wysoki poziom wewnątrz komórki p BCL-2 alfa blokuje apoptozę indukowaną lekami przeciwnowotworowymi [9, 35].

Z drugiej strony zarówno p BCL-2 alfa, jak i p BCL-2 beta zwiększają onkogenezę w linii fibroblastów NIH-3T3 i wraz z onkogenem *ras* wywołują złośliwą transformację płodowych fibroblastów szczura [42].

p BCL-2 alfa w układzie limfo-hemopoetycznym występuje w grudkach chłonnych węzłów chłonnych lub śledziony i to prawie wyłącznie w mankiecie limfocytów otaczających centrum rozrodcze grudki. Taka lokalizacja, wskazuje że p BCL-2 alfa jest białkiem komórek plazmatycznych i długo żyjących komórek B pamięci immunologicznej [37]. Brak ekspresji BCL-2 w centrum rozrodczym prawidłowej grudki chłonnej sprzyja selekcji właściwych komórek i śmierci antygenowo-negatywnych limfocytów B.

Stwierdzono także różnice w czasie przeżycia między tymocytami kory grasicy, które prawie wszystkie giną w następstwie apoptozy, a tymocytami rdzenia grasicy, które charakteryzuje ekspresja p BCL-2 alfa.

W aspiratach szpiku prekursorowe komórki hemopoetyczne wszystkich linii są p BCL-2 alfa dodatnie, podczas gdy dojrzałe komórki potomne, takie jak neutrofile czy retikulocyty, są p BCL-2 alfa ujemne [21, 40].

Powyższe badania zostały także potwierdzone przez doświadczenia na transgenicznym myszach. Zwiększona ekspresja BCL-2 w komórkach B u tych zwierząt występuje po wtórnej stymulacji antygenowej, której następstwem jest powstanie dużych ilości sekrecyjnych komórek plazmatycznych. Wzrost ekspresji BCL-2 występuje także w komórkach pamięci immunologicznej [37]. BCL-2 odgrywa również rolę u transgenicznych myszy w rozwoju tymocytów. Ekspresja BCL-2 w korowych tymocytach chroni je przed apoptozą indukowaną przez glikokortykoidy, promienie jonizujące i przeciwciała anty CD 3 [48]. U homozygotycznych myszy pozbawionych genu *bcl-2* (*bcl-2* *-/-*) wkrótce po urodzeniu tymocyty otrzymujące apoptotyczne sygnały szybko giną, a grasica i śledziona ulegają dramatycznej inwolucji [57].

W hemopoetycznych liniach komórkowych zależnych od zewnątrz pochodnych czynników regulujących wzrost komórek, takich jak np. IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów-makrofagów, w razie ich braku w środowisku hodowlanym BCL-2 zapobiega apoptozie [8, 38, 46, 56]. Podobnie BCL-2 chroni hodowle komórkowe współczulnych neuronów przed śmiercią w środowisku pozbawionym czynnika wzrostu komórek nerwowych, neutropowego czynnika mózgowo-pochodnego lub innych [2,14]. Chociaż BCL-2 nie zapobiega wszystkim czynnikom przyspieszającym śmierć komórki, może jednak hamować apoptozę wywołaną onkogenami indukującymi proliferację. Nadmierna ekspresja *c-myc* w hodowli komórek CHO pozbawionej osocza lub w hodowli fibroblastów indukuje proliferację połączoną z apoptozą; równoczesna ekspresja BCL-2 zapobiega tej śmierci [4, 11].

BCL-2 jest znany jako onkogen. Złamanie DNA w locus genu strukturalnego łańcucha ciężkiego immunoglobulin (Ig) komórki B lub w locus receptora antygenowego komórki T są częstym miejscem translokacji BCL-2. Złamańca translokacja t(14;18)(q32;q21) charakteryzuje chłoniaki B-komórkowe człowieka (85% chłoniaków grudekowych i 20% chłoniaków o rozlanym typie proliferacji, w tym przewlekłą białaczkę limfatyczną B-komórkową) [64]. W następstwie t(14;18)(q32;q21) BCL-2 zostaje przeniesiony w locus genu łańcucha ciężkiego Ig wskutek czego gwałtownie wzrasta jego transkrypcja [3,7] i apoptoza zostaje zahamowana. Zresztą ekspresja BCL-2 występuje niezależnie od t(14;18)(q32;q21) prawie we wszystkich limfocytach (zarówno B jak i T) chorych z przewlekłą białaczką limfatyczną B komórkową [ J. Roliński obserwacje nie publ.].

Zwrócono także uwagę [43], że poza samą translokacją na aktywację BCL-2 i nadmierne wytwarzanie kodowanego p BCL-2-alfa może wpływać punktowa mutacja. Być może z taką mutacją wiąże się ekspresja BCL-2 u chorych z przewlekłą białaczką limfatyczną B-komórkową. Ekspresja BCL-2 i zahamowanie apoptozy mogą więc tłumaczyć bardzo długi (niekiedy kilkuletni) czas przeżycia białaczkowych limfocytów.



Ekspresję BCL-2 obserwowano także w plazmocytach pochodzących od chorych ze szpiczakiem plazmocytowym, z białaczką plazmocytową i w liniach komórkowych wprowadzonych od chorych ze szpiczakiem plazmocytowym [10, 17]

Rola t(14;18) w nowotworach była badana w modelu transgenicznych myszy z insertem mini genu *bcl-2-Ig* imitującym translokację w chłoniakach człowieka. U zwierząt tych początkowo niewielka populacja komórek B pozostających w fazie spoczynkowej cyklu mitotycznego uległa znacznej akumulacji wskutek zablokowania apoptozy. Pod wpływem stymulacji antygenowej następowała poliklonalna proliferacja, a po pewnym okresie utajenia rozwijały się chłoniaki B-komórkowe o wysokim stopniu złośliwości. Przełączenie poliklonalnej hiperplazji w monoklonalny rozrost nowotworowy występowało wskutek wtórnych zmian genetycznych. W około połowie tych chłoniaków dochodziło do translokacji genu *myc* w locus łańcuchów ciężkich Ig, jego nadmiernej ekspresji, aktywacji proliferacji, przy hamowanej apoptozie. Tak więc wydłużenie czasu życia komórki jest onkogenne [54].

Badania podwójnie transgenicznych myszy (noszących zarówno transgen receptora komórki T, jak i LCK<sup>PI</sup>-BCL-2) wykazały, że w populacji komórek T *bcl-2* ułatwia dojrzewanie komórek CD8, ale nie CD4, przedłuża odpowiedź na ponowną stymulację antygenową (superantygen) [50] i w ostateczności podobnie jak u myszy *bcl-2-Ig* rozwijają się chłoniaki T komórkowe (cyt. wg [57]).

W okresie embrionalnym i w okresie prenatalnym ekspresja BCL-2 występuje w większości badanych narządów. Obserwowano np. ekspresję BCL-2 w zawiązkach kończyn w komórkach strefy palców, natomiast w strefach między palcami ekspresji tej nie stwierdzono i komórki umierały. Szczególnie uderzająca jest ekspresja BCL-2 w układzie nerwowym. Wraz z dojrzewaniem w okresie porodowym ekspresja BCL-2 zostaje w znacznym stopniu ograniczona. U osobników dorosłych ekspresja BCL-2 występuje w młodych populacjach komórkowych, takich jak: komórki prekursorowe wszystkich linii w szpiku, prekursorzy komórek nabłonkowych w jelitach i w skórze. Stwierdzono także wysokiego stopnia ekspresję BCL-2 w nabłonkach reagujących na hormony cyklami rozrostu i inwolucji, takich jak nabłonki macicy [21] i w neuronach obwodowego układu nerwowego (cyt. wg [57]). Zarówno nabłonki macicy, jak i układ neuronów obwodowych są zdolne do regeneracji po ekspozycji na czynniki uszkadzające.

U homozygotycznych myszy pozbawionych genu *bcl-2* wprawdzie rozwój embrionalny jest całkowity, ale wkrótce po urodzeniu następuje zahamowanie wzrostu i przedwczesna śmiertelność. Jak to już powiedziano, grasica i śledziona ulegają inwolucji. Rozwijają się torbielowate zwyrodnienie nerek, które charakteryzuje rozstrzeń proksymalnych i dystalnych segmentów kanalików nerkowych, nadmierna proliferacja nabłonków oraz tkanki śródmiąższowej prowadzące do niewydolności nerek. Występuje przedwczesna siwizna z pojawieniem się wtórnych mieszków włosowych, co wskazuje na zaburzenia w syntezie melanin regulowanej procesami



utleniania-redukcji. Wszystkie te nieprawidłowości sugerują, że *bcl-2* hamuje apoptozę przez oddziaływanie na procesy antyoksydacyjne [57].

## RODZINA GENÓW *bcl-2*

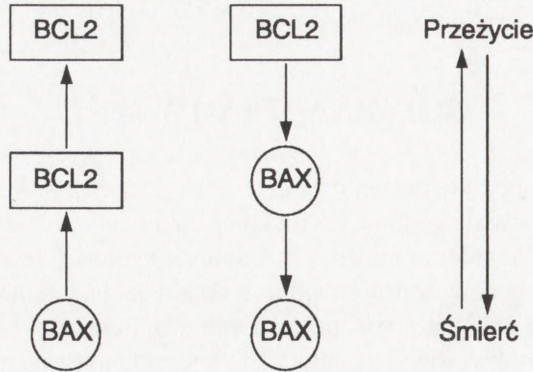
Obecnie mówi się o rodzinie genów *bcl-2*. Sam gen *bcl-2* wykazuje podobieństwo do odległego ewolucyjnie genu *ced-9* nicienia *Caenorhabditis elegans*. Utrata tego genu w pierwszym pokoleniu nicieni powoduje zwiększoną śmiertelność komórek, zaś w czasie embriogenezy w drugim pokoleniu jest cechą letalną. Białka kodowane przez *bcl-2* i *ced-9* są homologiczne zarówno strukturalnie, jak i czynnościowo, 24% sekwencji aminokwasowych białka CED-9 jest identycznych z białkiem BCL-2, a 49% wykazuje podobieństwo. Wprowadzenie genu *bcl-2* do komórek mutantu *Caenorhabditis elegans* z nieczynnym genem CED-9 hamuje apoptozę [18, 19].

Niedawno Kozopas i wsp. [26] wyizolowali z linii ML-1 pochodzącej z ludzkiej białaczki szpikowej gen *mcl-1*. Autorzy wykazali, że ekspresja tego genu występuje we wczesnym okresie różnicowania linii, już po 1–3 godz. od podania estru forboleu, jeszcze przed wystąpieniem antygenowych markerów różnicowania i zmianami morfologicznymi (1–3 dni). Wykryto także podobieństwo sekwencji między MCL-1 a BCL-2, ale nie ustalono, czy MCL-1 wpływa na apoptozę, chociaż uczestniczy w różnicowaniu i ukierunkowaniu komórek.

Inny gen nazywany A1, specyficzny dla wczesnej odpowiedzi komórek hemopoetycznych na czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytów-makrofagów, i lipolisacharyd wykazuje również podobieństwo sekwencji do BCL-2 [31]. Jednakże jego rola w procesie apoptozy, podobnie jak MLC-1, wymaga wyjaśnienia.

Istnieją jednak inne geny podobne do BCL-2, które ponadto odgrywają rolę w procesie apoptozy, są to *bax*, *bcl-x* i *bak*. Geny te, podobnie zresztą jak *ced-9* *Caenorhabditis elegans* i *mcl-1* zawierają dwie różne domeny homologii dobrze zachowane w procesie ewolucji. Są to domeny BH1 i BH2. Domeny te odgrywają istotną rolę w oddziaływaniu na siebie członków rodziny *bcl-2*, gdyż uczestniczą w procesie wiązania np. białka BAX z białkami BCL-2. Gdy w BH1 aminokwas Gly 145 zostanie zastąpiony przez alaninę lub kwas glutaminowy, a w BH2 Trp 188 – przez alaninę, zostanie zniszczona możliwość wiązania BAX z BCL-2 i efekt hamujący apoptozę [63].

Białko BAX p-21 BAX (skrót od *BCL-2 associated protein X*), o masie cząsteczkowej 21 kD wykryli Oltvai i wsp. z waszyngtońskiej grupy Korsmeyera [39]. Znalezione je w ludzkich i mysich tkankach limfoidalnych dzięki równoczesnej precypitacji z BCL-2. Wprawdzie ogólna homologia aminokwasów p-21 BAX z białkiem BCL-2 wynosi około 40%, ale jest wyraźnie zaznaczona w domenach



Rys. 1. Model wzajemnych powiązań między BCL-2 i BAX w regulacji zaprogramowanej śmierci komórki; wszystkie omówione białka mogą występować jako dimery lub oligomery; wolny BCL-2 jest alternatywnie monodimerem lub homodimerem (wg Oltwai i wsp. [39])

BH1 i BH2. Hydrofobowy koniec karboksylowy jest częścią przezbłonową tego białka. BAX z BCL-2 tworzy heterodimer (rys. 1).

O ile BCL-2 hamuje apoptozę w niektórych modelach doświadczalnych (linia RL-7 wyprowadzona od chorego z chłoniakiem, linia Fl 5,12 z mysiej białaczki limfoblastycznej) pozbawionych IL-3, o tyle ekspresja BAX przeciwdziała temu efektowi i komórki giną wskutek apoptozy. A zatem stosunek białka BAX do białka BCL-2 jest krytyczny dla wystąpienia lub zahamowania apoptozy w środowisku pozbawionym IL-3. Białko BAX poza tkanką limfoidalną (grasica, węzły chłonne, śledziona) występuje w szpiku, mózgu, płucach, żołądku, trzustce, nerce, sercu i mięśniach gładkich.

Boise z grupy Nuñez z Chicago [5] wyodrębnił gen *bcl-x*, który koduje białko o zgodności około 44% aminokwasów z białkiem BCL-2. W obrębie genu *bcl-x* wyróżniono dwa podtypy:

– *bcl-x<sub>l</sub>* (*large*) kodujący 233 aminokwasy; białko to ma domeny BH1 i BH2;

– *bcl-x<sub>s</sub>* (*small*) kodujący 170 aminokwasów, w białku kodowanym przez BCL-X<sub>S</sub> brakuje 63 aminokwasów w obszarach zawierających domeny BH1 i BH2 [5, 12].

*bcl-x<sub>l</sub>* został wykryty w dojrzałych strukturach tkankowych, głównie w mózgu, gdzie jego ekspresja jest znacznie wyższa niż w BCL-2 [15, 29, 36].

*bcl-x<sub>s</sub>* występuje głównie w grasicy.

W hodowli pozbawionej IL-3 komórki transfekowane BCL-X<sub>L</sub> były odporne na apoptozę, a więc BCL-X<sub>L</sub> działa podobnie jak BCL-2. Natomiast w tych samych warunkach BCL-X<sub>S</sub> podobnie jak BAX przyspiesza apoptozę hamując działanie

BCL-2. Nie wykazano jednak, aby BCL-X<sub>L</sub> tworzył dimer z BCL-2. Natomiast BCL-X<sub>L</sub> w komórkach ssaków może tworzyć heterodimer z BAX [47]. Istnieją różnice we wzorze ekspresji między BCL-2 i BCL-X<sub>L</sub>. Wydaje się, że ekspresja BCL-2 odgrywa rolę w utrzymaniu homeostazy spoczynkowych komórek T, natomiast ekspresja BCL-X<sub>L</sub> jest istotna dla podjęcia decyzji komórki dotyczącej przeżycia po aktywacji [15, 23].

Niedawno trzy niezależne grupy badawcze [6, 13, 25] zidentyfikowały i scharakteryzowały nowy czynnik odgrywający rolę w procesie śmierci komórki, który nazwano genem *bak*. *bak* jest w 25% identyczny z *bcl-2*, w 22% z *bcl-x<sub>L</sub>* i w 19% z *bax* oraz ma domeny BH1 i BH2. Podobnie jak BAX produkt genu BAK w odpowiedzi na odpowiedni czynnik stymulujący nasila apoptozę. Jest więc antagonistą BCL-2, w przeciwieństwie jednak do BAX, BAK hamuje śmierć w liniach komórek transformowanych przez wirusa Epsteina-Barr. Produkt BAK ma przy końcu karboksylowym śródbłonową domenę hydrofobową, co wskazuje, że jest on integralnym białkiem błony komórkowej. Białko BAK różni się od białek BAX preferencją do tworzenia dimerów z BCL-X<sub>L</sub>, a nie z BCL-2. Przekaznikowy RNA BAK jest bardzo rozpowszechniony w tkankach, łącznie z długo żyjącymi, całkowicie zróżnicowanymi typami komórek. Najwyższy jego poziom odkryto w sercu i mięśniach szkieletowych, a nieco niższy w wątrobie, trzustce, nerkach i mózgu.

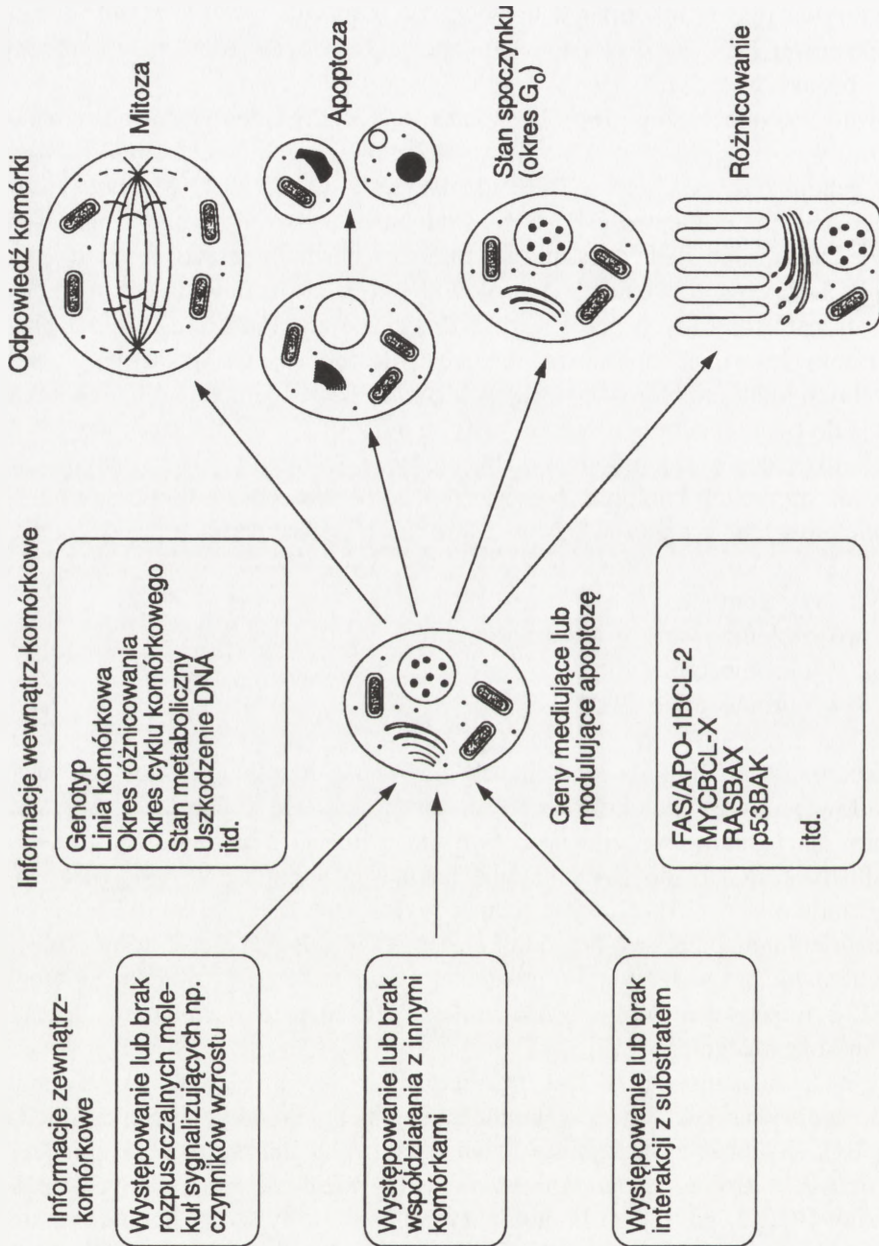
Wykryto trzy geny *bak*:

- gen *bak* zlokalizowano w chromosomie 6,
- *bak-2* w chromosomie 20,
- *bak-3* w chromosomie 11.

Szeroko rozpowszechniona w tkankach aktywność indukująca apoptozę musi być modulowana przez molekuły hamujące ten proces. Do końca nie jest jednak wyjaśniony mechanizm tego zjawiska. Być może BCL-2 działa tworząc dimer z BAX i stosunek BCL-2 do BAX hamuje lub nasila apoptozę w odpowiedzi na bodźce je indukujące [39]. Nie jest jednak wykluczone, że białko BCL-2 przeciwdziała utlenianiu przez wolne rodniki warstwy lipidowej błony komórkowej, które to utlenianie prowadzi do jej fragmentacji tak charakterystycznej dla apoptozy [20]. BCL-2 może także wpływać na molekuły działające w innych miejscach procesu antyoksydacyjnego [57].

Dalsze badania zdolności BCL-2 do interakcji z innymi białkami w łańcuchu śmierci pozwoliły na wykrycie nowego białka negatywnie modulującego czynności BCL-2 i BCL-X<sub>L</sub> oraz zastępującego czynności BAX. Białko to nazwano BAD (*BCL-2/ BCL-XL-associated death promotor*) [61]. Różni się ono od innych członków rodziny BCL-2, gdyż jego homologia ogranicza się tylko najstaranniej przechowywanych w procesie ewolucji aminokwasów w domenach BH1 i BH2. BAD nie ma także charakterystycznego końca karboksylowego w domenie przezbłonowej,





Rys. 2. Odpowiedzi komórki na sygnały zewnętrzne i wewnętrzne (modyfikacja wg Williamsa i Smitha [58])



Tabela 3. Genetyczna kontrola apoptozy w układzie limfo-hemopoetycznym ( modyfikacja wg Sinkovics i Horvath [49])

Geny i czynniki ułatwiające apoptozę	Geny i czynniki hamujące apoptozę	Objaśnienia
p 53	Interleukina-6 (IL-6) antagonista p 53	Utrata lub mutacja p 53 hamuje apoptozę i ułatwia transformację. Jeżeli uszkodzony DNA nie ulegnie naprawie, p 53 indukuje apoptozę. p 53 stabilizowany przez adenowirusa 5 E1A ułatwia apoptozę
<i>c-myc</i> i czynniki wzrostu ( <i>growth factors-GF</i> )	c-MYC GF(-) c-MYC GF(+) FES BCL-2	Przy braku GF c MYC podobnie jak BCL-2 hamuje apoptozę, W obecności GF c- MYC ułatwia apoptozę Ułatwia pozostawanie granulocytów w fazie G <sub>0</sub> cyklu komórkowego i wydłuża ich przeżycie W warunkach prawidłowych białko kodowane przez BCL-2 występuje w długo żyjących komórkach pamięci immunologicznej; rozwój komórek chłoniaka zostaje ułatwiony po transfekcji BCL-2 w sąsiedztwo genów łańcuchów ciężkich immunoglobulin. BCL-2 nie zapobiega jednak działaniu cytotoksycznych komórek T
Receptor FAS (R-FAS)		Ułatwia apoptozę, występuje on tylko w niektórych tkankach, w tym w grasicy i wątrobie; R-FAS wykazuje szereg homologii z kilkoma receptorami powierzchni komórkowej, jakim jest receptor czynnika martwicy guza ( <i>tumour necrosis factor – TNF</i> ) lub receptor o niskim powinowactwie do czynnika wzrostu komórek nerwowych ( <i>nerve growth factor – NGF</i> ); monoklonalne przeciwciała anty APO-1 indukuje apoptozę.
Interferon-alfa (INF-alfa)		Gdy gen <i>int</i> koduje konieczny dla angiogenezy czynnik b wzrostu fibroblastów ( <i>b fibroblast growth factor – b FGF</i> ), INF-alfa hamuje angiogenezę i indukuje apoptozę w komórkach mięsaka Kaposiego w przebiegu AIDS
	IFN-gamma	Czynnik wzrostu hamujący apoptozę komórek przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej

co sugeruje że nie jest integralnym białkiem błony komórkowej. BAD w komórkach ssaków tworzy heterodimery z BCL-2 i BCL-X<sub>L</sub>, przy czym silniej się wiąże z BCL-X<sub>L</sub> niż z BCL-2. Ponadto BAD zastępuje BAX w heterodimerach BCL-X<sub>L</sub>/BAX i BCL-2/BAX. Przy czym zdolność ta zależy od stężenia BAX w komórce.

Inne białko nazwane BAG-1 może korzystnie wpływać na aktywność BCL-2 w hamowaniu śmierci komórki [51]. Wykazano, że BAG-1 *in vitro* ma zdolność do interakcji z BCL-2. Jednakże BAG-1 nie jest homologiczny z innymi członkami rodziny BCL-2.

Tak więc wśród członków rodziny *bcl-2* istnieją przeciwstawnie działające geny, z których jedne hamują (*bcl-2*, *bcl-x<sub>1</sub>*), a inne ułatwiają (*bax*, *bcl-x<sub>s</sub>*, *bak*, *bad*) śmierć komórki.

## INNE GENY REGULUJĄCE APOPTOZĘ

Chociaż rodzina *bcl-2* odgrywa rolę w kontrolowaniu śmierci komórki, także inne geny nie wykazujące homologii z *bcl-2* są istotne w tym procesie. W tabeli 3 przedstawiono geny regulujące apoptozę w układzie limfo-hemopoetycznym. Na rysunku 2 przedstawiono różne rodzaje odpowiedzi komórkowej na zewnętrzne i wewnętrzne czynniki sygnalizacyjne.

Na zakończenie należy stwierdzić, że problem zarówno rodziny genów *bcl-2*, jak i apoptoza komórek będąca wynikiem dynamicznego współdziałania różnych genów w zależności od sygnałów zewnętrznych i wewnętrznych jest daleka do wyjaśnienia. Prawdopodobnie dalsze badania rzucają nowe światło i skomplikują istniejące poglądy.

## LITERATURA

- [1] ALLEN PD, BUSTIN SA, NEWLAND AC. The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. *Blood Rev* 1993; **7**: 63–73.
- [2] ALLSOPP TE, WYATT S, PATERSON HF, DAVIES AM. The proto-oncogene BCL-2 can selectively neutrophilic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 1993; **73**: 295–307.
- [3] BAKHSHI A, WRIGHT JJ, GRANINGER W, STETO M, OWENS J, COSSMAN J, JENSEN JB, GOLDMAN P, KOSMEYER SJ. Mechanisms of the t(14;18) chromosomal translocation. Structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 2396–2400.
- [4] BISSONNETTE RP, ECHEVERRI F, MAHBOUBI A, GREEN DR. Apoptotic cell death induced by c-MYC is inhibited by BCL-2. *Nature* 1992; **359**: 552–553.
- [5] BOISE LH, GONZALEZ-GARCIA M, POSTEMS CE, DING L, LINDSTEN T, TURKA LA, MAO X, NUÑEZ G, THOMPSON CB. BCL-X, a BCL-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; **74**: 597–608.
- [6] CHITTENDEN T, HARRINGTON EA, O'CONNOR R, FLEMINGTON C, LUTZ R.J., EVAN GJ, GUILD BC. Induction of apoptosis by the BCL-2 homologue BAK. *Nature* 1995; **374**: 733–736.
- [7] CLEARY ML, SKLAR J. Nucleotide sequence of t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region bear a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 7439–7443.
- [8] DENG G, PODACK ER. Suppression of apoptosis in a cytotoxic T-cell line by interleukin 2-mediated gene transcription and deregulated expression of the protooncogene BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 2189–2193.

- [9]DOLE M, NUÑEZ G, MERCHANT AK, MAYBAUM J, RODE CK, BLOCH CA, CASTLE VP. BCL-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res* 1994; **54**: 3253–3259.
- [10]DURIE BGM, MASON DY, GILES F, VELA EE, KNIGHT J, WOLFF S, FOADI M, SAMSON D. Expression of the BCL-2 oncogene protein in multiple myeloma. *Blood* 1990; **75**: 347a.
- [11]FANIDI A, HARRINGTON EA, EVAN GJ. Cooperative interaction between c-MYC and BCL-2 proto-oncogenes. *Nature* 1992; **359**: 554–556.
- [12]FANG W, RIVARD JJ, MUELLER DL, BEHRES TW. Cloning and molecular characterization of mouse BCL-X in B and T lymphocytes. *J Immunol* 1994; **153**: 4388–4398.
- [13]FARROW SN, WHITE JHM, MARTINOU J, RAVEN T, PUN K-T, GRINHAM CJ, MARTINOU J-C, BROWN R. Cloning of a BCL-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 1995; **374**: 731–733.
- [14]GARCIA J, MARTINOU J, TSUJIMOTO Y, MARTINOU J-C. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the BCL-2 proto-oncogene. *Science* 1992; **258**: 302–304.
- [15]GONZALEZ-GARCIA M, PEREZ-BALLESTERO R, DING L, DUAN L, BOISE LH, THOMPSON CB, NUÑEZ G. BCL-X<sub>L</sub> is the major BCL-X mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development* 1994; **120**: 3033–3042.
- [16]GÓRA-TYBOR J, ROBAK T. Apoptoza – zaprogramowana śmierć komórki. *Post Hig Med Dośw* 1994; **48**: 209–225.
- [17]HAMILTON MS, BARKER HF, BALL J, DREW M, ABBOT SD, FRANKLIN JM. Normal and neoplastic human plasma cells express BCL-2 antigen. *Leukemia* 1991; **5**: 768–771.
- [18]HENGARTENER MO, HORVITZ HR. *C. elegans* cell survival gene CED-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene BCL-2. *Cell* 1994; **76**: 665–676.
- [19]HENGARTNER MO, ELLIS RE, HORWITZ HR. *Caenorhabditis elegans* gene CED-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; **356**: 494–499.
- [20]HOCKENBERY D.M., OLTVAIZ.N., YIN X-M, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. BCL-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; **75**: 241–251.
- [21]HOCKENBERY DM, ZUTTER M, HICKEY W, NAHN M, KORSMEYER SJ. BCL-2 protein is topographically restricted in tissues characterised by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6981–6985.
- [22]KERCKAERT JP, DEWEINDT C, TILLY H, QUIEF S, LECOCQ G, BASTARD C. LAZ 3, a new novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. *Nature Genet* 1993; **5**: 66–70.
- [23]KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **26**: 239–257.
- [24]KERR LD, DUCKETT CS, WAMSLEY P, ZHANG Q, CHIAO P, NABEL G, Mc KEITHAN TW, BAEUERLE PA, VERMA JM. The proto-oncogene BCL-3 encodes an I kappa B protein. *Genes Development* 1992; **6**: 2352–2363.
- [25]KIEFER MC, BRAUER MJ, POWERS VC, WU JJ, UMANSKY SR, TOMEI LD, BARR PJ. Modulation of apoptosis by the widely distributed BCL-2 homologue BAK. *Nature* 1995; **374**: 736–739.
- [26]KOCKI J, ROŻYŃKOWA D. Gen BCL-2 w patofizjologii limfocytów B. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 169–182.
- [27]KORSMEYER SJ. BCL-2 initiates a new category of oncogenes: Regulatory of cell death. *Blood* 1992; **80**: 879–886.
- [28]KOZOPAS KM, YANG T, BAUCHAN HL, ZHU P, CRAING RE. MCL-1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3516–3520.

- [29]KRAJEWSKI S, KRAJEWSKA M, SHABAİK A, WANG H-G, IRIE S, FONG L, REED JC. Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of BCL-X expression. *Cancer Res* 1994; **54**: 5501–5507.
- [30]LUKAS J, JADAYEL D, BARTKOVA J, NACHEVA E, DYER MJ, STRAUSS M, BARTEK J. BCL-1/cyclin D1 oncoprotein oscillates and subverts the G1 phase control in B-cell neoplasms carrying the t(11;14) translocation. *Oncogene* 1994; **9**: 2159–2167.
- [31]LINEY, ORLOFSKY A, BERGER MS, PRYSTOWSKY MB. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to BCL-2. *J Immunol* 1993; **151**: 1979–1988.
- [32]MA A, PENA JC, CHANG B, MARGOSION E, DAVIDSON L, ALT RW, THOMPSON CB. BCL-X regulates the survival of double positive thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4763–4767.
- [33]McDONNELL TJ, KORSMEYER SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14;18). *Nature* 1991; **349**: 254–256.
- [34]MIKI T, KWAMATA N, HIROSAWA S, AOKI N. Gene involved in the 3q27 translocation associated with B-cell lymphoma, BCL 5, encodes a Krüppel-like zinc finger protein. *Blood* 1994; **83**: 26–32.
- [35]MIYASHITA T, REED JC. BCL-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukaemia cell line. *Blood* 1993; **81**: 151–157.
- [36]MOTOYAMA N, WANG F, ROTH KA, SAWA H, NAKAYAMA K-I, NAKAYAMA K, NEGISHI J, SENJU S, ZHANG Q, FUJII S, LOH DY. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in BCL-X – deficient mice. *Science* 1995; **267**: 1506–1510.
- [37]NUÑEZ G, HOCKENBERY D, McDONNELL TM, SORENSEN CM, KORSMEYER SJ. BCL-2 maintains B cell memory. *Nature* 1991; **353**: 71–73.
- [38]NUÑEZ G, LONDON L, HOCKENBERY D, ALEXANDER M, McKEARN JP, KORSMEYER SJ. Deregulated BCL-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor deprived hematopoietic cell lines. *J Immunol* 1990; **144**: 3602–3610.
- [39]OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. BCL-2 heterodimerizes *in vitro* with a conserved homolog, BAX, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; **74**: 609–619.
- [40]PAZELLA P, TSE AGD, CORDELL JL, PULFORD KAF, GATTER KC, MASON DY. Expression of the BCL-2 oncogene protein is non specific for the t(14;18) chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990; **137**: 225–232.
- [41]RAFF MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; **356**: 397–400.
- [42]REED JC, HALDAR S, CROCE CM, CUDDY MP. Complementation by BCL-2 and c-HA-RAS oncogenes in malignant transformation of rat embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 4370–4374.
- [43]REED JC, TANAKA S. Somatic point mutations in the translocated BCL-2 genes of non-Hodgkins lymphomas and lymphocytic leukemias : Implications for mechanisms of tumor progression. *Leuk/Lymph* 1993; **10**: 157–163.
- [44]ROŻYŃKOWA D. Genetyczne regulacje apoptozy, programowanej śmierci komórek. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 303–318.
- [45]ROŻYŃKOWA D. Apoptoza doświadczalna: Modele indukcji *in vitro* i zastosowania. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 421–444.
- [46]SCHWARZE MMK, HAWLEY RG. Prevention of myeloma cell apoptosis by ectopic BCL-2 expression or interleukin 6-mediated upregulation of BCL-X<sub>L</sub>. *Cancer Res* 1995; **55**: 2262–2265.
- [47]SEDLAK TW, OLTVAI ZN, YANG E, WANG K, BOISE LH., THOMSON CB, KORSMEYER SJ. Multiple BCL-2 family members demonstrate selective dimerization with BAX. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7834–7838.



- [48]SENTMAN CL, SHUTTER JR, HOCKENBERY D, KANAGAWA O, KORSMEYER S.J. BCL-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991; **67**: 879–888.
- [49]SHINKOVICS J, HORVATH J. Apoptosis by genetic engineering. *Leukemia* 1994; **8** (Suppl. 1): S98–S102.
- [50]STRASSER A, HARRIS AW, CORY S. BCL-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 1991; **67**: 889–899.
- [51]TAKAYAMA S, SATO T, KRAJEWSKI S, KOCKEL K, IRIE S, MILLAN JA, REED JC. Cloning and functional analysis of BAG-1: A novel BCL-2 binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995; **80**: 279–284.
- [52]TANAKA S, SAITO K, REED JC. Structure-function analysis of the BCL-2 oncoprotein. Abolition of a heterologous transmembrane domain to portions of the BCL-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival. *J Biol Chem* 1993; **268**: 10920–10926.
- [53]TSUBATA T, WU J, HONJO T. B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD 40. *Nature* 1993; **364**: 645–648.
- [54]TSJIMOTO Y, CROCE CM. Analysis of the structure, transcripts and protein products of BCL-2, the gene involved in follicular lymphoma. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1986; **82**: 5214–5218.
- [55]UEHARA T, MIYAWAKI T, OHTA K, TAMARU Y, YOKOI T, NAKAMURA S, TANIGUCHI A. Apoptotic cell death of primed CD45R0<sup>+</sup> T lymphocytes in Epstein-Barr Virus induced infectious mononucleosis. *Blood* 1992; **80**: 452–458.
- [56]VAUX DL, CORY S, ADAMS JM. BCL-2 gene promotes hemopoietic cell survival and cooperates with c-MYC to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; **335**: 440–442.
- [57]VEIS DJ, SORENSON ChM, SHUTTER JR, KORSMEYER SJ. BCL-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys and hypopigmented hair. *Cell* 1993; **75**: 229–240.
- [58]WILLIAMS GT, SMITH ChA. Molecular regulation of apoptosis: Genetic control on cell death. *Cell* 1993; **74**: 777–779.
- [59]WYLLIE AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; **284**: 555–556.
- [60]WYLLIE AH. Apoptosis: Cell death in tissue regulation. *J Pathol* 1987; **153**: 313–321.
- [61]YANG E, ZHA J, JOCKEL J, BOISE LH, THOMPSON CB, KORSMEYER SJ. BAD, a heterodimeric partner for BCL-X<sub>L</sub> and BCL-2, displaces BAX and promotes cell death. *Cell* 1995; **80**: 285–291.
- [62]YE BH, LISTA F, Lo COCO F, KNOWLES DM, OFFIT K, CHAGENTI RS, DALLA-FEVERA R. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 1993; **262**: 747–750.
- [63]YIN X-M, OLTVAI ZN, KORSMEYER SJ. BH1 and BH2 domains of BCL-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with BAX. *Nature* 1994; **369**: 321–323.
- [64]YUNIS JJ, FRIZZERA G, OKEN MM, McKENNA J, THEOLOGIDES A, ARNESEN M. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. *New Engl J Med* 1987; **316**: 79–84.

*Redaktor prowadzący: Maria Olszewska.*

*Otrzymano: 5 maja 1996 r.*

*Przyjęto: 17 stycznia 1997 r.*

*Adres autorki: Klinika Hematologii AM w Lublinie,  
Lublin, ul. Jaczewskiego 8*



## RECEPTOR ANDROGENOWY – STRUKTURA, FUNKCJA ORAZ UDZIAŁ W NOWOTWORZENIU GRUCZOŁU KROKOWEGO

ANDROGEN RECEPTOR – STRUCTURE, FUNCTION,  
AND THEIR PARTICIPATION IN PROSTATE NEOPLASMS

Magdalena BRYŚ, Wanda Małgorzata KRAJEWSKA

Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki

*Streszczenie:* Praca zawiera aktualny stan wiedzy na temat struktury i funkcji receptora androgenowego (AR) i jego udziału w nowotworzeniu gruczołu krokowego. Zmiany w ekspresji genów supresorowych, onkogenów, czy genów, których produkty białkowe regulują transkrypcję, w tym genu receptora androgenowego, mogą wywierać wpływ na proces proliferacji komórek. Znaczny udział androgenów i ich receptora w rozwoju i różnicowaniu prostaty pozwala sugerować, iż mogą one być związane z procesem karcynogenezy tego gruczołu. Mutacje genu receptora androgenowego na skutek zaburzenia mechanizmu kontroli jego aktywności transkrypcyjnej przez ligand mogą przyczyniać się do uzyskania przez komórki nowotworowe przewagi nad komórkami prawidłowymi i rozjądzenia ogniska nowotworowego. Istnieje również prawdopodobieństwo, że mutacje wykrywane w genie *ar* mogą być epifenomenem odzwierciedlającym raczej niestabilność genomu komórki nowotworowej niż wskazującym na udział *ar* w procesie onkogenezy.

*Słowa kluczowe:* receptor androgenowy; gen, białko, funkcja; nowotwory gruczołu krokowego; mutacje receptora androgenowego

*Summary:* This review presents the contemporary knowledge on the androgen receptor structure and function, and their participation in prostate neoplasms. Expression changes of tumor suppressor genes, oncogenes, and transcription-regulating genes, including the androgen receptor gene, could alter the control of cellular proliferation. Because of the pivotal role of androgens and their receptor in development of the prostate, much attention has been focused on their potential role in prostatic cancer. Mutations in the androgen receptor gene could contribute to the selective advantage of cancer cells and exacerbation or progression of prostate cancer by abolishing normal ligand control of *ar* gene transcriptional activity. But there is the possibility that the mutations detected in the *ar* gene are an epiphenomenon, reflecting the genetic instability of neoplastic tissue, rather than implicating the *ar* in oncogenesis.

*Key words:* androgen receptor: gene, protein, function; prostatic neoplasms; androgen receptor mutations

## 1. WSTĘP

Receptor androgenowy (AR; ang. *androgen receptor*) jest jednym z receptorów wewnątrzkomórkowych o funkcji czynników transkrypcyjnych. Obok AR w grupie tej znajdują się: receptor glukokortykoidowy (GR; ang. *glucocorticoid receptor*), mineralokortykoidowy (MR; ang. *mineralocorticoid receptor*), progesteronowy (PR; ang. *progesterone receptor*) i estrogenowy (ER ang. *estrogen receptor*), a także receptory hormonów tarczycy (TR $\alpha$  i TR $\beta$ ; ang. *thyroid hormone receptor*), kwasu retinowego (RAR; ang. *retinoic acid receptor*) i witaminy D<sub>3</sub> (VDR; ang. *vitamin D receptor*) oraz tak zwane receptory sieroce (ang. *orphan receptors*), jak np. czynnik transkrypcyjny wiążący się z regionem regulatorowym genu owoalbuminy kury (COUP-TF; ang. *chicken ovoalbumin upstream promoter transcription factor*), indukowalny czynnik wzrostu nerwu –\*39 B (NGFI-B; ang. *nerve growth factor induced-B*), czy ulegające ekspresji po ekspozycji na czynnik wzrostu nerwu (NGF; ang. *nerve growth factor*) białko Nur77 (ang. *nuclear receptor 77*). Hormony za pośrednictwem receptorów wewnątrzkomórkowych przekazują pochodzące z zewnątrz sygnały, które mogą mieć wpływ na tak istotne procesy, jak wzrost, różnicowanie i śmierć komórki. Regulacja ta odbywa się przez aktywację lub hamowanie ekspresji określonych genów [6, 23, 28, 40, 44, 56, 62, 63, 66, 69].

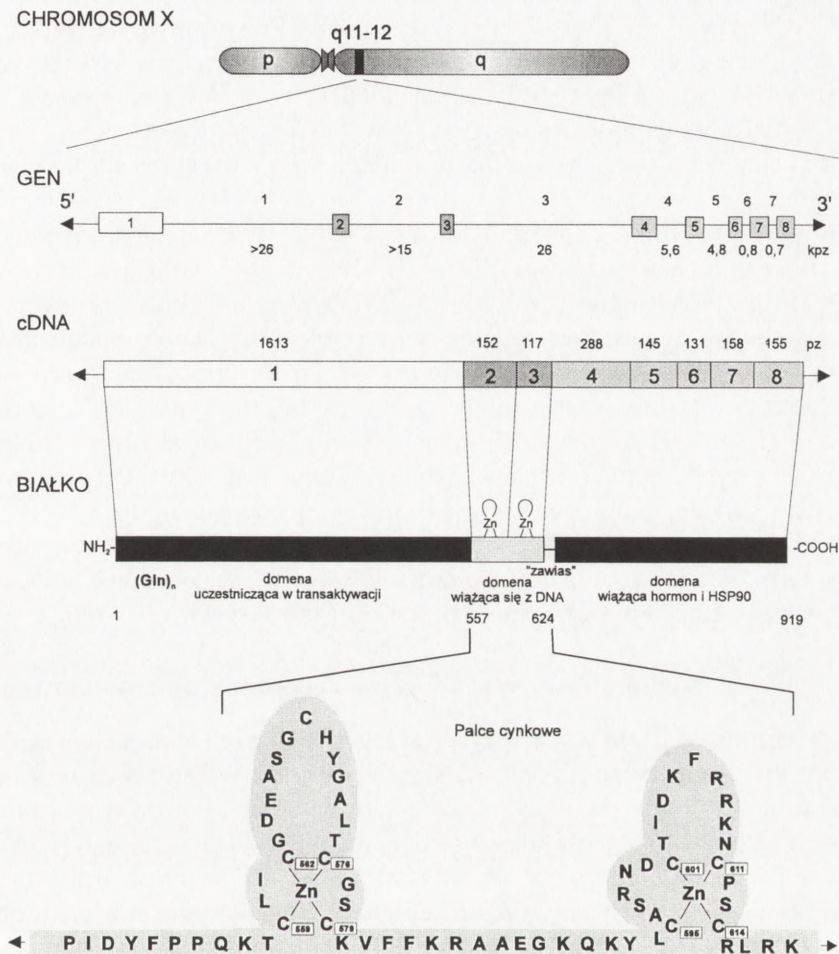
Gruczoł krokowy (stercz) jest androgeno-zależnym gruczołem męskiego układu płciowego. Rak gruczołu krokowego jest jednym z najczęściej rozpoznawanych nowotworów złośliwych powodujących zgony mężczyzn. Molekularne podstawy transformacji nowotworowej tego gruczołu pozostają niewyjaśnione, niemniej sugeruje się, że znaczący udział w tym procesie mają androgeny. Ekspresja i mutacje genu kodującego receptor androgenowy pozostają w centrum zainteresowania wielu grup badawczych [41, 49].

## 2. RECEPTOR ANDROGENOWY STRUKTURA I FUNKCJA GENU ORAZ BIAŁKA

### Gen receptora androgenowego

Zarówno gen receptora androgenowego, jak i kodowane przez niego białko są strukturalnie i funkcjonalnie zbliżone do innych receptorów steroidowych (rys.1). Gen *ar* stanowiący przez pojedynczy allel, zlokalizowany jest na dłuższym ramieniu chromosomu X (Xq11–12) i zawiera 75–90 kpz genomowego DNA. Jego region kodujący (ok. 2757 pz otwartej ramki odczytu) składa się z ośmiu eksonów oznaczanych 1-8 lub A-H, przedzielonych intronami o długości do ponad 26 kpz [41, 49]. W dystalnej części eksonu 1, po jego stronie 5', znajduje się region





Rys.1. Gen i białko receptora androgenowego (wg [41], zmienione). Gen receptora androgenowego zlokalizowany jest w pericentrycznym regionie dłuższego ramienia chromosomu X (Xq11-12). Stanowi go 75–90 kpz genomowego DNA, osiem eksonów (*numery wewnątrz prostokątów*) przedzielonych intronami (*numery nad schematem*) o długości wahającej się od 0,7 kpz do ponad 26 kpz (*liczby pod schematem*). cDNA zawiera region kodujący o długości około 2760 pz (*wielkość poszczególnych eksonów podana nad schematem*). Ekson 1 koduje domenę N-kończową odpowiedzialną za transaktywację, a eksony 2 i 3 domenę wiążącą się z DNA o strukturze palców cynkowych. Koniec 5' eksonu 4 koduje fragment odpowiedzialny za transport receptora androgenowego do jądra komórkowego, a koniec 3' eksonu 4 oraz eksony 5–8 kodują domenę wiążącą hormon i białko HSP90

zawierający kodon CAG powtarzający się średnio  $21 \pm 2$  razy, kodujący sekwencję poliglutaminową. U osobników z chorobą Kennedy'ego liczba powtórzeń kodonu CAG wynosi nawet 40–72 [30, 32, 33, 41]. Przypuszcza się, że regiony bogate w glutaminę, charakterystyczne także dla wielu innych czynników transkrypcyjnych, stanowią główną część domen odpowiedzialnych za transaktywację.

Badania nad promotorem genu *ar* wykazały, że główne miejsce inicjacji transkrypcji (TIS I; ang. *transcription initiation site I*) odpowiada reszcie adenozyliny zlokalizowanej około 1100 pz po stronie 5' od inicjującego translację kodonu metioniny. Po stronie 3' TIS I, w odległości 11 nukleotydów, znajduje się drugie miejsce inicjacji transkrypcji (TIS II). Oba miejsca startu transkrypcji są przypuszczalnie regulowane przez różne sekwencje promotorowe. Funkcja TIS II jest dotychczas nieznaną. Promotor genu *ar* wykazuje znaczne podobieństwo do promotorów genu *gr* czy *pr*, nie zawierających typowych sekwencji TATA lub CAAT. Promotory te zawierają natomiast elementy bogate w pary GC, miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego SP1 (ang. *specific protein 1*), jak również miejsca wiążące wiele innych czynników transkrypcyjnych, takich jak AP2 (ang. *activator protein-2*) oraz sekwencję homopurynową i sekwencję odpowiedzi na cAMP (CRE; ang. *cAMP response element*). Określono, że minimalny fragment promotora ludzkiego genu *ar* niezbędny dla zachowania jego aktywności obejmuje sekwencję od -74 do 84 nukleotydu wokół miejsca inicjacji transkrypcji [37, 41].

### Regulacja ekspresji genu receptora androgenowego

Regulacja, jakiej podlega ekspresja genu receptora androgenowego zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji, zależy od wieku organizmu oraz od typu tkanek i komórek, w których proces ten następuje. Na uwagę zasługuje fakt, że *ar* i mRNA dla *ar* podlegają odmiennej regulacji przez androgeny, nawet w obrębie komórek tego samego typu. W komórkach eksponowanych na działanie androgenów obserwuje się wzrost poziomu receptora androgenowego w wyniku obniżenia degradacji białka. U szczurów poddanych kastracji stwierdzono natomiast wzrost poziomu mRNA receptora androgenowego. Zjawisko to ulega rewersji w wyniku podania zwierzętom androgenów. W przypadku innych receptorów steroidowych wykazano, że negatywna regulacja poziomu mRNA odpowiedniego receptora następuje przez zmniejszenie częstości inicjacji transkrypcji i/lub skrócenie okresu półtrwania mRNA [8, 41, 61]. Przypuszcza się, że podobnie jak w przypadku receptora glukokortykoidów sekwencje w obrębie domeny wiążącej się z DNA mogą być niezbędne dla autoregulacji ekspresji genu *ar*. Poza androgenami również inne hormony wpływają na regulację ekspresji genu receptora androgenowego i stabilności jego mRNA w różnych typach komórek i tkanek. Zaobserwowano, że folitropina powoduje zarówno wzrost poziomu mRNA, jak i receptora androgenowego w komórkach Sertoliego, prawdopodobnie za pośrednictwem cAMP. Z kolei w komórkach

raka prostaty linii LNCaP stwierdzono obniżenie ilości mRNA receptora androgenowego przez czynnik wzrostu naskórka (EGF; ang. *epidermal growth factor*) w stopniu wyższym niż obserwowano pod wpływem androgenów [41].

### Domeny funkcjonalne receptora androgenowego

Receptor androgenowy jest białkiem o masie cząsteczkowej 110–114 kDa składającym się z 910–919 aminokwasów. Rozbieżność dotycząca wielkości białka wynika z różnej długości odcinka poliglutaminowego kodowanego przez powtarzający się triplet CAG, zlokalizowany w eksonie 1 [41, 49].

W strukturze receptora androgenowego wyodrębnia się domeny odpowiedzialne za główne jego funkcje, tj. transaktywację genów, wiązanie się z DNA, transport receptora do jądra komórkowego i przyłączenie hormonu (rys.1.) [2, 23, 49, 66]. Struktura wyższego rzędu receptora androgenowego jest dotychczas nieokreślona, ale przypuszcza się, że jest ona podobna do struktury receptora glukokortykoidów, dla którego strukturę domeny wiążącej się z DNA określono metodą spektroskopii rezonansu jądrowego i analizy krystalograficznej [41].

#### Domena N-końcowa

Domena ta kodowana jest przez ekson 1 i stanowi ponad połowę całego białka (reszty aminokwasowe 1-537). Wykazuje ona niski stopień homologii i dużą zmienność liczby aminokwasów w porównaniu z pozostałymi receptorami steroidowymi. Koniec aminowy tej domeny może na skutek interakcji z innymi regionami białka przyczyniać się do tworzenia struktury trzeciorzędowej receptora. Między aminokwasami 51-211, 141–338 oraz 244–360 zidentyfikowano sekwencje odpowiedzialne za transaktywację genów [22, 54]. Przypuszcza się, że w domenie tej mogą być zlokalizowane także inne obszary odpowiedzialne za regulację ekspresji genów, jak również wpływające na aktywność promotora genu *ar*. W przeciwieństwie do pozostałych receptorów steroidowych, *ar* człowieka, szczura i myszy zawiera w domenie N-końcowej regiony o charakterze homopolimerów. W jej części N-terminalnej znajduje się sekwencja złożona z  $21 \pm 2$  reszt glutaminowych (aminokwasy 58–79). Między resztami 372–379 występuje sekwencja 9 reszt proliny. W pobliżu domeny wiążącej się z DNA mieści się kolejna sekwencja, składająca się z około 24 reszt glicyny (aminokwasy 449–472). Funkcja tych regionów w receptorze androgenowym jest dotychczas niewyjaśniona, jakkolwiek badania nad czynnikami transkrypcyjnymi pozwalają przypuszczać, że regiony te przez oddziaływania białko-białko z innymi czynnikami transkrypcyjnymi są istotne dla procesu transkrypcji [2, 41, 66]. Stwierdzono, iż syntetyczne poliglutaminowe łańcuchy przyjmują strukturę, która *in vivo* może oddziaływać na zasadzie polarnego zamka błyskawicznego wiążącego specyficzne białka uczestniczące w transaktywacji [38].



### Domena wiążąca się z DNA

W centralnej części białka AR (reszty aminokwasowe 538–627) zlokalizowany jest obszar bogaty w reszty cysteiny, kodowany przez eksony 2 i 3, który zawiera domenę (reszty aminokwasowe 557–624) odpowiedzialną za wiązanie się receptora ze specyficzną sekwencją DNA określaną jako sekwencja odpowiedzi androgenowej (ARE; ang. *androgen response element*). Konserwatywne ewolucyjnie reszty cysteinowe, obecne we wszystkich receptorach steroidowych, połączone wiązaniami koordynacyjnymi z atomami cynku warunkują strukturę przestrzenną dwóch palców cynkowych [40, 41, 52, 53, 66]. Pierwszy palec cynkowy (reszty aminokwasowe 559–579) kodowany jest przez ekson 2, natomiast drugi (reszty aminokwasowe 595–619) – przez ekson 3. Sekwencję aminokwasową domeny wiążącej się z DNA wszystkich receptorów steroidowych charakteryzuje duża konserwatywność. Palce cynkowe receptora androgenowego wykazują w 80% identyczną sekwencję aminokwasową z receptorem glukokortykoidów, mineralokortykoidów i progesteronowym. Tak jak we wszystkich receptorach steroidów, domena wiążąca się z DNA wykazuje wysoką specyficznosc oddziaływania z DNA [27]. Trzy aminokwasy pierwszego palca cynkowego – glicyna 577, seryna 578 i walina 581 są odpowiedzialne za wiązanie ze specyficzną sekwencją ARE zlokalizowaną w obszarach wzmacniaczy transkrypcji, zwykle po stronie 5' genu podlegającego regulacji. Drugi palec cynkowy, wysoce zasadowy, stabilizuje oddziaływania receptor-DNA przez kontakt ze szkieletem cukrowo-fosforanowym DNA oraz pośredniczy w dimeryzacji receptora. Na końcu karboksylowym domeny wiążącej się z DNA znajduje się arginina i lizyna, które są częścią regionu odpowiedzialnego za transport receptora do jądra komórkowego [40, 41, 63, 66].

#### Region odpowiedzialny za transport receptora do jądra komórkowego

Między domeną wiążącą się z DNA a domeną wiążącą ligand znajduje się region o sekwencji aminokwasowej wykazującej niski stopień homologii z innymi receptorami steroidów ("zawias", ang. *hinge region*). Region ten jest kodowany przez koniec 5' eksonu 4 (aminokwasy 628–669) i zawiera sekwencję sygnałową pośredniczącą w transporcie receptora androgenowego z cytosolu do miejsca docelowego w jądrze komórkowym. Stanowią ją następujące aminokwasy zlokalizowane między resztą 629 i 633: arginina, lizyna, leucyna, lizyna, lizyna [41, 54].

#### Domena wiążąca ligand

Domena odpowiedzialna za wiązanie androgenów jest karboksyterminalną domeną receptora androgenowego kodowaną przez koniec 3' eksonu 4 i eksony 5-8,

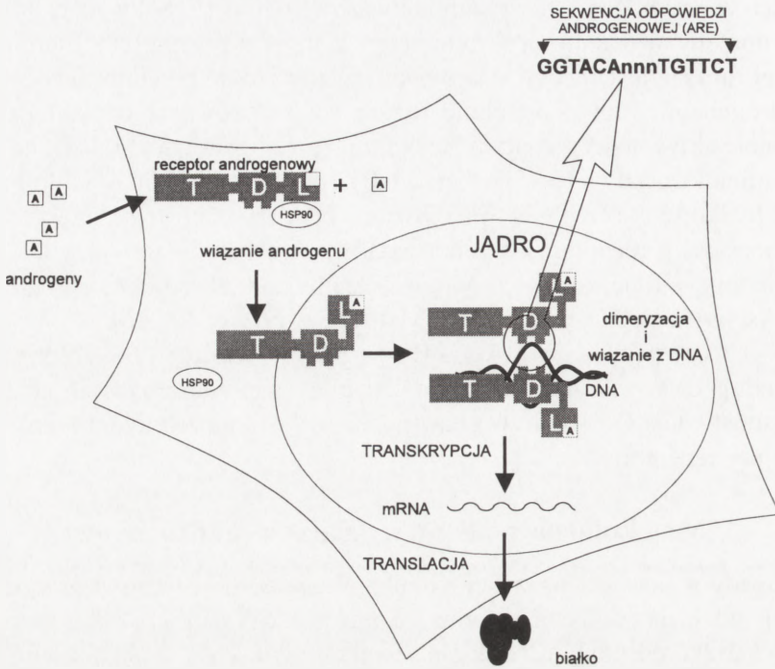


zawierającą w przybliżeniu reszty aminokwasowe 670–919. Sekwencja aminokwasowa tej domeny wykazuje 50% homologii z innymi receptorami steroidowymi. Główną jej funkcją jest specyficzne, wykazujące wysokie powinowactwo, łączenie się z androgenami. Prawdopodobnie region ten jest również odpowiedzialny za zahamowanie aktywności receptora niezwiązanego z ligandem [54]. Obszar zawarty między aminokwasami 715–737 bierze udział w wiązaniu białek inhibitorowych, takich jak białko szoku cieplnego HSP90 (ang. *heat shock protein*), a także odgrywa rolę w dimeryzacji receptora. Wyniki badań pozwalają również przypuszczać, że w domenie tej znajduje się region odpowiedzialny za transaktywację [41, 54]. Substytucje: Asp→His/Asn w pozycji 686, Met→Ile w pozycji 742, Met→Ile w pozycji 780, Arg→Cys w pozycji 840, Arg→His w pozycji 855, czy Ile→Met w pozycji 869, powodują całkowite lub częściowe zahamowanie wiązania androgenów, podczas gdy substytucja Gln→Glu w pozycji 798 wpływa na zaburzenie funkcji transaktywacyjnej receptora [4, 22].

### Molekularne podstawy działania androgenów

Androgeny w postaci związanej z białkami osocza transportowane są do tkanki docelowej, gdzie po oddysocjowaniu od nośnika dyfundują do komórki i łączą się z wewnątrzkomórkowym białkiem receptorowym (rys. 2.). Połączenie to stymuluje zmiany konformacyjne receptora i transport do jądra komórkowego, ułatwia jego dimeryzację i połączenie ze specyficzną sekwencją DNA, a w konsekwencji regulację transkrypcji określonego genu [41, 55]. Pewien wpływ na optymalizację tego procesu ma także temperatura środowiska reakcji [45]. Z receptorem androgenowym mogą łączyć się różne androgeny i inne steroidy. Jednak ma on największe powinowactwo dihydrotestosteronu, a następnie do testosteronu [3, 41]. Niskie powinowactwo receptor androgenowy wykazuje do hormonów kory nadnerczy, takich jak: dehydroepiandrosteron, androstenedion i do nieandrogenowych steroidów, takich jak: progesteron i estradiol [41, 49, 66].

Przyłączenie androgenu do receptora indukuje zmiany strukturalne przekształcające receptor w formę aktywną. Analogicznie jak w innych receptorach steroidowych ligand powoduje oddysocjowanie związanego z receptorem białka HSP90. Odłączenie białek inhibitorowych odsłania miejsca funkcjonalne i indukuje zmiany konformacyjne konieczne dla transportu receptora do jądra komórkowego oraz dimeryzację i łączenie się z DNA. Przypuszcza się, że we wszystkich receptorach steroidowych białko HSP90 nie odgrywa znaczącej roli w transaktywacji *per se*, natomiast bierze udział w transdukcji sygnału [19, 48, 57]. Obok białka HSP90 zidentyfikowano wiele innych białek współdziałających z receptorami steroidów. Należą do nich między innymi białko HSP70 oraz białko p55 należące do rodziny disulfido-izomeraz białek (PDI; ang. *protein disulfide isomerase*) [29].



Rys. 2. Sekwencja zdarzeń związanych z regulacją transkrypcji przez androgeny (wg [41], zmienione). Pierwszym etapem jest wiązanie androgenu z wewnątrzkomórkowym receptorem, co powoduje odłączenie białek inhibitorowych (np. HSP90) i gotowość receptora do wiązania się z DNA. W jądrze komórkowym *ar* ulega dimeryzacji i łączy się z ARE – specyficzną sekwencją odpowiedzi androgenowej zlokalizowaną w regionie regulatorowym określonego genu. A – androgeny, T – domena uczestnicząca w transaktywacji, D – domena wiążąca się z DNA, L – domena wiążąca hormon i HSP90, HSP90 – białko szoku cieplnego o m.c. 90 kDa

Przyłączenie androgenu stabilizuje receptor, co przejawia się wyższym poziomem immunoreaktywnego białka, jak również wyższym poziomem jego fosforylacji. Funkcją jaką pełni fosforylacja jest dotąd nieznaną. Receptor androgenowy jest fosforylowany zarówno w obecności, jak i nieobecności hormonu i obie jego formy mają duże powinowactwo do androgenu. [24, 41].

Związanie androgenu jest niezbędne dla specyficznego łączenia się z DNA i funkcji transaktywacyjnej receptora typu dzikiego, chociaż badania *in vitro* wykazały, że zmutowany *ar* z delecją w domenie wiążącej ligand może indukować transkrypcję w nieobecności hormonu. Wyniki te sugerują, że w nieobecności androgenu, domena wiążąca hormon w przypadku niezmutowanego białka działa jako represor regionów odpowiedzialnych za transaktywację [41].

Receptor androgenowy przed przyłączeniem androgenu jest prawdopodobnie zlokalizowany w cytosolu, jednak ścisła lokalizacja nie jest znana [6, 18, 23, 66]. W połączeniu z hormonem AR jest bezsprzecznie umiejscowiony w jądrze ko-

mórkowym, gdzie w postaci homodimeru łączy się z ARE genu docelowego. Przyłączenie receptora do sekwencji odpowiedzi hormonalnej reguluje poziom transkrypcji, prawdopodobnie przez interakcję z innymi elementami kompleksu transkrypcyjnego. Badania *in vitro* pozwoliły stwierdzić, że AR, podobnie jak GR, PR i MR oddziałuje z sekwencją 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3' [2, 9, 53, 66]. Krytycznymi dla wiązania i funkcji AR *in vivo* wydają się pozycje 2, 3, i 5 w każdym odcinku połówkowym. Cleutjens i wsp. [10] wykazali, że sekwencja AGAACAgcaAGTGCT funkcjonuje identycznie jak typowa sekwencja ARE.

Znaczna różnorodność regulowanych przez androgeny genów oraz fakt, iż podstawą tego procesu jest łączenie się receptora z niezmiennym regionem odpowiedzi hormonalnej, wskazuje jednoznacznie na konieczność istnienia niereceptorowych czynników warunkujących swoistość tego procesu [2, 23, 40, 42, 63, 66]. Potwierdzeniem tego są między innymi badania Adlera i wsp. [1] nad androgenową regulacją ekspresji genu *slp* myszy (ang. *mouse sex-limited protein*). Wykazały one oprócz konieczności istnienia sekwencji ARE, także obecność elementów współdziałających, umiejscowionych w obrębie sekwencji wzmacniającej genu *slp*. Badania Scarletta i Robins [50] pozwoliły stwierdzić, że jednym z czynników niereceptorowych współdziałających w hormonalnej regulacji transkrypcji genu *slp* myszy może być czynnik transkrypcyjny Oct-1 (ang. *octamer transcription factor*). Podobny mechanizm funkcjonowania wykazują również receptory innych steroidów [20, 35, 43, 46, 47, 57, 58, 59, 70]

### 3. NOWOTWORY GRUCZOŁU KROKOWEGO A MUTACJE RECEPTORA ANDROGENOWEGO

Gruczoł krokowy, jego wzrost i stan funkcjonalny podlegają kontroli endokrynej podczas ontogenezy. Hormony wytwarzane przez jądra, jak również ich metabolity, wpływają w istotny sposób na różnicowanie zarówno prawidłowych, jak i patologicznych komórek prostaty [31, 34, 49]. Mimo iż niepodważalny jest udział androgenów w procesie transformacji nowotworowej gruczołu krokowego, dokładne nakreślenie tego procesu pozostaje w sferze hipotez [5, 11, 49, 68]. Nadal otwarta pozostaje kwestia odmiennej lub wspólnej genetyki łagodnego rozrostu i raka tego gruczołu [16, 60]. Nie wytypowano także żadnego onkogenu czy genu supresorowego, którego mutacje można by, z dużym prawdopodobieństwem, przyjąć za przyczynę powstawania nowotworów prostaty [7, 41, 68].

Znacząca funkcja, jaką odgrywają w rozwoju gruczołu krokowego androgeny i receptor androgenowy, nasuwa przypuszczenie o udziale tych czynników w procesie nowotworzenia prostaty. Hipotetyczny model współdziałania androgenów i

Tabela 1. Mutacje receptora androgenowego w nowotworach gruczołu krokowego

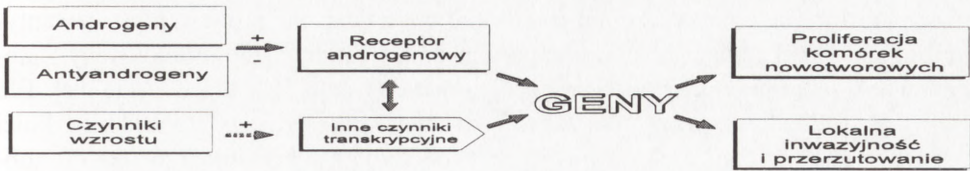
Źródło	Ekson/domena	Kodon/aminokwas	Typ mutacji	Piśmiennictwo
Rak prostaty guz pierwotny	1(A)/T	(CAG) <sub>n</sub> /(Gln) <sub>n</sub>	polimorfizm długości	[21, 51]
Rak prostaty guz pierwotny	1(A)/T	(GGC) <sub>n</sub> /(Gly) <sub>n</sub>	polimorfizm długości	[21]
Rak prostaty przerzuty do kości	3(C)/D	595 G→A/ Cys→Tyr	substytucja	[wg 25]
Rak prostaty przerzuty do kości	3(C)/D	605 A→G/ Lys→Arg	substytucja	[wg 25]
Rak prostaty guz pierwotny	4(D)/L	701 T→A/ Leu→His	substytucja	[17, 64]
Rak prostaty guz pierwotny	4(D)/L	715 G→A/ Val→Met	substytucja	[12]
Rak prostaty guz pierwotny	5(E)/L	726 G→T/ Arg→Leu	substytucja	[13]
Rak prostaty guz pierwotny	5(E)/L	730 G→A/ Val→Met	substytucja	[36]
Rak prostaty przerzuty do kości	6(F)/L	792 A→G/ Gln→Arg	substytucja	[wg 25]
Rak prostaty guz pierwotny	6(F)/L	798 C→G/ Gln→Glu	substytucja	[wg 25]
Rak prostaty przerzuty do kości	7(G)/L	860 A→G/ Thr→Ala	substytucja	[wg 25]
Linia komórkowa LNCaP	8(H)/L	868 A→G/ Thr→Ala	substytucja	[67]
Rak prostaty guz pierwotny	8(H)/L	877 A→G/ Thr→Ala	substytucja	[17, 64]
Linia komórkowa LNCaP		jw.		[15]
Rak prostaty przerzuty do kości		877 T→C/ Thr→Ser	substytucja	
Rak prostaty przerzuty do kości	8(H)/L	902 A→G/ Gln→Arg	substytucja	[wg 25]

T – domena uczestnicząca w transaktywacji, D – domena wiążąca się z DNA, L – domena wiążąca hormon i HSP90

ich receptorów z czynnikami wzrostu i czynnikami transkrypcyjnymi przedstawia rysunek 3 [2, 23, 31, 40, 66].

Wyniki szeregu prac wskazują na występowanie mutacji w obrębie receptora androgenowego w komórkach nowotworowych prostaty (tab. 1). Mutacje receptora androgenowego wykrywane są głównie w zaawansowanych stadiach raka prostaty [12, 13, 15, 36, 49, 64, 65]. Przypuszcza się, że mutacje te mogą przyczyniać się do wytworzenia przewagi komórek patologicznych nad prawidłowymi i do pro-





Rys. 3. Model kontroli proliferacji i inwazyjności komórek nowotworowych w gruczole krokowym przez receptor androgenowy, czynniki wzrostu i inne czynniki transkrypcyjne (wg [43], zmienione)

gresji raka poprzez zaburzenie fizjologicznej, regulowanej przez ligand aktywności transkrypcyjnej genu receptora. Ponadto mutacje w domenie wiążącej ligand mogą powodować wystąpienie zjawiska aktywowania genów przez receptor niezwiązany z hormonem.

W eksonie 1 receptora androgenowego obserwuje się występowanie polimorfizmu w regionie zawierającym powtórzenia kodonu CAG. Schoenberg i wsp. [51] badając komórki raka prostaty stwierdzili w genie receptora androgenowego obecność dwóch typów takich fragmentów, tj. zawierających 24 i 18 powtórzeń kodonu CAG. Mimo, iż długości obu regionów odpowiadają wartościom przyjętym dla tkanki prawidłowej prostaty, wydaje się, że ta niestabilność genu *ar* ma charakter patologiczny [30, 51]. Podobne obserwacje przyniosły badania Irvine'a i wsp. [21]. W locus *ar* w komórkach raka prostaty pobranych od mężczyzn trzech różnych ras wykazali oni obecność regionów polimorficznych o długości od 9 do 29 powtórzeń kodonu CAG (Gln) oraz od 8 do 17 powtórzeń kodonu GGC (Gly). Autorzy sugerują pozytywną korelację między skróceniem długości regionu polimorficznego CAG i/lub GGC, wyższą zdolnością aktywacji transkrypcji genów docelowych i ryzykiem zachorowania na raka prostaty.

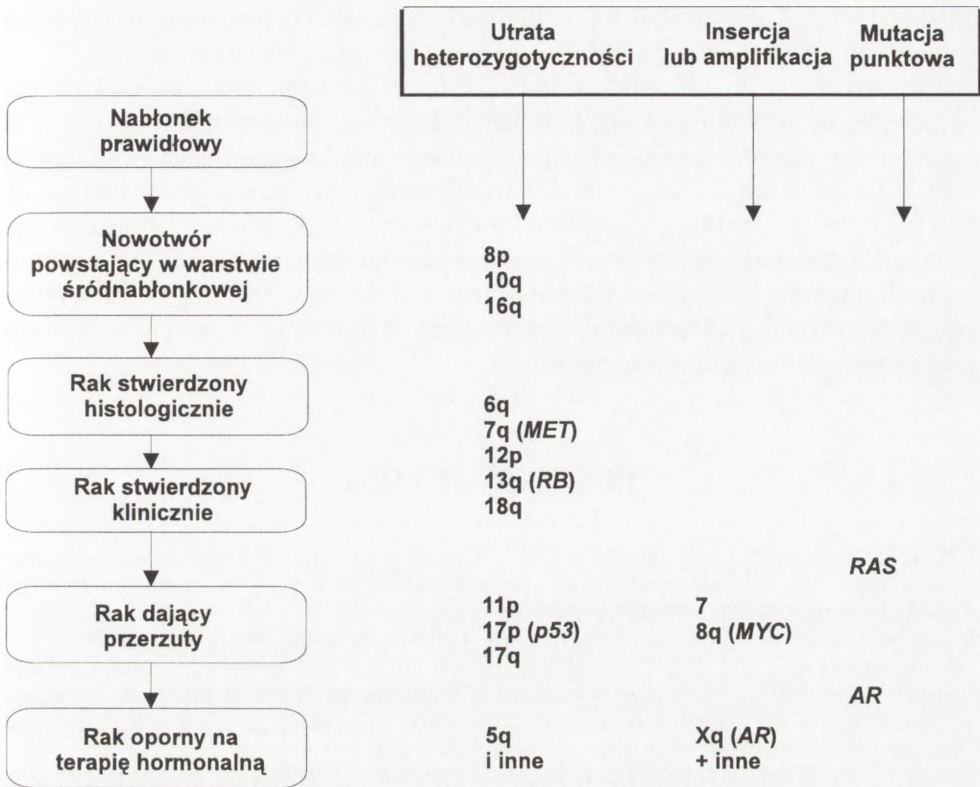
Większość pozostałych mutacji wykazanych w komórkach raka prostaty ma charakter substytucji i wykrywana jest w minimalnym odsetku badanych przypadków. Suzuki i wsp. [64] stwierdzili mutację genu receptora androgenowego w kodonie 701 (T→A, substytucja Leu→His) w jednym przypadku zaawansowanego raka prostaty. Badaniami objętych było siedem przypadków raka w stadium B oraz osiem w stadiach zaawansowanych po hormonoterapii. Mutację w kodonie 715 (G→A, substytucja Val→Met) Culig i wsp. [12] zaobserwowali również w jednym z siedmiu przebadanych zaawansowanych raków prostaty. Zamiana waliny 715, występującej w tej pozycji także w receptorze progesteronowym i mineralokortykoidowym, na metioninę, obecną w receptorze estrogenowym, nie powoduje zmian

funkcjonalnych receptora po przyłączeniu testosteronu czy dihydrotestosteronu. Analożyczną substytucję Val→Met w kodonie 730 zaobserwowali Newmark i wsp. [36]. W przypadku obu mutacji odmienna od prawidłowej aktywność receptora następuje dopiero po przyłączeniu metabolitów testosteronu, progesteronu, czy antyandrogenów wskazując, że w domenie wiązania ligandu różne aminokwasy zaangażowane są w przyłączenie hormonu i transaktywację [12, 36, 39, 41, 49]. Elo i wsp. [13] w jednym przypadku zaawansowanego raka prostaty stwierdzili z kolei występowanie mutacji o charakterze prezygotycznym w kodonie 726 (G→T, substytucja Arg→Leu). Przebadano łącznie 29 przypadków raka prostaty i 11 łagodnego rozrostu stercza. Pozycja 726 znajduje się w wysoce konserwatywnym regionie receptorów androgenowego, progesteronowego i glukokortykoidowego. W receptorze mineralokortykoidowym w pozycji tej znajduje się zasadowa lizyna, natomiast w receptorze estrogenowym obojętna walina. Znaczne podobieństwo leucyny do waliny powoduje wzrost powinowactwa zmutowanego receptora androgenowego do estradiolu. Badania prowadzone na linii komórkowej raka prostaty LNCaP (ang. *lymph node carcinoma of the prostate*) pozwoliły wykryć mutację w pozycji 868 (A→G, substytucja Thr→Ala). W tak zmutowanym receptorze następuje współzawodniczenie między androgenami a progestagenami, estradiolem i antyandrogenami o miejsce wiązania [14, 49, 67].

Znaczną częstość mutacji, w porównaniu z poprzednio omawianymi, zaobserwowano w kodonie 877 (A→G, substytucja Thr→Ala). Gaddipati i wsp. [15] oraz Suzuki i wsp. [64] wykazali ją w 6 z 24 przebadanych przypadków raka prostaty i w linii komórkowej LNCaP. Mutacja ta została wytypowana jako jedyny do tej pory "gorący region" (ang. *hot-spot*) genu receptora androgenowego.

Na uwagę zasługują także badania Koivisto i wsp. [26], którzy analizowali komórki raka prostaty pochodzące od pacjentów poddanych hormonoterapii. Stwierdzili oni zarówno zwiększenie liczby kopii chromosomu X, jak i amplifikację samego genu receptora androgenowego w nowotworach będących wznową. Przyczyną tego zjawiska jest prawdopodobnie stosowanie terapii hormonalnej pozbawionej androgenów, co powoduje zachwianie równowagi na korzyść nadmiernej proliferacji komórek i odnawianie się ognisk nowotworowych w gruczole krokowym. Sugestia ta pozostaje w zgodzie z wynikami pracy Visakorpiego i wsp. [68]. Amplifikacja, jak również mutacje punktowe genu receptora androgenowego obserwowane są najczęściej u pacjentów poddanych hormonoterapii, w nowotworach o znacznym stopniu zaawansowania (rys. 4.).

Omówione powyżej wyniki badań dotyczą tkanek zmienionych nowotworowo, pobranych z guza pierwotnego oraz linii komórkowych. Natomiast badania przeprowadzone przez Taplina i wsp. [cyt. wg poz. 25] dotyczą komórek pochodzących z przerzutów raka prostaty do kości pobranych od trzech pacjentów. Stwierdzono w nich występowanie mutacji punktowej w pozycji 877 (T→C, substytucja Thr→Ser), czyli "gorącym regionie" u pierwszego z pacjentów oraz w pozycjach 595 (G→A,



Rys. 4. Schemat molekularnego podłoża transformacji nowotworowej gruczołu krokowego (wg [68], zmienione). Zaznaczono mutacje w obrębie chromosomów i określonych genów, które mogą mieć udział w nowotworzeniu prostaty

substytucja Cys→Thr), 605 (A→G, substytucja Lys→Arg), 860 (A→G, substytucja Thr→Ala) i 902 (A→G, substytucja Gln→Arg) u drugiego z pacjentów. W materiale pobranym od trzeciego pacjenta nie stwierdzono żadnych mutacji w genie receptora androgenowego.

#### 4. UWAGI KOŃCOWE

Receptor androgenowy będący jednocześnie ogniwem w endokrynnej drodze przekazywania informacji, jak również czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję wielu genów, stanowi nadal wyzwanie dla biologii molekularnej. Dobrze



poznany pod względem strukturalnym pozostaje jednak prawie całkowicie niezbadany pod względem funkcjonalnym. Molekularne podstawy procesu transaktywacji genów, jak również w większości same geny pozostają nieznanne.

Znaczny udział androgenów w rozwoju i różnicowaniu gruczołu krokowego, jak również liczne hipotezy związane z ich udziałem w transformacji nowotworowej tego narządu, skłaniają do podejmowania prac badawczych wyjaśniających wzajemną korelację tych zjawisk. Z dużym prawdopodobieństwem można chyba stwierdzić, że u podstaw nowotworzenia gruczołu krokowego nie będą znajdowały się mutacje receptora androgenowego. Niemniej, nadal w centrum zainteresowania badaczy pragnących wyjaśnić mechanizm karcynogenezy prostaty pozostaje regulowana przez androgeny transaktywacja genów i jej związek z działaniem czynników wzrostu i innych czynników transkrypcyjnych.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ADLER AJ, SCHELLER A, ROBINS DM. The stringency and magnitude of androgen-specific gene activation are combinatorial functions of receptor and nonreceptor binding site sequences. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 6326–6335.
- [2] BEATO M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989; **56**: 335–344.
- [3] BENTVELSEN FM, BRINKMANN AO, VAN DER SCHOOT P, VAN DER LINDEN JETM, VAN DER KWAST TH, BOERSMA WJA, SCHRÖDER FH, NIJMAN JM. Developmental pattern and regulation by androgens of androgen receptor expression in the urogenital tract of the rat. *Mol Cell Endocrinol* 1995; **113**: 245–253.
- [4] BEVAN CL, BROWN BB, DAVIES HR, EVANS BAJ, HUGHES IA, PARRERSON MN. Functional analysis of six androgen receptor mutations identified in patients with partial androgen insensitivity syndrome. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 265–273.
- [5] BOSTWICK DG, PACELLI A, LOPEZ-BELTRAN A. Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 1996; **29**: 117–134.
- [6] BRASCH K, OCHS RL. Nuclear remodeling in response to steroid hormone action. *Int Rev Cytol* 1995; **159**: 161–194.
- [7] BRYŚ M, KRAJEWSKA WM. Potencjalne molekularne markery procesu nowotworzenia gruczołu krokowego. *Curr Topics Biophys* 1995; **19**: 31–41
- [8] BURNSTEIN KL, MAIORINO CA, DAI JL, CAMERON DJ. Androgen and glucocorticoid regulation of androgen receptor cDNA expression. *Mol Cell Endocrinol* 1995; **115**: 177–186.
- [9] CLAESSENS F, CELIS L, PEETERS B, HEYNS W, VERHOEVEN G, ROMBAUTS W. Functional characterization of an androgen response element in the first intron of the C3(1) gene of prostatic binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **164**: 833–840.
- [10] CLEUTJENS KBJ, VAN EEKELEN CCEM, VAN DER KORPUT HAGM, BRINKMANN AO, TRAPMAN J. Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 1996; **271**: 6379–6388.
- [11] COLLINS AT, ZHIMING B, GILMORE K, NEAL DE. Androgen and oestrogen responsiveness of stromal cells derived from the human hyperplastic prostate: oestrogen regulation of the androgen receptor. *J Endocrinol* 1994; **143**: 269–277.
- [12] CULIG Z, HOBISCH A, CRONAUER MV, CATO AC, HITTMAYER A, RADMAYR C, EBERLE J, BARTSCH G, KLOCKER H. Mutant androgen receptor detected in an advanced-



- stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol Endocrinol* 1993; **7**: 1541–1550.
- [13] ELO JP, KVIST L, LEINONEN K, ISOMAA V, HENTTU P, LUKKARINEN O, VIHKO P. Mutated human androgen receptor gene detected in a prostatic cancer patient is also activated by estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 3494–3500.
- [14] FIGG WD, MIDDLEMAN M. Mutated androgen receptors of prostate-cancer cells. *N Engl J Med* 1995; **331**: 1010.
- [15] GADDIPATI JP, MCLEOD DG, HEIDENBERG HB, SESTERHENN IA, FINGER MJ, MOUL JW, SRIVASTAVA S. Trequebt detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. *Cancer Res* 1994; **54**: 2861–2864.
- [16] GERDES MJ, DANG TD, LU B, LARSEN M, MCBRIDE L, ROWLEY DR. Androgen-regulated proliferation and gene transcription in a prostate smooth muscle cell line (PS-1). *Endocrinology* 1996; **137**: 864–872.
- [17] GOTTLIEB B, TRIFIRO M, LUMBROSO R, VASILIOU DM, PINSKY L. The androgen receptor gene mutations database. *Nucleic Acids Res* 1996; **24**: 151–154.
- [18] GUIOCHON-MANTEL A, DELABRE K, LESCOP P, MILGROM E. Intracellular traffic of steroid hormone receptors. *J Steroid Molec Biol* 1996; **56**: 3–9.
- [19] HOLLEY SJ, YAMAMOTO KR. A role for Hsp90 in retinoid receptor signal transduction. *Mol Biol Cell* 1995; **6**: 1833–1842.
- [20] IGNAR-TROWBRIDGE DM, PIMENTEL M, TENG CT, KORACH KS, MCLACHLAN JA. Cross talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling system. *Environ Health Perspect* 1995; **103**: 35–38.
- [21] IRVINE RA, YU MC, ROSS RK, COETZEE GA. The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res* 1995; **55**: 1937–1940.
- [22] JENSTER G, VAN DER KORPUT HA, VAN VROONHOVEN C, VAN DER KWAST TH, TRAPMAN J, BRINKMANN AO. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol Endocrinol* 1991; **5**: 1396–1404.
- [23] KAWATA M. Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci Res* 1995; **24**: 1–46.
- [24] KEMPPAINEN JA, LANE MV, SAR M, WILSON EM. Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. *J Biol Chem* 1992; **267**: 968–974.
- [25] KLOCKER H, CULIG Z, HOBISCH A, CATO AC, CRONAUER MV, RADMAYR C, HITTMAIR A, KASPAR F, EBERLE J, REISSIGL A, BARTSCH G. Androgen receptor structure and prostate cancer. [w] Basic Research in Urological Oncology. Karger, Basel. Luciani L, Debruyne FMJ, Schalken JA [red.]1996: 28-40.
- [26] KOIVISTO P, HYYTINEN E, PALMBERG C, TAMMELA T, VISAKORPI T, ISOLA J, KALLIONIEMI O-P. Analysis of genetic changes underlying local recurrence of prostate carcinoma during androgen deprivation therapy. *Am J Pathol* 1995; **147**: 1608–1614.
- [27] KRAJEWSKA WM. Regulation of transcription in eukaryotes by DNA-binding proteins. *Int J Biochem* 1992; **24**: 1885–1898.
- [28] KULIG E. Receptor estrogenowy: budowa i funkcja w normalnej i neoplastycznej tkance. *Post Bioch* 1994; **40**: 222–229.
- [29] LANDEL CC, KUSHNER PJ, GREENE GL. Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interactions. *Environ Health Perspect* 1995; **103**: 23–28.
- [30] LA SPADA AR, WILSON EM, LUBAHN DB, HARDING AE, FISCHBECK KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991; **352**: 77–79.
- [31] LI JJ, LI SA. The effect of hormones on tumor induction. [w] Chemical induction of cancer. Arcos JC, Argus MF, Woo YT. [red] Birkhauser, Boston, MA. 1996: 397–449.

- [32] MACLEAN HE, WARNE GL, ZAJAC JD. Defects of androgen receptor function: from sex reversal to motor neurone disease. *Mol Cell Endocrinol* 1995; **112**: 133–141.
- [33] MACLEAN HE, WARNE GL, ZAJAC JD. Spinal and bulbar muscular atrophy: androgen receptor dysfunction caused by a trinucleotide repeat expansion. *J Neurol Sci* 1996; **135**: 149–157.
- [34] MAJDIĆ G, MILLAR MR, SAUNDERS PTK. Immunolocalisation of androgen receptor to interstitial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cells of associated ducts. *J Endocrinol* 1995; **147**: 285–293.
- [35] METZGER DA, KORACH KS. Cell-free interaction of the estrogen receptor with mouse uterine nuclear matrix: evidence of saturability, specificity, and resistance to KCl extraction. *Endocrinology* 1990; **126**: 2190–2195.
- [36] NEWMARK JR, HARDY DO, TONB DC, CARTER BS, EPSTEIN JI, ISAACS WB, BROWN TR, BARRACK ER. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 6319–6323.
- [37] NOBUKUNI Y, SMITH CL, HAGER GL, DETERA-WADLEIGH SD. Characterization of the human glucocorticoid receptor promoter. *Biochemistry* 1995; **34**: 8207–8214.
- [38] PERUTZ MF, JOHNSON T, SUZUKI M, FINCH JT. Glutamine repeats as polar zippers: Their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 5355–5358.
- [39] PETERZIEL H, CULIG Z, STÖBER J, HOBISCH A, RADMAYR C, BARTSCH G, KLOCKER H, CATO ACB. Mutant androgen receptors in prostatic tumors distinguish between amino-acid-sequence requirements for transactivation and ligand binding. *Int J Cancer* 1995; **63**: 544–550.
- [40] PONTA H, CATO ACB, HERRLICH P. Interference of pathway specific transcription factors. *Biochem Biophys Acta* 1992; **1129**: 255–261.
- [41] QUIGLEY CA, DE BELLIS A, MARSCHKE KB, EL-AWADY MK, WILSON EM, FRENCH FS. Androgen receptor defects: histological, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine Rev* 1995; **16**: 271–321.
- [42] RENNIE PS, BOWDEN J-F, BRUCHOVSKY N, FRENETTE P-S, FOEKENS JA, CHENG H. DNA and protein components of nuclear acceptor sites for androgen receptors in the rat prostate. *J Steroid Biochem* 1987; **27**: 513–520.
- [43] ROCHEFORT H. Oestrogen- and anti-oestrogen-regulated genes in human breast cancer. [w] Non-reproductive actions of sex steroids. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 191) 1995: 254–268.
- [44] ROSEN J, DAY A, JONES TK, TURNER JONES ET, NADZAN AM, STEIN RB. Intracellular receptors and signal transducers and activators of transcription superfamilies: novel targets for small-molecule drug discovery. *J Med Chem* 1995; **38**: 4855–4874.
- [45] ROSSINI GP, MALAGUTI. Steroid hormones and temperature induce changes of binding parameters of their receptors in intact cells. *FEBS Lett* 1995; **376**: 151–154.
- [46] RUH MF, RUH TS. Antiestrogen action: properties of the estrogen receptor and chromatin acceptor sites. [w] Recent Advances in Steroid Hormone Action. Moudgil VK [red.]. Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York 1987: 109–131.
- [47] RUH MF, SINGH RK, RUH TS, SHYAMALA G. Binding of glucocorticoid receptors to mammary chromatin acceptor sites. *J Steroid Biochem* 1987; **28**: 581–586.
- [48] SABBACH M, RADANYIC, REDEUILH G, BAULIEU E-E. The 90 kDa heat-shock protein (hsp90) modulates the binding of the oestrogen receptor to its cognate DNA. *Biochem J* 1996; **314**: 205–213.
- [49] SADI MV, BARRACK ER. Androgen receptors in human prostate cancer. (in) Biochemical and Molecular Aspects of Selected Cancers. academic Press, New York 1994; **2**: 239–265.
- [50] SCARLETT CO, ROBINS DM. *In vivo* footprinting of an androgen-dependent enhancer reveals an accessory element integral to hormonal response. *Mol Endocrinol* 1995; **9**: 413–423.

- [51] SCHOENBERG MP, HAKIMI JM, WANG S, BOVA GS, EPSTEIN JI, FISCHBECK KH, ISAACS WB, WALSH PC, BARRACK ER. Microsatellite mutation (CAG<sub>24</sub>→18) in the androgen receptor gene in human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **198**: 74–80.
- [52] SCHWABE JWR, NEUHAUS D, RHODES D. Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* 1990; **348**: 458–461.
- [53] SCHWABE JWR, RHODES D. Beyond zinc fingers: steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *TIBS* 1991; **16**: 291–296.
- [54] SIMENTAL JA, SAR M, LANE MV, FRENCH FS, WILSON EM. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 1991; **266**: 510–518.
- [55] SIMON AM, VEYSSIÈRE G, JEAN CI. Structure and sequence of a mouse gene encoding an androgen-regulated protein: a new member of the seminal vesicle secretory protein family. *J Mol Endocrinol* 1995; **15**: 305–316.
- [56] SŁOMCZYŃSKA M. Receptory hormonów steroidowych - budowa i funkcja. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 3–21.
- [57] SMITH DF, WHITESELL L, NAIR SC, CHEN S, PRAPAPANICH V, RIMERMANN RA. Progesterone receptor structure and function altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 6804–6812.
- [58] SPELSBERG TC, GOLDBERGER A, HORTON M, HORA J. Nuclear acceptor sites for sex steroid hormone receptors in chromatin. *J Steroid Biochem* 1987; **27**: 133–147.
- [59] SPELSBERG TC, HORTON M, FINK K, GOLDBERGER A, RORIES C, GOSSE B, RASMUSSEN K. A new model for steroid regulation of gene transcription using chromatin acceptor sites and regulatory genes and their products. [w] *Recent Advances in Steroid Hormone Action*. Moudgil VK [red.] Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York. 1987: 59–83.
- [60] SRINIVASAN G, CAMPBELL E, BASHIRELAHI N. Androgen, estrogen, and progesterone receptors in normal and aging prostates. *Microsc Res Tech* 1995; **30**: 293–304.
- [61] STUBBS AP, LALANI EN, STAMP GWH, HURST H, ABEL P, WAXMAN J. Second messenger up-regulation of androgen receptor gene transcription is absent in androgen insensitive human prostatic carcinoma cell lines, PC-3 and DU-145. *FEBS Lett* 1996; **383**: 237–240.
- [62] STUMPF WE. Vitamin D sites and mechanisms of action: a histochemical perspective. Reflections on the utility of autoradiography and cytopharmacology for drug targeting. *Histochem Cell Biol* 1995; **104**: 417–427.
- [63] STUNNENBERG HG. Mechanisms of transactivation by retinoic acid receptors. *BioEssays* 1993; **15**: 309–315.
- [64] SUZUKI H, SATO N, WATABE Y, MASAI M, SEINO S, SHIMAZAKI J. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; **46**: 759–765.
- [65] TAKEDA H, AKAKURA K, MASAI M, AKIMOTO S, YATANI R, SHIMAZAKI J. Androgen receptor content of prostate carcinoma cells estimated by immunohistochemistry is related to prognosis of patients with stage D2 prostate carcinoma. *Cancer* 1996; **77**: 934–940.
- [66] VEDECKIS WV. Nuclear receptors, transcriptional regulation, and oncogenesis. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1992; **199**: 1–12.
- [67] VELDSCOLTE J, RIS-STALPERS C, KUIPER GG, JENSTER G, BERREVOETS C, CLAASSEN E, VAN ROOIJ HC, TRAPMAN J, BRINKMANN AO, MULDER E. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **173**: 534–540.
- [68] VISAKORPI T, HYYTINEN E, KOIVISTO P, TANNER M, KEINANEN R, PALMBERG C, PALOTIE A, TAMMELA T, ISOLA J, KALLIONIEMI OP. *In vivo* amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 1995; **9**: 401–406.
- [69] WANG L-H, TSAI SY, COOK RG, BEATTIE WG, TSAI M-J, O'MALLEY BW. COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature* 1989; **340**: 163–166.

- [70] ZHU Y-S, PFAFF DW. DNA binding of hypothalamic nuclear proteins on estrogen response element and preproenkephalin promoter: modification by estrogen. *Neuroendocrinology* 1995; **62**: 454–466.

*Redaktor prowadzący Maria Olszewska*

*Otrzymano: 7 stycznia 1997 r.*

*Przyjęto: 27 stycznia 1997 r.*

*Adres autora: Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*



## BUDOWA I FUNKCJA RECEPTORA LUTROPINY (LH/hCG)

### STRUCTURE AND FUNCTION OF LUTROPIN RECEPTOR (LH/hCG)

Adam SOBKOWIAK, Andrzej WIERZBICKI, Wiesław H. TRZECIAK

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Poznaniu

*Streszczenie:* Omówiono budowę i funkcję receptora lutropiny/ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (LH/hCG). Receptor ten jest glikoproteina zawierającą domenę zewnątrzkomórkową, domenę przezbłonową, złożoną z siedmiu segmentów, połączonych przez zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe pętle, oraz C-kończącą domenę wewnątrzkomórkową. Receptor LH/hCG oddziałuje z białkiem  $G_s$ . Po związaniu LH lub hCG, receptor ten aktywuje cyklazę adenylanową i za pośrednictwem cAMP reguluje syntezę i wydzielanie hormonów steroidowych w gonadach. Opisano modele wyjaśniające oddziaływanie hormonu z receptorem i transdukcję sygnału zapoczątkowaną przez gonadotropiny. Domena zewnątrzkomórkowa odgrywa kluczową rolę w specyficznym oddziaływaniu pomiędzy hormonem i receptorem LH/hCG. Omówiono regulację funkcji receptora LH/hCG i znaczenie zmian w budowie receptora w patologii.

*Słowa kluczowe:* lutropina, gonadotropina kosmówkowa, receptor, transdukcja sygnału

*Summary:* The luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor structure and function were described. This receptor is a glycoprotein containing a large N-terminal extracellular domain a transmembrane domain containing seven segments each connected by extracellular and intracellular loops, and a C-terminal intracellular domain. The LH/hCG receptor interacts with the  $G_s$  protein. Upon binding of LH or hCG, this receptor activates adenylate cyclase and through the mediation of cAMP regulates the synthesis and secretion of steroid hormones in the gonads. The models explaining hormone-receptor interaction and gonadotropin-induced signal transduction were described. The extracellular domain of the receptor plays a key role in the specific interaction between the hormone and LH/hCG receptor. The functional regulation of LH/hCG receptors and pathological implications of changes in the receptor structure were described.

*Key words:* lutropin, choriogonadotropin, receptor, signal transduction

Pracę finansowano częściowo z programu badań własnych Uczelni Nr 501-1-101.

## I. WSTĘP

Gonadotropiny są to hormony białkowe, wydzielane przez przedni płat przysadki mózgowej (przysadka gruczołowa). Do hormonów tych zalicza się folitropinę (FSH) i lutropinę (LH) oraz także, syntetyzowaną w komórkach trofoblastu łożyska, gonadotropinę kosmówkową (CG). Odgrywają one ważną rolę w fizjologii rozrodu oddziałyując na gametogenezę i steroidogenezę w gonadach. Komórkami docelowymi folitropiny są komórki ziarniste jajnika oraz komórki Sertoliego jąder, a lutropiny komórki osłonki pęcherzyka, komórki ziarniste, komórki ciała żółtego jajnika i jądrowe komórki Leydiga. Z kolei ludzka gonadotropina kosmówkowa (hCG) zastępuje działanie lutropiny na ciało żółte po implantacji zapłodnionej komórki jajowej.

Hormony te zaliczamy do glikoprotein o podobnej, heterodimerycznej strukturze i masie cząsteczkowej od 28 do 38 kD. W skład ich cząsteczek wchodzi podjednostka  $\alpha$ , o podobnej budowie w obu hormonach oraz podjednostka  $\beta$ , specyficzna dla każdego hormonu. Podjednostki te połączone są mostkami dwusiarczkowymi. W podjednostce  $\alpha$  hCG sekwencja aminokwasów od 26 do 46 jest konserwatywna międzygatunkowo [33]. Hormony te ulegają w różnym stopniu glikozylacji i choć obecność reszt węglowodanowych wydaje się być istotna w oddziaływaniu z receptorem, również deglikozylowane LH i hCG wiążą się z dużą specyficznością z receptorem. Brak reszt węglowodanowych w ich cząsteczkach powoduje jednak słabszą stymulację aktywności cykazy adenylanowej [23].

W błonach cytoplazmatycznych komórek docelowych gonadotropin znajdują się receptory dla poszczególnych hormonów. Receptory gonadotropin zaliczane są do rodziny receptorów wiążących białka G [40, 41], do której należą m.in. receptor tyreotropiny [6], receptory  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergiczne, cholinergiczne, dopaminowe, serotoninowe oraz rodopsyna [6, 10, 11, 15]. Wiązanie agonisty do receptora zapoczątkowuje transdukcję sygnału, w której pośredniczą związane z błoną cytoplazmatyczną białka G, które pobudzają ( $G_s$ ) lub hamują ( $G_i$ ) cyklazę adenylanową, regulując poziom cAMP w komórce [15].

Wieloletnie badania doprowadziły do określenia struktury I-rzędowej receptorów gonadotropin [2, 13, 24, 34, 40]. Ustalono, że receptor lutropiny oraz ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej mają taką samą sekwencję aminokwasową i nazwano go receptorem LH/hCG.

Celem pracy jest omówienie budowy i funkcji receptora LH/hCG oraz podjęcie próby wyjaśnienia jak nieprawidłowości struktury tego receptora wpływają na jego funkcję.

## II. RECEPTOR LH/hCG

Receptor LH/hCG należy do klasy receptorów wiążących białka G (R7G), wśród których wyróżnia się sześć typów. Do klasy tej zalicza się receptory z krótką częścią

zewnątrzkomórkową i wiążące małe ligandy w kieszeni utworzonej przez część przezłonową (np. receptory:  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergiczne, a także muskarynowe, dopaminowe, serotoniny, neuropeptydu Y, substancji K oraz rodopsyna) [10, 12, 23, 26, 38, 44].

Do klasy R7G należą też receptory TSH, FSH i LH/hCG posiadające długą (od 360 do 418 reszt aminokwasowych) domenę zewnątrzkomórkową [6].

Receptor LH/hCG i inne receptory o podobnej strukturze powstały przypuszczalnie w wyniku rekombinacji genów białek wiążących glikoproteiny i genów siedmiu przezłonowych pierwotnych, małych receptorów [3, 23]. Badania porównawcze wskazują na duże podobieństwo budowy receptorów hormonów glikoproteinowych różnego pochodzenia [8, 13, 23–25].

Ludzki receptor LH/hCG jest glikoproteina o względnej masie cząsteczkowej 93 kD. W formie nieglikozylowanej względna masa cząsteczkowa receptora wynosi 75,6 kD [24]. Receptor zakotwiczony jest w błonie cytoplazmatycznej poprzez domenę przezłonową (TD – *transmembrane domain*), która składa się z siedmiu segmentów przezłonowych (TM) bogatych w reszty aminokwasów hydrofobowych (rys. 1 i 2). Na zewnątrz komórki znajduje się hydrofilowa domena N-końcowa (ED – *extracellular domain*). Koniec karboksylowy, złożony z kilkudziesięciu aminokwasów, znajduje się po stronie wewnętrznej błony i określa się go jako domenę wewnątrzkomórkową (ID – *intracellular domain*) [23, 24].

Na końcu aminowym domeny zewnątrzkomórkowej znajduje się peptyd sygnałowy, który bierze udział w transporcie nowo syntetyzowanego białka poprzez błony siateczki śródplazmatycznej. W domenie tej wyróżnić można 14 podobnych, lecz nie identycznych odcinków, po około 25 aminokwasów każdy. Sześć C-końcowych odcinków jest konserwatywnych. Fragmenty o podobnym składzie, nazwane powtórzeniami bogatymi w leucynę, wykryto w wielu białkach, które zaliczono do rodziny glikoprotein bogatych w leucynę (*leucine rich glycoproteins* – LRG) [40]. Białka te, za pośrednictwem amfipatycznych heliksów utworzonych przez powtarzające się sekwencje bogate w leucynę, kontaktują się z ligandem zarówno hydrofilową, jak i hydrofobową powierzchnią cząsteczki.

Domena zewnątrzkomórkowa receptora LH/hCG zawiera sześć reszt asparaginy, które stanowią miejsca potencjalnej glikozylacji [2, 13, 23, 24].

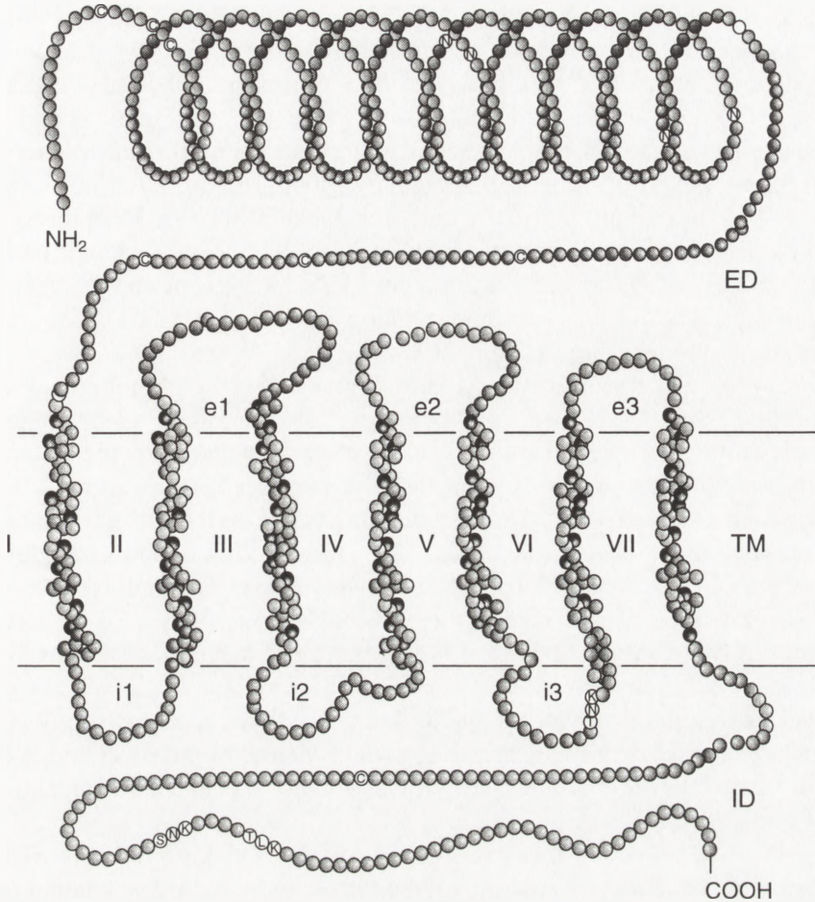
Sekwencja dziesięciu aminokwasów domeny zewnątrzkomórkowej receptora LH/hCG (T S L L V A (T) L (T) Y P S) jest identyczna w lektynie sojowej [23]. Także proteoglikan PG-40, który wiąże kolagen i występuje obficie w macierzy zewnątrzkomórkowej tkanki łącznej, wykazuje znaczne podobieństwo sekwencji do ED receptora LH/hCG.

Domena zewnątrzkomórkowa jest najbardziej zmienną częścią receptora. Sekwencja aminokwasów tej części receptora ludzkiego, wieprzowego i szczurzego wykazuje 85% homologii [24]. Wykazano nawet różnice w kolejności aminokwasów w domenie zewnątrzkomórkowej receptora LH/hCG otrzymanego z ludzkich jajników i tarczycy [13]. Część zewnątrzkomórkowa receptora LH/hCG różni się znacznie od analogicz-

-18 NH <sub>2</sub> - MKQRFSA <b>LQ</b> LLK <b>LLLLLQ</b>	1
PEPTYD SYGNAŁOWY	
LQPPLPRALR EAL <b>CPEP</b> CNC VPDGAL <b>RCPG</b> PTAGL <b>TRL</b> SL	40
AYLPVKVIPS QAFRGLNEVI K <b>IEISQID</b> SL ERIEANA <b>FDN</b>	80
LLNLSEILIQ NTKNLRYIEP GAFINLPGLK YLSICNTGIR	120
KFPDVT <b>KVFS</b> SESNFIL <b>IEIC</b> DN <b>LHIT</b> TIPG NAFQGM <b>NNES</b>	160
VTLKLYGN <b>GF</b> EEVQSHAF <b>NG</b> T <b>TLT</b> SLEL <b>KE</b> NVHLE <b>KMHNG</b>	200
AFRGATG <b>PKT</b> LDIS <b>STK</b> LQA LPSYGL <b>ESIQ</b> RLIATSS <b>YSL</b>	240
KKLPSRETFV N <b>LLEAT</b> L <b>TYP</b> SHCCAF <b>RNLP</b> TKEQ <b>NFSH</b> SI	280
SE <b>NFSKQ</b> CES TVRK <b>VSNK</b> TL YSS <b>MLAE</b> SEL SGWDY <b>EYGF</b> C	320
LPK <b>T</b> PRCAPE PDAFN <b>PCEDI</b> MGYDF <b>L</b> R <b>VL</b> I W <b>LINILAIM</b> G	360
NMTV <b>L</b> FVLL <b>T</b> SRYK <b>L</b> TVPR <b>F</b> LMCN <b>L</b> S <b>FADF</b> CMGLY <b>L</b> LLIA	400
SV <b>D</b> SQTKGQY YNHAI <b>D</b> WQ <b>TG</b> SGC <b>STAG</b> FFT VFAS <b>E</b> LSV <b>T</b>	440
LTVIT <b>L</b> ERWH TITYA <b>I</b> HL <b>DQ</b> KLRL <b>RH</b> A <b>ILI</b> MLGGW <b>L</b> FSS <b>L</b>	480
IAML <b>P</b> LVG <b>V</b> S NYMK <b>V</b> SICFP MDVETT <b>L</b> SQ <b>V</b> YIL <b>T</b> IL <b>L</b> N <b>V</b>	520
VAFF <b>I</b> IC <b>A</b> C <b>A</b> C <b>Y</b> I <b>KI</b> YFAVR <b>NP</b> ELMAT <b>N</b> KDT <b>K</b> IAK <b>K</b> MAIL <b>I</b> F	560
TDFT <b>C</b> MAP <b>I</b> S FFAIS <b>A</b> A <b>F</b> K <b>V</b> PLIT <b>V</b> T <b>NSK</b> V LLV <b>L</b> F <b>Y</b> P <b>I</b> NS	600
CAN <b>P</b> FLYA <b>I</b> F T <b>K</b> FT <b>Q</b> R <b>D</b> FF <b>L</b> LLS <b>K</b> FG <b>C</b> CK <b>R</b> RAELY <b>R</b> R <b>K</b> D <b>F</b>	640
SAY <b>T</b> SN <b>C</b> K <b>NG</b> FTGS <b>N</b> K <b>PS</b> QS TL <b>K</b> L <b>ST</b> L <b>H</b> C <b>Q</b> GT <b>A</b> LL <b>D</b> K <b>T</b> RY	680
TEK-COOH	683

Rys. 1. Sekwencja aminokwasów cząsteczki ludzkiego receptora LH/hCG. N-końcowy peptyd sygnałowy oznaczono od -1 do -18 [2]. Cyframi arabskimi oznaczono 11 eksonów przedzielonych linią ciągłą. Czternaście segmentów bogatych w leucynę oznaczono cyframi rzymskimi i przedzielono linią przerywaną [8]. Siedem segmentów przezbłonowych (TM) zamknięto w ramkach i oznaczono łączące je pętle wewnątrzkomórkowe (i) i zewnątrzkomórkowe (e) [24]. Konserwatywne cysteiny oznaczono gwiazdkami [13, 24, 25]. Grubą linią podkreślono sześć miejsc potencjalnej glikozylacji, a krzyżykami miejsca możliwej fosforylacji przez kinazę białkową C [24]





Rys. 2. Struktura receptora LH/hCG: ED – domena zewnątrzkomórkowa, TM – siedem przez błonowych odcinków  $\alpha$ -helikalnych; ID – domena wewnątrzkomórkowa; e – pętle zewnątrzkomórkowe; i – pętle wewnątrzkomórkowe; C – konserwatywne reszty cysteiny; N – miejsca możliwej glikozylacji. W domenie wewnątrzkomórkowej oznaczono lokalizację miejsc możliwej fosforylacji przez kinazę białkową C

nej domeny N-końcowej innych receptorów hormonów glikoproteinowych. Homologia sekwencji aminokwasów z receptorem FSH wynosi 50% [44], a z receptorem TSH 42% [13, 24]. Natomiast w powtórzeniach bogatych w leucynę stwierdzono 38% identyczności z receptorem tyreotropiny [8].

W ludzkim, wieprzowym i szczurzym receptorze LH/hCG oraz w ludzkim receptorze TSH i szczurzym receptorze FSH wykazano obecność dziewięciu konserwatywnych reszt cysteiny [13, 24] występujących głównie w pobliżu N-końca i C-końca domeny zewnątrzkomórkowej (rys. 1 i 2).

Domena przez błonową receptora LH/hCG zawiera siedem odcinków  $\alpha$ -helikalnych o charakterze hydrofobowym. Domena przez błonowa i wewnątrzkomórkowa ludzkiego receptora LH/hCG zawierają łącznie 335 reszt aminokwasów, z których 72 aminokwasy tworzą domenę wewnątrzkomórkową [2]. Segmenty przez błonowe (TM) połączone są trzema pętlami leżącymi na zewnątrz komórki oraz trzema pętlami wewnątrzkomórkowymi. Domena przez błonowa (TD) receptora LH/hCG wykazuje większy stopień homologii niż ED, z innymi członkami rodziny receptorów wiążących białka G. Na odcinku siedmiu segmentów przez błonowych występuje homologia sekwencji aminokwasów między receptorem LH/hCG a receptorami substancji K i serotoninowym 5HT2 (26%), receptorem rodopsyny wołowej (23%) [23] oraz ludzkimi receptorami  $\beta$ -adrenergicznymi (21%).

Segmenty przez błonowe receptora LH/hCG wykazują 70% homologii do sekwencji receptorów FSH i TSH [8, 13, 24, 25], a także 90% homologii międzygatunkowej [24]. Wiele krótkich sekwencji aminokwasowych występujących w przez błonowych heliksach oraz pętlach wewnątrzkomórkowych jest wysoce konserwatywnych. Szczególnie ważnym miejscem jest C-końcowy region trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej, z którą przypuszczalnie wiąże się białko G [6, 17, 23]. Ten odcinek znajdujący się pomiędzy V i VI TM, chociaż różni się od odpowiedniej sekwencji innych receptorów wiążących białka G, to jednak dziewięć aminokwasów (N K D T K I A K K) C-końcowego fragmentu tej pętli jest identycznych w receptorach LH/hCG i FSH [40].

W części przez błonowej występują też konserwatywne reszty cysteiny [13, 25]. Reszty te, występujące w drugiej i trzeciej pętli zewnątrzkomórkowej, mogą oddziaływać z grupami siarczkowymi cysteiny ED, tworząc wiązania dwusiarczkowe [16, 27, 32].

W C-końcowej domenie wewnątrzkomórkowej (ID) ludzkiego receptora LH/hCG występuje wiele reszt seryny i treoniny. Wykryto trzy miejsca potencjalnej fosforylacji przez kinazę białkową C. Fosforylacja ta przypuszczalnie odgrywa ważną rolę w zależnym od agonisty odłączaniu receptora od białka G i mogłaby kontrolować aktywność receptora [24]. Miejsca potencjalnej fosforylacji stwierdzono także w ID innych receptorów należących do tej rodziny [23]. Skupiska reszt aminokwasów zasadowych, znajdujące się na końcu domeny wewnątrzkomórkowej szczurzego receptora LH/CG są podatne na proteolizę, nie ustalono jednak, czy receptor ten ulega modyfikacji potranslacyjnej [23].

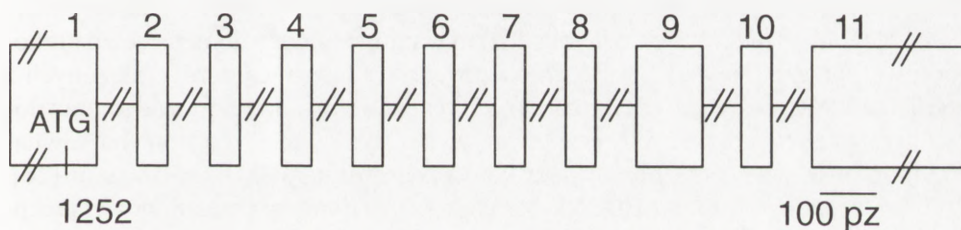
### III. GEN RECEPTORA LH/hCG

Gen ludzkiego receptora LH/hCG znajduje się w chromosomie 2 (2p21) w pobliżu genu receptora folitropiny. Na obszarze ponad 70 kbp zawiera on 11 eksonów (rys. 3) [2]. W pierwszym eksonie, o długości 1252 pz tylko 167 pz jest kodujących, resztle

stanowi sekwencja nie kodująca. Kolejne dziewięć krótkich eksonów jest podobnej wielkości. Eksony te odpowiadają czteremastu powtórzeniom bogatym w leucynę (rys. 3). Introny są różnej długości, od 88 pz (5) do ponad 8 kpz (7), a połączenia ekson/intron zawierają typowe sekwencje GT i AG. Pierwsze 10 eksonów i część ostatniego kodują domenę zewnątrzkomórkową, podczas gdy domeny przezbłonowa i wewnątrzkomórkowa są kodowane przez pozostałą część eksonu 11 (rys. 3).

W odległości 1085 pz w kierunku 5' od kodonu inicjującego znajduje się miejsce inicjacji transkrypcji. W regionie promotorowym przypuszczalna sekwencja TATA znajduje się w pozycji -47 (TATATT) i -34 (TTTAAA), a sekwencja CAAT w pozycji -89 (CCATCC). Ekspresja genu LH/hCGR może być regulowana między innymi przez cAMP, gdyż znaleziono potencjalną sekwencję CRE (GTCGTCA) [29] w pozycji -697.

Ekspresję receptora lutropiny stwierdzono w komórkach osłonki pęcherzyka, ziarnistych jajnika i komórkach ciała żółtego oraz komórkach Leydiga jąder [23], a także w ludzkiej tarczycy. W tkankach pozagonadalnych ekspresja genu receptora LH/hCG następuje w macicy i tętnicy macicznej [21, 42], jajowodach [22], łożysku i błonach płodowych [36], pępowinie [32] oraz naczyniach krwionośnych jąder [9]. Metodą hybrydyzacji, z zastosowaniem cDNA receptora LH/hCG jako sondy, nie stwierdzono mRNA dla tego receptora w wątrobie, nerce, płucach, jelitach i mięśniach szkieletowych [8, 13].



Rys. 3. Organizacja genu ludzkiego receptora LH/hCG. Eksony oznaczone prostokątami ponumerowano od 1 do 11. Introny oznaczono liniami przerwanymi. Zaznaczono miejsce startu transkrypcji (ATG).

Wielkość eksonów podano w skali 100 par zasad

#### IV. WIĄZANIE HORMONU I TRANSDUKCJA SYGNAŁU

Mimo podobieństwa budowy, receptory hormonów glikoproteinowych wykazują różnice strukturalne warunkujące specyficzność wiązania hormonu. Badania wiązania gonadotropin różnych gatunków zwierząt z ludzkim i szczurzym receptorem LH/CG wykazały, że CG końska oraz LH końska, szczurza i owcza łączą się z receptorem LH/CG szczurzym, nie wiążą się jednak z receptorem ludzkim. Także folitropina zwierząt tych gatunków nie oddziałuje ani z ludzkim, ani szczurzym receptorem LH/CG [13].



Wyniki licznych badań wskazują na decydującą rolę domeny zewnątrzkomórkowej receptora w procesie wiązania hormonu [8, 23, 26, 27, 34, 44, 45]. Badania te uwzględniają zarówno budowę hormonu [5, 7, 33], jak i modyfikowanych postaci receptorów np. hybryd różnych receptorów, receptorów o zmienionej sekwencji w poszczególnych odcinkach ich cząsteczki, uzyskiwanych dzięki klonowaniu i ukierunkowanej mutagenezie [6, 16, 26, 30, 34, 45].

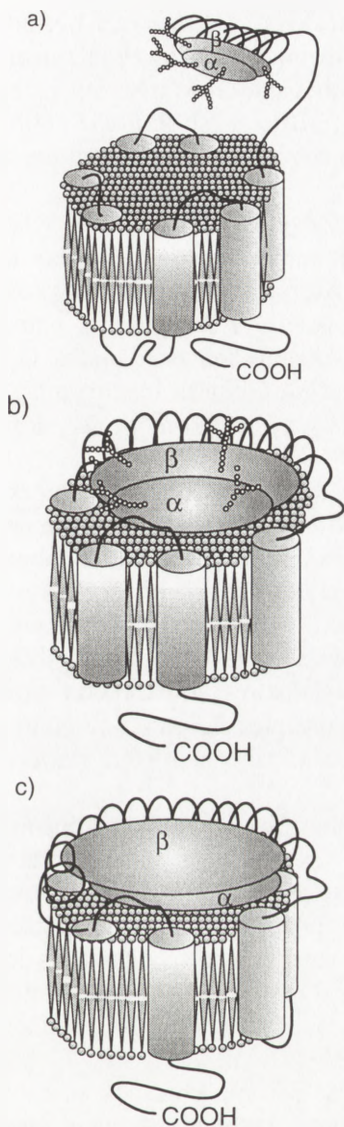
Wiązanie dużych cząsteczek hormonów glikoproteinowych pomiędzy siedmioma segmentami przez błonowymi byłoby możliwe tylko wówczas, gdyby hydrofilowe pętle zewnątrzkomórkowe wywoływały zmiany konformacyjne receptora (model kieszeni elastycznej) [12].

Dowodzono, że powinowactwo hormonu do zrekombinowanej domeny zewnątrzkomórkowej receptora LH/hCG jest porównywalne do oddziaływania z nim całego receptora [34, 44, 45], lecz hormon oddziałuje również z zakotwiczonym w błonie krótkim końcowym fragmentem domeny zewnątrzkomórkowej. Sugeruje to istnienie co najmniej dwóch miejsc odpowiedzialnych za wiązanie liganda [12, 30].

Zaproponowano kilka modeli wiązania hormonu przez receptor. Jeden z nich zakłada oddziaływanie z domeną zewnątrzkomórkową wyłącznie poprzez motywy LRG, inny model dopuszcza udział w wiązaniu hormonu zarówno domeny zewnątrzkomórkowej, jak i przez błonowej [8, 30] (rys. 4). Choć ustalono, że domena przez błonowa receptora może oddziaływać z hormonem poprzez fragment C-końcowy jego podjednostki  $\alpha$  [33], w wiązaniu hormonu bierze udział cały receptor, którego konserwatywne reszty aminokwasów drugiej i trzeciej pętli zewnątrzkomórkowej decydują o niekwalencyjnym oddziaływaniu pomiędzy domeną zewnątrzkomórkową i przez błonową [12]. Badania z użyciem chimer receptorów, złożonych z fragmentów N-końcowych receptora LH lub receptora  $\beta_2$ -adrenergicznego oraz domen przez błonowych różnych receptorów wykazały, że zarówno domena zewnątrzkomórkowa, jak i przez błonowa są konieczne do interakcji z hormonem [26]. Chimera receptora złożona z ED receptora lutropiny i domeny przez błonowej receptora folitropiny powoduje transdukcję sygnału właściwą dla LH, zaś chimera skonstruowana odwrotnie powoduje transdukcję sygnału charakterystyczną dla FSH. Sugeruje to, że specyficzność w stosunku do liganda zależna jest od budowy domeny zewnątrzkomórkowej. Zastosowanie syntetycznych domen zewnątrzkomórkowej i przez błonowej oraz podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  hormonu daje wzrost produkcji cAMP porównywalny z efektem oddziaływania całego receptora i hormonu. Pozwala to przypuszczać, że tworzy się tetrameryczny kompleks tych białek, tj. dwóch podjednostek hormonu oraz dwóch domen receptora [34].

Jeden z modeli wyjaśniających przekazywanie sygnału zakłada, że hormon związany z ED zbliża się do domeny przez błonowej, łącząc się z receptorem jednym lub dwoma regionami. Deglikozylowana  $\alpha$  podjednostka hCG tworzy trzy pętle połączone wiązaniami dwusiarczkowymi. Pętla pierwsza i trzecia tej podjednostki są do siebie zbliżone, a druga, w swej części przylegającej do pierwszej i trzeciej pętli podjednostki  $\beta$ , ma najbardziej konserwatywny skład aminokwasowy. Badając wiązanie przeciw-





ciał do kompleksu hormon-receptor stwierdzono, że reszty aminokwasowe hormonu, tworzące kompleks z receptorem, znajdują się w regionie N-końcowym cząsteczki i fragmentach pierwszej i trzeciej pętli podjednostki  $\alpha$ . Ustalono, że związane ze sobą podjednostki  $\alpha$  (druga pętla) i  $\beta$  (pętla pierwsza i trzecia) hormonu tworzą bruzdę, która może łączyć się z domeną zewnątrzkomórkową wygiętą w kształcie litery U lub J. Zmiana konformacji ED powoduje przeniesienie efektu do domeny wewnątrzkomórkowej i zapoczątkowuje transdukcję sygnału [27] (rys. 4). Stwierdzono, że przerwanie łączności pomiędzy ED i TD powoduje odczulenie (*desensitization*) receptora na działanie hormonu [27].

Łańcuchy boczne cukrowców mają ważne znaczenie dla prawidłowego oddziaływania podjednostki  $\alpha$  hormonu z receptorem [13]. Uważa się, że łańcuchy te, występujące w podjednostkach hormonu, ze względu na swoją wielkość, mogą rozdzielać ramiona domeny zewnątrzkomórkowej receptora i w ten sposób modulować efekt działania hormonu [27, 47].

Domena przezbłonowa odgrywa rolę w transdukcji sygnału łącząc się z białkiem G [6, 12, 17, 23, 38, 40, 44]. Większość autorów uważa, że w wiązaniu białka G bierze udział trzecia pętla wewnątrzkomórkowa [10]. Mutacje C-końcowego regionu tej pętli receptora  $\alpha$ -adrenergicznego i recep-

Rys.4. Modele tworzenia kompleksu LH/hCG z receptorem błonowym. **A.** Podjednostka  $\beta$  hormonu przyłącza się do domeny zewnątrzkomórkowej receptora, tworzącej helikalną strukturę segmentów bogatych w leucynę. Model ten nie zakłada kontaktu hormonu z częścią przezbłonową receptora. **B.** Podjednostka  $\beta$  hormonu przyłącza się do domeny zewnątrzkomórkowej receptora i cała cząsteczka hormonu, dzięki rozsunięciu segmentów przezbłonowych, kontaktuje się z częścią przezbłonową receptora. **C.** Domena zewnątrzkomórkowa receptora uformowana w kształcie litery U umożliwia kontakt z nią obu podjednostkom hormonu. Środkowa jej część (aminokwasy od 94 do 169) odpowiada za specyficzność wiązania hormonu. W tym regionie przyłącza się druga pętla podjednostki  $\alpha$  oraz pierwsza i trzecia pętla podjednostki  $\beta$  hormonu. Pętla pierwsza i trzecia podjednostki  $\alpha$  oraz pętla druga podjednostki  $\beta$  hormonu kontaktują się z C-końcowym fragmentem domeny zewnątrzkomórkowej. Model ten nie wyklucza oddziaływania hormonu z domeną przezbłonową. A i B wg Frazier i wsp. [8], C wg Moyle i wsp. [27] zmodyfikowano

tora tyreotropiny powodują ich aktywację konstytutywną, tj. zachodzącą bez udziału ligandów [14, 17]. Wskazuje to na ważną rolę fragmentu C-końcowego trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej w wiązaniu białka G. Oddziaływanie tego fragmentu receptora z białkiem G może następować przez utworzenie amfifilowej struktury  $\alpha$ -heliksu, w którym po jednej stronie zlokalizowane są reszty obdarzone ładunkiem, a druga strona jest hydrofobowa [40].

Niecałkowicie wyjaśniony pozostaje wpływ przyłączenia białka G na wiązanie hormonu. Powszechnie akceptowany jest model kompleksu potrójnego (hormon - receptor-białko G). W przypadku receptorów  $\beta$ -adrenergicznych utworzenie kompleksu hormon-receptor wymaga oddziaływania białka  $G_s$  z receptorem, natomiast wiązanie hormonu do receptora LH/hCG nie wymaga obecności białka G [45]. Stwierdzono, że odłączenie białka G może kontrolować kinaza białkową C, gdyż miejsca fosforylacji dla tego enzymu stwierdzono w wewnątrzkomórkowej domenie receptorów (rys. 1 i 2).

W surowicy krwi szczura stwierdzono obecność domeny zewnątrzkomórkowej receptora LH/hCG [44]. Mogłaby ona wiązać LH/hCG, zmniejszając w ten sposób stężenie wolnego hormonu i obniżając jego skuteczność biologiczną, podobnie jak SHBG zmniejsza stężenie wolnego testosteronu oraz estradiolu i obniża efektywność działania obu hormonów. Gen receptora LH/hCG spełnia podstawowe wymogi umożliwiające produkcję wolnej formy domeny zewnątrzkomórkowej, gdyż jego fragment, kodujący domenę wiążącą ligand, jest oddzielony intronem od fragmentu kodującego domenę przezbłonową. Wolna domena receptora LH/hCG mogłaby więc powstawać w wyniku różnicowego składania specyficznego mRNA (*differential splicing*).

Wyniki wielu prac wskazują na możliwość alternatywnego składania mRNA receptorów gonadotropin [13, 24, 44]. Obecność sekwencji potencjalnego alternatywnego składania (TTXCAG) stwierdzono w intronie w pozycji 960 szczurzego receptora LH/CG oraz w kolejnym II eksonie w pozycji 1225, przypadającej na środek TM II, która umożliwia tworzenie kompleksu enzym-snRNA podczas dojrzewania mRNA. Skutkiem drugiej wersji składania jest brak w transkrypcie fragmentu TM I oraz przesunięcie ramki odczytu tak, że następuje przedwczesna terminacja w odległości 26 aminokwasów od miejsca cięcia [44].

Dowiedziano, że rekombinowana domena zewnątrzkomórkowa, skonstruowana przy użyciu cDNA receptora LH/hCG wiąże się z dużym powinowactwem z hormonem [44, 45]. Wolna ED receptora LH/hCG mogłaby więc odgrywać rolę w wiązaniu LH do receptorów komórek docelowych w różnych etapach rozwoju, a także w różnych fazach cyklu miesięczkowego oraz wpływać na funkcję parakrynową gonad. Ponadto mogłaby utrzymywać stałe stężenie LH, zapobiegając w ten sposób wzrostowi poziomu hormonu wolnego pociągającego za sobą odczulenie receptorów (*down regulation*) [44].

Zjawisko zmniejszania liczby receptorów błonowych LH/hCG stwierdzono w komórkach Leydiga i ciała żółtego. Po wstępnej aktywacji funkcji tych komórek,

dalsze działanie hormonu powodowało zmniejszenie liczby miejsc wiążących i odczulenie komórek. Supresja miejsc wiążących może być wynikiem indukowanej ligandem internalizacji lub modyfikacji potranslacyjnej receptora przez fosforylację, ale także może wynikać ze zmniejszenia ilości specyficznego mRNA. Hormon hCG hamuje bowiem syntezę mRNA receptora LH/hCG o długości: 7, 4,2, 2,5, 1,8 kz w jajnikach, lecz nie zmniejsza syntezę fragmentu 1,8 kz w jądrach. Sugeruje to tkankowo specyficzne dojrzewanie transkryptów LH/hCGR [19], podobnie jak wykazano to w przypadku mRNA LH/hCGR z tarczycy [8]. Przypuszcza się, że produkt translacji 1,8 kz mRNA może działać jako białko wiążące LH, podobnie jak ma to miejsce z receptorem hormonu wzrostu, którego niepełna forma może wiązać hormon. Krótsza forma receptora LH/hCG mogłaby również działać jako endogenny antagonist LH i ta forma może być syntetyzowana pomimo zahamowania ekspresji całego receptora po działaniu hCG [19]. W przeciwieństwie do wykazanej regulacji przez zmniejszenie liczby receptorów LH podczas owulacji [19], zaobserwowano też zwiększanie się ich liczby (*up regulation*) podczas tworzenia pęcherzyków i we wczesnych stadiach luteinizacji [18]. Jednak mechanizm molekularny tego zjawiska pozostaje niecałkowicie wyjaśniony.

## V. ZNACZENIE RECEPTORÓW LH/hCG W PATOLOGII

Zauważono, że zmiany sekwencji reszt aminokwasowych receptora powodują nieprawidłowe jego działanie. Zjawisko mutacji punktowych, powodujących aktywację konstytutywną receptorów, obserwowano u *Prokaryota* [46], jak też w organizmie ludzkim [17, 28, 31]. Przejawiać się ona może w różny sposób, w zależności od funkcji receptora.

Pierwszy opis nieprawidłowości receptora działającego za pośrednictwem białka G dotyczy nerkowopochodnej moczówki prostej (*congenital nephrogenic diabetes insipidus* – CNDI). Dowiedziono, że delecja jednej zasady, w znajdującym się na chromosomie X, genie kodującym receptor hormonu antydiuretycznego ( $V_2$ ) powoduje przesunięcie ramki odczytu, co wywołuje przedwczesne pojawienie się kodonu terminacyjnego i w konsekwencji produkcję niepełnej formy receptora, nie wiążącej hormonu [37]. U osobników zdrowych konsekwencją wiązania hormonu antydiuretycznego z receptorem  $V_2$  jest zwiększenie resorpcji zwrotnej wody w kanalikach nerkowych. Nieprawidłowości receptora  $V_2$  powodują zahamowanie resorpcji zwrotnej wody i prowadzą do postaci nerkowej moczówki prostej.

Stwierdzono, że mutacja w trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego prowadzi do jego aktywacji konstytutywnej [1, 35]. Podobne zjawisko zaobserwowano w receptorze  $\alpha_{1B}$ -adrenergicznym.

Mutacja genu kodującego receptor TSH, powodująca zastąpienie Arg przez His, jest podłożem uogólnionej oporności na hormony tarczycy (*generalised thyroid*



*hormone resistance* – GTHR). Zamiana tego aminokwasu zmienia konformację białka receptora i wpływa, bądź na oddziaływanie między ligandem i receptorem, bądź powoduje dimeryzację kompleksu ligand-receptor [4]. Stwierdzono także inne mutacje genu receptora TSH wywołujące jego aktywację konstytutywną, obserwowane np. w nadczynności tarczycy [31].

Kolejnym zaburzeniem funkcji receptora działającego za pośrednictwem białka G jest rodzinne przedwczesne dojrzewanie mężczyzn (*familial male-limited precocious puberty* – FMPP) polegające na pojawianiu się objawów przedwczesnej dojrzałości płciowej u chłopców w wieku 4 lat [39]. U osobników dotkniętych tą wadą następuje niekontrolowany rozrost komórek Leydiga i w konsekwencji wzmożona produkcja testosteronu. Choroba ta jest uwarunkowana mutacją konstytutywną receptora LH/hCG i dziedziczy się w sposób dominujący. Mutacja dotyczy pojedynczej zasady powodującej substytucję Asp na Gly (pozycja 562 na rys. 1) w TM VI w połowie długości heliksu. Aminokwas ten jest konserwatywny w receptorach wszystkich hormonów glikoproteinowych, ale nie występuje w innych receptorach wiążących białko G [43]. W stanie nieaktywnym receptora reszta Asp jest połączona wiązaniami elektrostatycznymi lub wodorowymi z jedną lub więcej resztami aminokwasów sąsiedniego heliksu, warunkując odpowiednią konformację TM VI. Związanie agonisty powoduje przerwanie tego wiązania, co wywołuje zmiany konformacji receptora i jego uaktywnienie. Substytucja reszty Gly, nie tworzącej podobnych wiązań, w miejsce Asp może prowadzić do przybrania aktywnej konformacji receptora pod nieobecność hormonu, lecz nie wpływa to na powinowactwo do agonisty. U chorych z FMPP stwierdzono możliwość występowania trzech innych mutacji receptora LH/hCG powodujących zastąpienie aminokwasów w TM VI oraz mutację w TM V (rys. 1 Ile<sub>526</sub> na Leu) i w trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej (rys. 1 Asp<sub>548</sub> na Gly) [20]. Wskazuje to na udział także innych aminokwasów w utrzymywaniu konformacji receptora w stanie nieaktywnym.

## UWAGI KOŃCOWE

Dowiedziano, że mutacje genów receptorów niektórych hormonów glikoproteinowych powodują określone zespoły chorobowe. Mutacje receptora TSH wywołują bądź niewrażliwość na hormony (zespół uogólnionej oporności na hormony tarczycy), bądź też mogą umożliwiać działanie receptora bez udziału liganda (nadczynność tarczycy), natomiast mutacje konstytutywne receptora LH/hCG powodują przedwczesne dojrzewanie płciowe. Choroby te występują jednakże bardzo rzadko i dlatego nie mają większego znaczenia klinicznego. Niewyjaśnione pozostają nieprawidłowości receptora FSH i ich konsekwencje kliniczne.

Szczególnie interesujące wydają się jednak badania mutacji receptora LH/hCG u kobiet, gdyż ulega on ekspresji w jajniku w co najmniej trzech rodzajach komórek:



osłonki pęcherzyka, ziarnistych i ciała żółtego. Mutacje te mogą stanowić podłoże molekularne chorób związanych z niedoborem lub nadmierną produkcją hormonów płciowych.

### Podziękowania

Autorzy pracy dziękują p. Agnieszce Kobielał za pomoc w przygotowaniu rycin w programie CorelDRAW.

### LITERATURA

- [1] ALLEN LF, LEFKOWITZ RJ, CARON MG, COTECCHIA S. G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: Constitutively activating mutation of the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 11354–11358.
- [2] ATGER M, MISRAHI M, SAR S, LE FLEM L, DESSEN P, MILGROM E. Structure of the human luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor gene: unusual promoter and 5' non-coding regions. *Mol Cell Endocrinol* 1995; **111**: 113–123.
- [3] BO M, OIKAWA M, HSUEH A, BOIME I. Isolation and structural characterization of the gene encoding the human lutropin/chorionic gonadotropin receptor. *J Cell Biol* 1990; **111**: 330 a.
- [4] BOOTHROYD CV, TEH BT, HAYWARD NK, HICKMAN PE, WARD GJ, CAMERON DP. Single base mutation in the hormone binding domain of the thyroid hormone receptor  $\beta$  gene in generalised thyroid hormone resistance demonstrated by single stranded conformation polymorphism analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **178**: 606–612.
- [5] CAMPBELL RK, DEAN-EMIG DM, MOYLE WR. Conversion of human choriogonadotropin into a follitropin by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 760–764.
- [6] CHAZENBALK GD, NAGAYAMA Y, RUSSO D, WADSWORTH HL, RAPOPORT B. Functional analysis of the cytoplasmic domains of the human thyrotropin receptor by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1990; **265**: 20970-20975.
- [7] COSOWSKY L, RAO SNV, MACDONALD GJ, PAPKOFF H, CAMPBELL RK, MOYLE WR. The groove between the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of hormones with lutropin (LH) activity appears to contact the LH receptor, and its conformation is changed during hormone binding. *J Biol Chem* 1995; **270**: 20011–20019.
- [8] FRAZIER AL, ROBBINS LS, STORK PJ, SPRENGEL R, SEGALOFF DL, CONE RD. Isolation of TSH and LH/CG receptor cDNAs from human thyroid: Regulation by tissue specific splicing. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 1264–1276.
- [9] GHINEA N, VU HAI MT, GROYSER MT, MILGROM E. How protein hormones reach their target cells. Receptor-mediated transcytosis of hCG through endothelial cells. *J Cell Biol* 1994; **125**: 87–97.
- [10] HAWES BE, LUTTRELL LM, EXUM ST, LEFKOWITZ RJ. Inhibition of G protein-coupled receptor signaling by expression of cytoplasmic domains of the receptor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 15776–15785.
- [11] HRABEC Z, HRABEC E. Receptory neurokinin. Udział substancji P w procesach zapalnych. *Post Bioch* 1992; **38**: 28–32.
- [12] JI I, JI TH. Human choriogonadotropin binds to a lutropin receptor with essentially no N-terminal extension and stimulates cAMP synthesis. *J Biol Chem* 1991; **266**: 13076–13079.

- [13] JIA X-C, OIKAWA M, BO M, TANAKA T, NY T, BOIME I, HSUEH AJW. Expression of human luteinizing hormone (LH) receptor: Interaction with LH and chorionic gonadotropin from human but not equine, rat, and ovine species. *Mol Endocrinol* 1991; **5**: 759–768.
- [14] KJELSBERG MA, COTECCHIA S, OSTROWSKI J, CARON MG, LEFKOWITZ RJ. Constitutive activation of the  $\alpha_{1\beta}$ -adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. *J Biol Chem* 1992; **267**: 1430–1433.
- [15] KONARSKA L.[red.] Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995.
- [16] KOSUGI S, BAN T, AKAMIZU T, KOHN LD. Role of cysteine residues in the extracellular domain and exoplasmic loops of the transmembrane domain of the TSH receptor: Effect of mutation to serine on TSH receptor activity and response to thyroid stimulating autoantibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **189**: 1754–1762.
- [17] KOSUGI S, OKAJIAMA F, BAN T, HIDAKA A, SHENKER A, KOHN LD. Substitutions of different regions of the third cytoplasmic loop of the thyrotropin (TSH) receptor have selective effects on constitutive, TSH-, and TSH receptor autoantibody-stimulated phosphoinositide and 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate signal generation. *Mol Endocrinol* 1993; **7**: 1009–1020.
- [18] LA POLT PS, OIKAWA M, JIA XC, DARGAN C, HSUEH AJW. Gonadotropin-induced up- and down-regulation of rat ovarian LH receptor message levels during follicular growth, ovulation and luteinization. *Endocrinology* 1990; **126**: 3277–3279.
- [19] LA POLT PS, JIA X-C, SINCICH C, HSUEH AJW. Ligand-induced down-regulation of testicular and ovarian luteinizing hormone (LH) receptors is preceded by tissue-specific inhibition of alternatively processed LH receptor transcripts. *Mol Endocrinol* 1991; **5**: 397–403.
- [20] LAUE L, CHAN WY, HSUEH AJW, KUDO M, HSU SY, WU SM, BLOMBERG LA, CUTLER GB. Genetic heterogeneity of activating mutations of the luteinizing hormone receptor gene in familial male-limited precocious puberty. *Amer J Hum Genet* 1994; **55**: A228.
- [21] LEI ZM, RESHEF E, RAO CV. The expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors in human endometrial and myometrial blood vessels. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; **75**: 651–659.
- [22] LEI ZM, TO TH P, RAO CV, PRIDHAM D. Novel coexpression of human chorionic gonadotropin (hCG)/human luteinizing hormone receptors and their ligand hCG in human fallopian tubes. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; **77**: 863–872.
- [23] MC FARLAND KC, SPRENGEL R, PHILLIPS HS, KOHLER M, ROSEMBLIT N, NICOLICS K, SEGALOFF DL, SEEBURG PH. Lutropin-choriogonadotropin receptor: An unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 1989; **245**: 494–499.
- [24] MINEGISHI T, NAKAMURA K, TAKAKURA Y, MIYAMOTO K, HASEGAWA Y, IBUKI Y, IGARASHI M. Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **172**: 1049–1054.
- [25] MISRAHI M, LOOSFELT H, ATGER M, SAR S, GUIOCHON-MANTEL A, MILGROM E. Cloning, sequencing and expression of human TSH receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **166**: 394–403.
- [26] MOYLE WR, BERNARD MP, MYERS RV, MARKO OM, STRADER CD. Lutropin/ $\beta$ -adrenergic receptor chimeras bind choriogonadotropin and adrenergic ligands but are not expressed at the cell surface. *J Biol Chem* 1991; **266**: 10807–10812.
- [27] MOYLE WR, CAMPBELL RK, RAO SNV, AYAD NG, BERNARD MP, HAN Y, WANG Y. Model of human chorionic gonadotropin and lutropin receptor interaction that explains signal transduction of the glycoprotein hormones. *J Biol Chem* 1995; **270**: 20020–20031.
- [28] NEITZ M, NEITZ J, JACOBS GH. Spectral tuning of pigments underlying red-green color vision. *Science* 1991; **252**: 971–974.

- [29] NOMURA N, ZU YL, MAEKAWA T, TABATA S, AKIYAMA T, ISHII S. Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1. *J Biol Chem* 1993; **268**: 4259–4266.
- [30] PANTEL J, REMY JJ, SALESSE R, JOLIVET A, BIDART JM. Unmasking of an immunoreactive site on the  $\beta$  subunit of human choriogonadotropin bound to the extracellular domain of its receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **195**: 588–593.
- [31] PARMA J, DUPREZ L, VAN SANDE J, PASCHKE R, TONACCHERA M, DUMONT J, VASSART G. Constitutively active receptors as a disease-causing mechanism. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **100**: 159–162.
- [32] RAO CV, LI X, TOTH P, LEI ZM, COOK VD. Novel expression of functional human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in human umbilical cords. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; **77**: 1706–1714.
- [33] REED DK, RYAN RJ, MC CORMICK DJ. Residues in the  $\beta$  subunit of human choriotropin that are important for interaction with the lutropin receptor. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14251–14255.
- [34] REMY JJ, BOZON V, COUTURE L, GOXE B, SALESSE R, GARNIER J. Reconstitution of a high-affinity functional lutropin receptor by coexpression of its extracellular and membrane domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **193**: 1023–1030.
- [35] REN Q, KUROSE H, LEFKOWITZ RJ, COTECCHIA S. Constitutively active mutants of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1993; **268**: 16483–16487.
- [36] RESHEF E, LEI ZM, RAO CV, PRIDHAM D, CHEGINI N, LUBORSKY JL. The presence of gonadotropin receptors in non pregnant human uterus, human placenta, fetal membranes and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; **70**: 421–430.
- [37] ROSENTHAL W, SEIBOLD A, ANTARAMIAN A, LONERGAN M, ARTHUS MF, HENDY GN, BIRNBAUMER M, BICHET DG. Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* 1992; **359**: 233–235.
- [38] SAMAMA P, COTECCHIA S, COSTA T, LEFKOWITZ RJ. A mutation-induced activated state of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* 1993; **268**: 4625–4636.
- [39] SHENKER A, LAUE L, KOSUGI S, MERENDINO JJ, MINEGISHI T, CUTLER GB. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* 1993; **365**: 652–654.
- [40] SPRENGEL R, BRAUN T, NIKOLICS K, SEGALOFF DL, SEEBURG PH. The testicular receptor for follicle stimulating hormone: Structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 525–530.
- [41] STRADER CD, FONG TM, TOTA MR, UNDERWOOD D, DIXON RAF. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 1994; **63**: 101–132.
- [42] TOTH P, LI X, RAO CV, LINCOLN SR, SANFILIPPO JS, SPINNATO JA, YUSSMAN MA. Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **79**: 307–315.
- [43] TRUMPP-KALLMEYER S, HOFACK J, BRUINVELS A, HIBERT M. Modeling of G-protein-coupled receptors: Application to dopamine, adrenaline, serotonin, acetylcholine, and mammalian opsin receptors. *J Med Chem* 1992; **35**: 3448–3462.
- [44] TSAI-MORRIS CH, BUCZKO E, WANG W, DUFAU ML. Intronic nature of the rat luteinizing hormone receptor gene defines a soluble receptor subspecies with hormone binding activity. *J Biol Chem* 1990; **265**: 19385–19388.
- [45] XIE Y-B, WANG H, SEGALOFF DL. Extracellular domain of lutropin/choriogonadotropin receptor expressed in transfected cells binds choriogonadotropin with high affinity. *J Biol Chem* 1990; **265**: 21411–21414.

- [46] YAGHMAI R. HAZELBAUER GL. Ligand occupancy mimicked by single residue substitutions in a receptor: Transmembrane signaling induced by mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7890–7894.
- [47] ŻAK I, DRÓZDŹ M. Struktura, biosynteza i funkcja oligosacharydów glikohormonów. *Post Bioch* 1994; **40**: 113–120.

*Redaktor prowadzący: Szczepan Biliński*

*Otrzymano: 11 grudnia 1996 r.*

*Przyjęto: 7 lutego 1997 r.*

*Adres autora: 60-781 Poznań, ul. Święcickiego 6,*



## WPŁYW CYTOKIN NA FUNKCJONOWANIE CIAŁKA ŻÓŁTEGO

### THE EFFECT OF CYTOKINES ON THE *CORPUS LUTEUM* FUNCTION

Agnieszka STĘPIEŃ, Barbara JANA

Oddział Endokrynologii i Patofizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn-Kortowo

*Streszczenie:* Cytokiny mają wpływ na powstawanie, funkcjonowanie i regresję ciała żółtego. Podczas luteolizy IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  hamują produkcję progesteronu stymulowaną gonadotropinami, wzmagają zaś syntezę prostaglandyn przez komórki lutealne. TNF- $\alpha$  sprzyja tworzeniu lutealnych prostaglandyn poprzez stymulację fosfolipazy A<sub>2</sub>, podczas gdy IL-1 $\beta$  może aktywować zarówno fosfolipazę A<sub>2</sub>, jak i fosfolipazę C oraz syntazę prostaglandyn. W trakcie regresji ciała żółtego dochodzi do wzmożonej ekspresji białek głównego układu zgodności tkankowej (MHC) klasy I i pojawienia się białek MHC klasy II na powierzchni komórek lutealnych. Odbywa się to pod wpływem IFN- $\gamma$ . Ekspresja tych białek jest zahamowana w okresie wczesnej ciąży. Cytokiny mogą wywierać toksyczny wpływ na komórki lutealne, zwłaszcza połączone działanie IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  powoduje znaczne obniżenie żywotności komórek. Konieczne są dalsze badania mające na celu określenie wpływu hormonów na procesy modulowane przez rezydujące w ciałku żółtym komórki układu immunologicznego.

*Słowa kluczowe:* ciało żółte, cytokiny, luteoliza, główny układ zgodności tkankowej

*Summary:* Cytokines have an effect on formation, function and regression of corpus luteum. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  inhibit gonadotropin-stimulated progesteron production and enhance prostaglandin synthesis during luteolysis. TNF- $\alpha$  stimulates primarily phospholipase A<sub>2</sub>, whereas IL-1 $\beta$  may activate phospholipase A<sub>2</sub> as well as phospholipase C and prostaglandin synthase. Enhanced expression of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and induction of MHC class II molecules on luteal cells during luteolysis are observed. These changes are results of exposure to IFN- $\gamma$ . Expression of MHC molecules is suppressed in early pregnancy. Cytokines may exert cytotoxic effect on luteal cells, especially combined action of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  decreases the number of viable cells. The aim of the further studies will be the determination of the hormones influence on the processes modulated by immunological cells present in the corpus luteum.

*Key words:* corpus luteum, cytokines, luteolysis, major histocompatibility complex

## WSTĘP

Cykl rujowy zwierząt domowych jest zdominowany przez obecność w pełni funkcjonującego ciała żółtego. Utrzymuje się ono przez blisko 3/4 trwania cyklu, a jeśli dojdzie do zapłodnienia, również podczas ciąży. Ciało żółte jest jedną z najbardziej aktywnych metabolicznie tkanek organizmu. Komórki lutealne akumulują duże ilości cholesterolu, który jest prekursorem syntezy progesteronu – głównego produktu sekrecyjnego ciała żółtego. Progesteron jest hormonem biorącym udział w regulacji uwalniania gonadotropin i utrzymaniu ciąży. Ciało żółte produkuje także oksytocynę (OT), wazopresynę argininową (AVP) – hormony powszechnie syntezowane przez komórki mózgu oraz relaksynę i czynniki wzrostu [34].

Mimo istotnej roli, jaką odgrywa ciało żółte w regulacji cyklu rujowego i we wczesnej ciąży, mechanizmy jego regresji bądź utrzymania wciąż nie są dokładnie poznane. Sygnałem inicjującym luteolizę jest prostaglandyna  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) pochodząca z macicy. W odpowiedzi na uwolnienie  $PGF_{2\alpha}$  w ciałku żółtym pojawiają się liczne zmiany morfologiczne i biochemiczne.

W literaturze można znaleźć coraz więcej danych na temat wpływu układu immunologicznego na powstawanie, funkcjonowanie i regresję ciała żółtego. Celem pracy jest przedstawienie udziału komórek układu immunologicznego i produkowanych przez nie cytokin w funkcjonowaniu ciała żółtego, a zwłaszcza w jego luteolizie. Praca została przygotowana na podstawie wyników badań przeprowadzonych głównie na ciałku żółtym krowy. Niemniej dla pełnego obrazu przedstawiono również dane dotyczące innych gatunków.

## KOMÓRKI UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

Podstawowymi komórkami układu immunologicznego są limfocyty T, limfocyty B oraz komórki prezentujące antygen limfocytom T, do których zalicza się limfocyty B, makrofagi i komórki dendrytyczne.

Limfocyty T biorą udział w odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego poprzez reagowanie z antygenem, uwalnianie cytokin i zabijanie komórek docelowych. Ze względu na pełnione funkcje dzieli się je na 3 klasy:

- limfocyty T cytotoksyczne ( $T_c$ ) – zdolne do zabicia innych komórek (obcych, nowotworowych, a w szczególnych wypadkach – własnych);
- limfocyty T supresorowe ( $T_s$ ) – hamujące odpowiedź układu immunologicznego poprzez działanie na limfocyt rozpoznający antygen;
- limfocyty T pomocnicze ( $T_h$ ) – wspomagające odpowiedź układu immunologicznego zarówno przez bezpośredni kontakt, jak i uwalniane cytokiny [20].

Limfocyty B biorą udział w odpowiedzi typu humoralnego, tj. produkują i uwalniają przeciwciała. Jako komórki prezentujące antygen mają zdolność swoistego rozpoznawania i reagowania z antygenami [20].

Makrofagi są jednojądrzastymi komórkami żernymi. Zawierają liczne lizosomy i wakuole. Produkują i uwalniają cytokiny [20].

Cytokiny, będące produktami komórek układu immunologicznego, są rozpuszczalnymi glikoproteidami. Określa się je mianem mediatorów reakcji zapalnych i immunologicznych. Zarówno cytokiny, jak i hormony mają działanie auto-, para- i endokrynowe. W przeciwieństwie jednak do hormonów, cytokiny nie mają znaczenia homeostatycznego, a swoje działanie wywierają przy znacznie niższym stężeniu molowym. Wpływ cytokin na szereg procesów w organizmie jest potęgowany przez inne cytokiny, a także czynniki wzrostu oraz hormony [25].

Pojęcie cytokiny obejmuje następujące związki: interferony (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ), czynniki martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), interleukiny (IL-1–IL-15), czynniki stymulujące tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), transformujące czynniki wzrostu (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) [20].

Zależnie od pochodzenia cytokiny są określane jako limfokiny (uwalniane przez limfocyty) albo monokiny (uwalniane przez monocyty i makrofagi) [20].

Do niedawna sądzono, że cytokiny są produkowane tylko przez komórki układu immunologicznego. Ostatnie 10 lat badań nad udziałem cytokin w regulacji funkcji układu endokrynowego wykazało, że zmianom w równowadze hormonalnej towarzyszy ostra odpowiedź układu immunologicznego. Co więcej, wiele komórek układu endokrynowego uwalnia cytokiny, a wiele klasycznych hormonów (kortykotropina, wazopresyna, prolaktyna, progesteron) ma wpływ na produkcję cytokin przez komórki układu immunologicznego [25]. Zgromadzono dane o obecności mRNA dla TNF- $\alpha$  w komórkach lutealnych [47] oraz o obecności mRNA dla TNF- $\alpha$  i IL-1 w komórkach glejowych, w podwzgórzowych komórkach produkujących CRF, w komórkach osłonki wewnętrznej i komórkach ziarnistych jajnika [25, 39] oraz w macicy [10, 17, 18]. Ponadto wykazano, iż IL-1 jest uwalniana przez komórki epitelialne i endotelialne, fibroblasty i hepatocyty [29]. Natomiast TNF- $\alpha$  jest uwalniany przez komórki ziarniste, oocyty, komórki trofoblastu i komórki zarodka [17, 25].

Cytokiny uczestniczą zarówno w procesach patologicznych jak i fizjologicznych, a ich działanie może mieć charakter pobudzający bądź hamujący.

## **WPLYW CYTOKIN NA OŚ PODWZGÓRZE-PRZYSADKA-JAJNIK**

IL-1 (zarówno IL-1 $\alpha$ , jak i IL-1 $\beta$ ) hamuje produkcję hormonu uwalniającego gonadotropiny (GnRH) w podwzgórzu. Odbywa się to przy udziale czynnika uwalniającego kortykotropinę (CRF), AVP, noradrenaliny, PG, endorfiny. Natomiast TNF- $\alpha$  działa stymulująco na komórki podwzgórza, zwiększając ilość uwalnianego GnRH. Molekularny mechanizm działania tej cytokiny nie jest do końca poznany.

Na poziomie przysadki najważniejszą cytokiną jest IL-2, która pobudza uwalnianie hormonu luteinizującego (LH). Wpływ IL-1 jest dwojaki: stymuluje sekrecję LH (bezpośrednio lub pośrednio przez aktywację IL-6) oraz hamuje uwalnianie hormonu folikulotropowego (FSH) [25].

Wpływ cytokin na aktywność sekrecyjną jajnika jest różny w zależności od typu komórek i stopnia ich zróżnicowania. IL-1 podnosi poziom produkcji progesteronu w komórkach osłonki wewnętrznej chomika [28]. Hamuje natomiast podstawową i stymulowaną przez LH syntezę progesteronu w komórkach ziarnistych świń [14]. W bydłych komórkach lutealnych IL-1 blokuje syntezę progesteronu i znacznie zwiększa produkcję prostaglandyn [29]. Interferon- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  wywołują efekt podobny do obserwowanego w przypadku IL-1: hamują tworzenie receptorów LH [22] i steroidogenezę w szczurzych komórkach ziarnistych [15]. TNF- $\alpha$  wzmacnia syntezę progesteronu przez komórki osłonki wewnętrznej [38], natomiast zarówno TNF- $\alpha$ , jak i IFN- $\gamma$  hamują produkcję tego hormonu przez komórki lutealne bydła [7]. Obie te cytokiny współdziałając ze sobą wywierają działanie cytotoxiczne na komórki lutealne [7].

Badania z kilku ostatnich lat wskazują na istotną rolę cytokin we wzroście pęcherzyków jajnikowych, ich dojrzewaniu, tworzeniu i funkcjonowaniu ciała żółtego oraz jego późniejszej luteolizie [32].

Zaobserwowano, że przedowulacyjne pęcherzyki jajnikowe wydzielają substancję o działaniu chemotaktycznym dla leukocytów co sprzyja owulacji [32]. W procesie owulacji zaangażowana jest głównie IL-1 $\beta$  [19]. Brännström i wsp. (1993a) donoszą, iż powoduje ona owulację w szczurzych jajnikach perfundowanych *in vitro* oraz znacznie podnosi wskaźnik owulacji indukowanej przez LH [32]. Podobny efekt obserwowano w przypadku TNF- $\alpha$  [9].

Bardzo mało wiadomo o udziale cytokin w procesie luteinizacji i wczesnej fazie lutealnej [32]. TNF- $\alpha$  zwiększa syntezę progesteronu w luteinizujących komórkach osłonki wewnętrznej jajnika szczura [38] oraz ludzkich komórkach ziarnistych [48]. Yan i wsp. [48] wysunęli tezę, iż TNF- $\alpha$  sprzyja tworzeniu ciała żółtego przez podwyższenie proliferacji i steroidogenezy w komórkach ziarnistych ulegających luteinizacji. Z kolei IL-1 hamuje luteinizację komórek ziarnistych świni w warunkach *in vitro* [14, 22].

## UDZIAŁ CYTOKIN W LUTEOLIZIE – MECHANIZM DZIAŁANIA

Układ immunologiczny wpływa na funkcjonowanie ciała żółtego pośrednio (oś podwzgórze-przysadka-jajniki) oraz bezpośrednio (przez interakcje cytokin z komórkami lutealnymi). Wykazano, że makrofagi i inne typy leukocytów są obecne w ciałku żółtym w ciągu całego okresu jego funkcjonowania, a ich ilość wzrasta



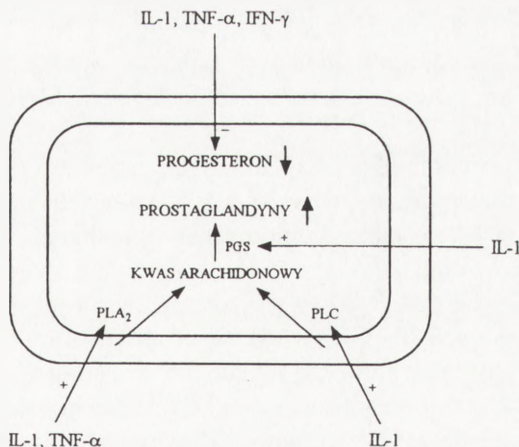
znacznie tuż przed luteolizą [2, 18]. Dokładnie poznano udział w luteolizie trzech podstawowych cytokin: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  (rys. 1).

a. IL-1 $\beta$  obniża zarówno podstawową, jak i stymulowaną przez LH syntezę progesteronu w komórkach lutealnych oraz zwiększa produkcję prostaglandyn lutealnych. Dodatek IL-1 $\beta$  do hodowli komórek lutealnych powodował po 6 godz. wzrost aktywności fosfolipazy A<sub>2</sub> oraz, w mniejszym stopniu, fosfolipazy C. Obie fosfolipazy zwiększają uwalnianie kwasu arachidowego z fosfolipidów błony komórkowej, wykorzystywanego do syntezy prostaglandyn. Po chronicznej (72 godz.) ekspozycji komórek lutealnych na IL-1 $\beta$  obserwowano zwiększoną zdolność kwasu arachidowego do przemiany w prostaglandyny, co sugeruje wpływ tej interleukiny na aktywność syntazy prostaglandyn [32].

b. Wpływ TNF- $\alpha$  jest podobny do działania IL-1 $\beta$ : hamuje syntezę progesteronu i stymuluje produkcję prostaglandyn. W odróżnieniu jednak od IL-1 $\beta$  aktywuje on jedynie fosfolipazę A<sub>2</sub>, natomiast nie wiadomo, czy ma wpływ na aktywność syntetazy prostaglandyn [32].

c. IFN- $\gamma$  wywiera dwufazowy wpływ na komórki ciała żółtego. Podczas pierwszych 24 godz. nie obserwowano jego wpływu na syntezę progesteronu, hamował on natomiast produkcję prostaglandyn. W siedemdziesiątej drugiej godzinie doświadczenia nie było różnic między komórkami traktowanymi IFN- $\gamma$  a kontrolnymi. Po tym czasie zauważono wyraźnie hamujący wpływ tej cytokiny na syntezę progesteronu stymulowaną przez LH oraz stymulujący na produkcję lutealnych prostaglandyn [32].

Istniało przypuszczenie, że endogenne prostaglandyny wzmagają działanie IFN- $\gamma$  na syntezę progesteronu. Badano wpływ IFN- $\gamma$  zarówno w obecności, jak i przy braku indometacyny (bloker syntezy prostaglandyn). Okazało się, że hamujące dzia-



Rys. 1. Schemat ilustrujący wpływ cytokin na komórkę lutealną: PGS – syntetaza prostaglandyn, PLC – fosfolipaza C, PLA<sub>2</sub> – fosfolipaza A<sub>2</sub> (na podstawie prac [32,54])

łanie tej cytokiny na produkcję progesteronu jest jednakowo skuteczne w obu przypadkach, co wyklucza zakładaną możliwość [32].

## UDZIAŁ GŁÓWNEGO UKŁADU ZGODNOŚCI TKANKOWEJ W LUTEOLIZIE

Luteoliza funkcjonalna przejawia się gwałtownym obniżeniem zdolności ciała żółtego do syntezy i sekrecji progesteronu. Odpowiedzialna za to jest  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , wytwarzana w błonie śluzowej macicy u wielu gatunków [5, 6, 8, 12, 16, 21, 23, 24, 27, 33, 40, 41, 45, 46].

Fakt, iż po zainicjowaniu luteolizy przez prostaglandynę  $\text{F}_{2\alpha}$  następuje ekspresja na komórkach lutealnych białek głównego układu zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex* – MHC) jest potwierdzeniem przypuszczeń o aktywnym udziale układu immunologicznego w regresji ciała żółtego.

MHC obejmuje szereg genów odznaczających się bardzo dużym polimorfizmem. Kodują one strukturę i ekspresję białek powierzchniowych, które mają decydujące znaczenie w transplantologii i immunologii. Najważniejszą funkcją białek MHC jest wiązanie i prezentowanie antygenów limfocytom T, aktywując je w ten sposób [20].

Wyróżnia się cząsteczki MHC klasy I i II, które różnią się zarówno budową, jak i funkcją. Białka MHC I występują na wszystkich komórkach jądrzastych, a w niewielkich ilościach również na erytrocytach. Natomiast białka MHC II występują głównie na limfocytach T, makrofagach i komórkach dendrytycznych. W wyniku działania niektórych cytokin mogą się pojawiać na wielu innych typach komórek, w tym także na komórkach lutealnych [6, 20].

Czynnikiem indukującym pojawianie się białek MHC II na komórkach lutealnych jest prawdopodobnie  $\text{IFN-}\gamma$  pochodzący z limfocytów T [6, 11, 31, 41]. Dodanie  $\text{IFN-}\gamma$  do kultur krowich komórek lutealnych wyraźnie zwiększało ekspresję białek MHC II. Interferon ten powoduje też nasilenie ekspresji MHC I na powierzchni komórek lutealnych [31].

Ciało żółte krowy, podobnie jak i wielu innych gatunków zwierząt, jest tworem heterogenicznym składającym się z małych i dużych komórek lutealnych, fibrocytów, elementów naczyniowych, a także komórek endotelialnych i immunologicznych [6, 12]. We wczesnym ciałku żółtym (6 d.c.) dominują małe komórki lutealne, podczas gdy w CL z 10 dnia cyklu wyraźnie zaznacza się przewaga ilościowa dużych komórek lutealnych. Benyo i wsp. [6] obserwowali ekspresję MHC klasy II na powierzchni bydłęcych komórek lutealnych w ciałku żółtym pochodzącym z różnych okresów cyklu rujowego. Ekspresja MHC II na komórkach ciała żółtego z 6 dnia cyklu była niewielka. W 10 dniu cyklu zauważono wyraźnie zwiększoną ilość tych białek na dużych komórkach, podczas gdy ich ilość na małych komórkach

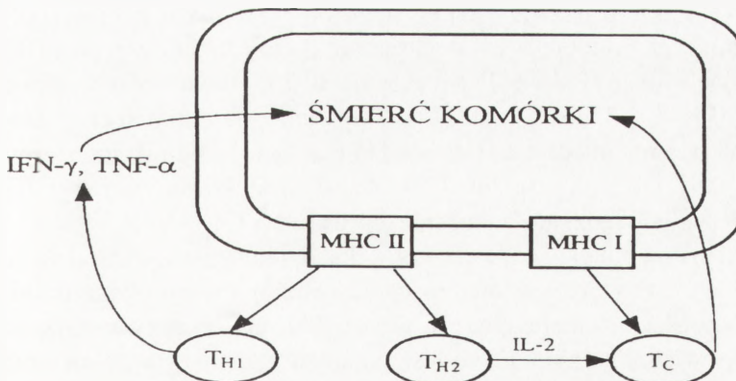
lutealnych nie uległa zmianie. Ekspresja MHC II wzrastała w miarę zbliżania się luteolizy i była największa na wszystkich typach komórek tuż przed jej rozpoczęciem [6]. Białka MHC obserwowano również na komórkach lutealnych podczas luteolizy indukowanej  $\text{PGF}_{2\alpha}$  [6, 31].

Białka MHC po rozpoznaniu i związaniu antygenów prezentują je limfocytom T pomocniczym i cytotoksycznym (rys. 2). Limfocyty klasy Th ( $\text{Th1}$  i  $\text{Th2}$ ) po zaktywizowaniu uwalniają cytokiny, które z jednej strony działają toksycznie bezpośrednio na komórki lutealne ( $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ ), a z drugiej strony pobudzają (np.  $\text{IL-2}$ ) limfocyty  $\text{Tc}$ . Z kolei limfocyty klasy  $\text{Tc}$ , uaktywnione przez białka MHC bądź cytokiny, wywierają bezpośrednie toksyczne działanie na komórki lutealne.

## TOKSYCZNY WPLYW CYTOKIN NA KOMÓRKI LUTEALNE – MEDIATORY DESTRUKCJI KOMÓRKOWEJ

Cytokiny mogą mieć toksyczny wpływ na komórki docelowe [32, 34].  $\text{IL-1}$  obniża żywotność komórek lutealnych podczas procesu luteolizy. Jest to prawdopodobnie związane ze zwiększeniem ilości wewnątrzkomórkowego tlenu azotu. Jednak molekularny mechanizm toksycznego działania tej cytokiny nie jest dokładnie poznany [32].

Dużo większe obniżenie żywotności komórek lutealnych obserwowano w przypadku jednoczesnego działania  $\text{TNF-}\alpha$  i  $\text{IFN-}\gamma$  [7, 31, 34]. W toksycznym wpływie tych dwóch cytokin pośredniczą metabolity kwasu arachidowego, wolne rodniki nadtlenkowe i aktywacja fosfolipazy  $\text{A}_2$  [31, 36, 43]. Z drugiej jednak strony zahamowanie metabolizmu kwasu arachidowego czy aktywności fosfolipazy  $\text{A}_2$  nie zapobiega luteolizie [32]. Stąd też przypuszczenie, że cytokiny te działają przede wszystkim przez wzrost koncentracji rodników nadtlenkowych i/lub wzrost wra-



Rys. 2. Schemat ilustrujący udział białek MHC w luteolizie (na podstawie prac [31,32,34])



zliwości komórek na toksyczne działanie tych rodników [26, 32, 44]. Jak wiadomo, zawartość utleniacza, jakim jest witamina C, jest znacznie obniżona w komórkach lutealnych podczas luteolizy. Jest to skutek działania macicznej  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , która powoduje, że witamina C jest usuwana z komórek do krwi [1, 35]. Utrata utleniacza indukuje akumulację toksycznych tlenków, co w efekcie prowadzi do zmian przepuszczalności błon komórkowych i śmierci komórek [32, 34].

## UDZIAŁ UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO W PIERWSZYM OKRESIE CIĄŻY

Skoro układ immunologiczny bierze udział w luteolizie należałoby się spodziewać zmian w odpowiedzi immunologicznej podczas ciąży, pozwalających ją utrzymać. I rzeczywiście wraz z rozpoczęciem ciąży proces immunologiczny zaangażowany w luteolizę zostaje zmieniony.

U zwierząt nie będących w ciąży ciało żółte zanika, a sygnał do rozpoczęcia luteolizy pochodzi z macicy (usunięcie macicy blokuje regresję ciała żółtego) i jest nim  $\text{PGF}_{2\alpha}$  [13, 23]. Natomiast podczas ciąży ochrona ciała żółtego jest podstawowym warunkiem przeżycia zarodka i dlatego produkuje on białko będące sygnałem antyluteolitycznym. Białko to zapobiega luteolizie poprzez blokowanie lub ograniczenie uwalniania  $\text{PGF}_{2\alpha}$  do krwi żyłnej macicznej [3, 4, 30, 42].

Jako pierwszy został zidentyfikowany sygnał antyluteolityczny pochodzący z zarodków owczych. Nazwano go owczym białkiem trofoblastycznym-1 (oTP-1 – *ovine trophoblast protein-1*) [4, 42]. oTP-1 (o masie molowej 19000) jest uwalniany między 10 a 21 dniem ciąży. Kiedy podano go do światła macicy cyklicznych owiec między 12 a 18 dniem cyklu, zaobserwowano znaczne osłabienie pulsacyjnego uwalniania  $\text{PGF}_{2\alpha}$  i w efekcie wydłużenie czasu trwania ciała żółtego [37].

Badania przeprowadzone u bydła wykazały, że około 15 dnia ciąży trofoblast z małym zarodkiem w kształcie dysku uwalnia białko, pod względem ciężaru porównywalne z oTP-1, które nazwano bTP-1 (*bovine trophoblast protein-1*). Oba białka wykazują znaczne podobieństwo strukturalne do interferonów typu I ( $\text{IFN-}\alpha$  i  $\text{IFN-}\beta$ ) [3, 42]. cDNA dla oTP-1 i bTP-1 wykazuje 30% podobieństwo w sekwencji aminokwasów z  $\text{IFN-}\beta$  i 55–65% z  $\text{IFN-}\alpha$  [30]. Natomiast największy stopień pokrewieństwa występuje między oTP-1 i bTP-1 a tzw "długim" interferonem. Ten interferon, znany jako  $\text{IFN-}\alpha_{11}$  lub  $\text{IFN-}\omega$ , jest produkowany wraz z  $\text{IFN-}\alpha$  przez leukocyty w odpowiedzi na zakażenie wirusowe [37].

Obserwacje ekspresji białek MCH na komórkach lutealnych pochodzących z 18–20 dnia ciąży wykazały, że jest ona znacznie obniżona w porównaniu do obserwowanej na komórkach lutealnych z 18 dnia cyklu. Do tej pory nie uzyskano jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, co jest sygnałem hamującym pojawianie się tych białek. Prawdopodobnie jest to jedno z białek trofoblastycznych. Pate [32]



podaje nazwę tego związku jako IFN- $\tau$ . Podanie IFN- $\alpha$ , który ma biologiczne działanie identyczne jak IFN- $\tau$ , spowodowało zahamowanie ekspresji białek MHC na powierzchni komórek lutealnych [32].

Blokowanie sekrecji PGF $_{2\alpha}$  z macicy przez oTP-1 i bTP-1 oraz hamowanie ekspresji białek MHC na powierzchni komórek lutealnych zapobiega regresji ciała żółtego i pozwala na produkcję progesteronu w takiej ilości, która jest niezbędna do prawidłowego przebiegu ciąży.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że cytokiny nie tylko są mediatorami procesów zapalnych, ale także uczestniczą w regulacji procesów fizjologicznych. Funkcjonowanie i regresja ciała żółtego pozostaje pod kontrolą nie tylko hormonów wydzielanych z przysadki mózgowej i macicy, ale również znajdujących się w ciałku żółtym makrofagów i limfocytów T. Molekularne mechanizmy działania cytokin wymagają dalszych badań w celu dokładnego ich poznania.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ATEN RF, DUARTE KM, BEHRMAN HR. Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione and lipid peroxidant by luteinizing hormone and prostaglandin F $_{2\alpha}$ . *Biol Reprod* 1992; **46**: 401–407.
- [2] BAGAVANDOSS P, KUNKEL SL, WIGGINS RC, KEYES PL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production and localization of macrophages and T lymphocytes in the rabbit *corpus luteum*. *Endocrinology* 1988; **122**: 1185–1187.
- [3] BARROSCM, PLANTEC, THATCHER WW, HANSEN PJ. Regulation of bovine endometrial secretion of prostaglandins and synthesis of 2',5'-oligoadenylate synthetase by interferon- $\alpha$  molecules. *Am J Reproductive Immunology* 1991; **25**: 146–152.
- [4] BAZER FW. Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals. *PSEMB* 1992; **199**: 373–384.
- [5] BEHRMAN HR, MACDONALD GJ, GREEP RO. Regulation of ovarian cholesterol esters: Evidence for enzymatic sites of prostaglandin-induced loss of *corpus luteum* function. *Lipids* 1971; **6**: 791–96.
- [6] BENYO DF, HAIBEL GF, LAUFMAN HB, PATE JL. Expression of major histocompatibility complex antigens on the bovine *corpus luteum* during the estrous cycle, luteolysis and early pregnancy. *Biol Reprod* 1991; **45**: 229–234.
- [7] BENYO DF, PATE JL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology* 1992; **130**: 854–860.
- [8] BRADEN TD, GAMBONI F, NISWENDER GD. Effects of prostaglandin F $_{2\alpha}$ -induced luteolysis on the populations of cells in the ovine *corpus luteum*. *Biol Reprod* 1988; **39**: 245–253.
- [9] BRÄNNSTRÖM M, BONELLO N, WANG LJ, NORMAN RJ. Effects of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) on ovulation in the rat ovary. *Reprod Fertil Dev* 1995; **7**: 67–73.
- [10] DE M, SANFORD TR, WOOD GW. Expression of IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  in mouse uterus during the peri-implantation period of pregnancy. *J Reprod Fertil* 1993; **97**: 83–89.
- [11] FAIRCHILD DL, PATE JL. Interferon-gamma induction of major histocompatibility complex antigens on cultured bovine luteal cells. *Biol Reprod* 1989; **40**: 453–457.
- [12] FITZ TA, MAYAN MH, SAWYER HR, NISWENDER GD. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine *corpus luteum*. *Biol Reprod* 1982; **27**: 703–708.
- [13] FLINT APF, LAMMING GE, STEWART HJ. A role for interferons in the maternal recognition of pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 1988; **58**: 109–111.

- [14] FUKUOKA M, TAKAHIDE M, SHUNZO T, KEIKO Y. Interleukin-1 inhibits luteinization of porcine granulosa cells in culture. *Endocrinology* 1988; **122**: 367–371.
- [15] GOROSPE WC, TUCHEL T, KASSON BS.  $\gamma$ -interferon inhibits rat granulosa cell differentiation in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **157**: 891–895.
- [16] HAWKINS DE, BELFIORE CJ, KILE JP, NISWENDER GD. Regulation of messenger ribonucleic acid encoding  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 1993; **48**: 1185–1190.
- [17] HUNT JS, CHEN HL, HU X, POLLARD W. Normal distribution of tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA and protein in the uteri, placentas and embryos of osteopetrotic mice lacking CSF-1. *Biol Reprod* 1993; **49**: 441–452.
- [18] HUNT JS, CHEN HL, HU X, TABIBZADEH S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  messenger RNA and protein in human endometrium. *Biol Reprod* 1992; **47**: 141–147.
- [19] HURWITZ A, HERNANDEZ ER, PAYNE DW, DHARMARAJAN AM, ADASHI EY. Interleukin-1 Is Both Morphogenic and Cytotoxic to Cultured Rat Ovarian Cells: Obligatory Role for Heterologous, Contact-Independent Cell-Cell Interaction. *Endocrinology* 1992; **131**: 1643–1649.
- [20] JAKÓBISIAK M. Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN 1996; Warszawa.
- [21] JUENGEL JL, SMITH GW, SMITH MF, YOUNGQUIST RS, GARVERICK HA. Pattern of protein production by bovine corpora lutea during luteolysis and characterization of expression of two major secretory products of regressing corpora lutea. *J Reprod Fertil* 1994; **100**: 515–520.
- [22] KAMIŃSKI T, PRZAŁA J. Czynniki wzrostowe w jajniku. *Post Biol Kom* 1994; **1**: 79–92.
- [23] KNICKERBOCKER JJ, WILTBANK MC, NISWENDER GD. Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. *Domestic Animal Endocrinology* 1988; **5**: 91–107.
- [24] LI XM, JUORIO AV, MURPHY BD. Prostaglandins alter the abundance of mRNA for steroidogenic enzymes in cultured porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1993; **48**: 1360–1366.
- [25] MANDRUP-POULSEN T, NERUP J, REIMERS JI, POCIOT F, ANDERSEN HU, KARLSEN A, BJERRE U, BERGHOLDT R. Cytokines and the endocrine system. I. The immunoenocrine network. *Europ J Endocrinol* 1995; **133**: 660–671.
- [26] MARCHOZ, WHITE JE, HIGGINS PJ, TSAN M. Tumor necrosis factor enhances endothelial cell susceptibility to oxygen toxicity. Role of glutathione. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; **5**: 556–562.
- [27] MIYAMOTO A, LUTZOW HV, SCHAMS D. Acute actions of prostaglandin  $F_{2\alpha}$ ,  $E_2$  and  $I_2$  in microdialyzed bovine corpus luteum in vitro. *Biol Reprod* 1993; **49**: 423–430.
- [28] NAKAMURA Y, KATO H, TERRANOVA PF. Interleukin-1 $\alpha$  increases thecal progesterone production of preovulatory follicles in cyclic hamsters. *Biol Reprod* 1990; **43**: 169–173.
- [29] NOTHNICK WB, PATE JL. Interleukin-1 $\beta$  is a potent stimulator of prostaglandin synthesis in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 1990; **43**: 898–903.
- [30] PARKINSON TJ, LAMMING GE, FLINT APF, JENNER LJ. Administration of recombinant bovine interferon- $\alpha_1$  at the time of maternal recognition of pregnancy inhibits prostaglandin  $F_{2\alpha}$  secretion and causes luteal maintenance in cyclic ewes. *J Reprod Fert* 1992; **94**: 489–500.
- [31] PATE JL. Cellular components involved in luteolysis. *J Anim Sci* 1994; **72**: 1884–1890.
- [32] PATE JL. Involvement of immune cells in regulation of ovarian function. *J Reprod Fertil Suppl* 1995; **49**: 365–377.
- [33] PATE JL, CONDON WA. Regulation of steroidogenesis and cholesterol synthesis by prostaglandin  $F_{2\alpha}$  and lipoproteins in bovine luteal cells. *J Reprod Fertil* 1989; **87**: 439–446.
- [34] PATE JL, TOWNSON DH. Novel local regulators in luteal regression. *J Anim Sci* 1994; **72** (Suppl. 3): 31–42.
- [35] PETROFF BK, CIERESZKO RE, DABROWSKI K, OTTOBRE AC, POPE WF, OTTOBRE JS. Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  depletes luteal vitamin C by inducing secretion of the vitamin from porcine corpora lutea. 1996 (w druku).

- [36] RABINOVITCH A, BAQUERIZO H, SUMOSKI W. Cytotoxic effects of cytokines on islet  $\beta$ -cells. Evidence for involvement of eicosanoids. *Endocrinology* 1990; **126**: 67–71.
- [37] ROBERTS RM. A Role for Interferons in Early Pregnancy. *BioEssays* 1991; **3**: 121–126.
- [38] ROBY KF, TERRANOVA PF. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  *in vitro* on steroidogenesis of health and atretic follicles of the rat: Theca as a target. *Endocrinology* 1990; **126**: 2711–2718.
- [39] SANCHO-TELLO M, PEREZ-ROGER I, IMAKAWA K, TERRANOVA PF. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the rat ovary. *Endocrinology* 1992; **130**: 1359–1364.
- [40] SHIAO TF, BERGFELT DR, GINTHER OJ, WILTBANK MC. Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  receptors in the early *corpus luteum* of heifers. *J Dairy Sci* 1993; **76** (Suppl. 1): 285 (Abstr.).
- [41] STERN J, COULAM CB. New concepts in ovariam regulation: an immune insight. *Am J Reprod Immunol* 1992; **27**: 136–144.
- [42] STEWART HJ, MCCANN SHE, NORTHROP AJ, LAMMING GE, FLINT APF. Sheep antyluteolytic interferon: cDNA sequence and analysis of mRNA levels. *J Mol Endocrinol* 1989; **2**: 65–70.
- [43] SUFFYS P, BEYAERT R, DE VALCK D, VANNHAESEBROECK B, VAN ROY F, FIERS W. Tumor necrosis factor mediated cytotoxicity is correlated with phospholipase  $A_2$  activity, but not with arachidonic acid release *per se*. *Europ J Biochem* 1991; **195**: 465–471.
- [44] VEGA M, CARRASCO I, CASTILLO T, TRONCOSO JL, VIDELA LA, DEVOTO L. Functional luteolysis in response to hydrogen peroxide in human luteal cells. *J Endocrinol* 1995; **147**: 177–182.
- [45] WILTBANK MC, NISWENDER GD. Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the *corpus luteum* in domestic ruminants. *Anim Reprod Sci* 1992; **28**: 103–109.
- [46] WILTBANK MC, SHIAO TF, BERGFELT DR, GINTHER OJ. Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  Receptors in the Early Bovine *Corpus Luteum*. *Biol Reprod* 1995; **52**: 74–78.
- [47] WUTTKE W, JARRY H, PITZEL L, KNOKE I, SPIEB S, THEILING K. Some new aspects about luteolysis in the porcine *corpus luteum*. *Reprod Dom Anim* 1995; **30**: 208–210.
- [48] YAN Z, HUNTER V, WEED J, HUTCHINSON S, LYLES R, TERRANOVA P. Tumor necrosis factor- $\alpha$  alters steroidogenesis and stimulates proliferation of human ovarian granulosa cells *in vitro*. *Fertility and Sterility* 1993; **59**: 332–338.

Redaktor prowadzący Jerzy Kawiak

Otrzymano: 09.07.1996 r.

Przyjęto: 21.08.1996 r.

Adres autora: ul Prawocheńskiego 5, 10-718 OLSZTYN 5.





## KOMUNIKATY

### Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej przyznaje doroczną nagrodę naukową, w tym również w roku 1996 i 1997, 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 "Postępach Biologii Komórki".
- \* **10.** Nagroda wręczana będzie w czasie jednej z konferencji naukowych z zakresu biologii komórki.

## KURS CYTOMETRII

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Cytometrii zawiadamia, że w okresie: 10–13 czerwca 1997 r. odbędzie się kurs cytometrii z udziałem wykładowców z zagranicy organizowany przez:

dr J. Dobruckiego w Instytucie Biologii Molekularnej UJ w Krakowie (31-120 Kraków, Al. A. Mickiewicza 3, tel. 34 13 05);

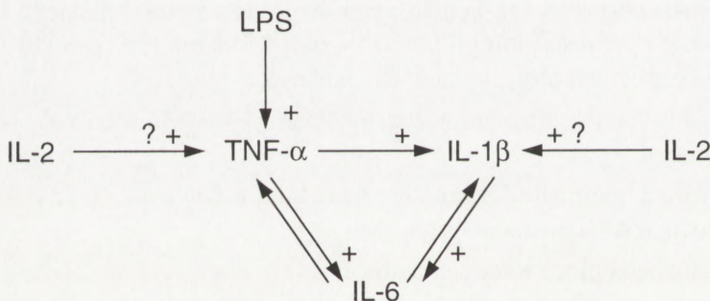
14–15 czerwca odbędzie się związana z kursem Konferencja na temat Cytometrii w Warszawie; informacj udziela dr J. Skierski pod adresem Instytut Leków, 00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34, tel. 41 29 89.

Zarząd Polskiego Towarzystwa Cytometrii

## ERRATA

Sprostowanie do artykułu pt. *Wpływ cytokin na hormonalną regulację procesów rozrodu* – autorstwa: B. Jany i A. Stępień opublikowanego w: *Postępy Biologii Komórki* 1996; 23(4): 513–528.

Rysunek 1 na str. 515 powinien przedstawiać się następująco:



Rys. 1. Kaskadowy sposób sekrecji cytokin:  
(+) wpływ stymulujący,  
(-) wpływ hamujący

Za popelnioną omyłkę Autorki i Szanownych Czytelników bardzo przepraszamy.

### Wskazówki przygotowania rysunków do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6.0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać również umieszczone osobno na dyskietce. Jeśli autor dostarcza rysunki na dyskietce, powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5.0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda i Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej.

## 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 przysyłać 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 i rysunków na dyskietce (wskazówki na s. 96) 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). Następna strona 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 niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 2 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 oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę, cennik na s. 4 okł.

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

tabela i rycin. **tak** **nie** wysłana do innej redakcji. **tak** **nie**

Wszystcy Autorzy znają i akceptują pracę. **tak** **nie** Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy

Jest zgoda osób, których informacje niepubli- pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak** **nie**

kwane są zamieszczone w tekście artykułu **tak** **nie** Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn. **tak** **nie**

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność reda- **tak** **nie**

kacji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. **tak** **nie** *podpis*

## TREŚĆ

W tym Zeszyście	1
CZARNECKA M., HAUS O.: Najczęstsze aberracje strukturalne chromosomów w ostrych białaczkach szpikowych de novo	3
NIKLAS A.: Zastosowanie protoplastów buraka cukrowego ( <i>Beta vulgaris</i> L.) w manipulacjach genetycznych	19
RUPNIEWSKA M., ROŻYMKOWA D., KUROWSKA M.: Rodzina genów <i>bcl-2</i>	33
BRYŚ M., KRAJEWSKA W. M.: Receptor androgenowy – struktura, funkcja oraz udział w nowotworzeniu gruczołu krokowego	49
SOBKOWIAK A., WIERZBICKI A., TRZECIAK H. W.: Budowa i funkcja receptora lutropiny (LH/hCG)	67
STĘPIEŃ A., JANA B.: Wpływ cytokin na funkcjonowanie ciała żółtego	83
Komunikaty	95
Errata i wskazówki przygotowania rysunków	96

## Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

*Prenumerata na rok 1997*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1997 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 na rok 1997:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 50 zł,

a dla odbiorców indywidualnych 16 zł.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 1997 r.

Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	40,00	60,00	80,00	100,00

Zamówienie na odbitki **musi** być złożone wraz z przesłaną korektą pracy.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1997 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 dollars USA.

Indeks 369705