

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

Postępy Biologii Komórki

TOM 24 1997

Suplement nr 9

Redaktor Szczepan Biliński

**ULTRASTRUKTURA I FUNKCJA
JĄDRA KOMÓRKOWEGO
WYBRANE ZAGADNIENIA**

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.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILINSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

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 Roslin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chatubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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: – Editorial Office Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 340 344, fax 340470.

Recenzenci 24 rocznika PBK 1997 – Referees of the volume No 24 1997:

prof. dr Ewa Bartnik, prof. dr Wiesława Biczysko, dr hab. Barbara Bilińska, prof. dr Szczepan Biliński, prof. dr Franciszek Dubert, dr hab. Halina Gabryś, prof. dr Edward Gwóźdź, prof. dr hab. Olga Haus, prof. dr Adam Jaworski, prof. dr Jerzy Kawiak, prof. dr Jerzy Klag, prof. dr Andrzej Klein, prof. dr Andrzej Łukaszyk, prof. dr Renata Maryniak, prof. dr Jan Michejda, prof. dr Olgierd Narkiewicz, prof. dr Maria Olszewska, prof. dr Zofia Osuchowska, prof. dr Andrzej Pawlak, prof. dr Barbara Płytycz, prof. dr Lesław Przywara, dr Jan Schmagier, dr biol. Mirosław Sopel, dr hab. Józefa Styryna, prof. dr Henryk Urbanek, prof. dr Jerzy Warchoń, prof. dr Maciej Zabel

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

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

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 9,5 Ark. druk. 6,5. Podpisano do druku w październiku 1997 r. Druk ukończono w listopadzie 1997 r.

WYBRANE METODY BADANIA STRUKTURY I FUNKCJI JĄDRA KOMÓRKOWEGO

SELECTED METHODS OF STUDYING THE CELL NUCLEUS STRUCTURE AND FUNCTION

STANISŁAW ORKISZ

Zakład Anatomii Prawidłowej Katedry Nauk Podstawowych WAM, Łódź

Streszczenie: W ostatnich dwudziestu latach osiągnięto istotny postęp w zrozumieniu molekularnej organizacji jądra komórkowego. W tym czasie wprowadzono szereg nowych metod uwidocznienia struktur jądrowych. W pracy przedstawiono wybrane techniki badania jądra: barwienie regresywne z EDTA, autoradiografię wysokorozdzielczą, technikę częściowej dekondensacji i zupełnego rozproszenia chromatyny dla uwidocznienia kompleksów transkrypcyjnych, technikę cAu-RNaza oraz metodę wykrywania białek argyrofilnych. Przedstawione metody zastosowane równolegle, dostarczają uzupełniających się informacji i umożliwiają badanie morfologii struktur rybonukleoproteidowych (RNP) w miejscu transkrypcji oraz w czasie przetwarzania i wewnątrzjądrowego transportu.

Słowa kluczowe: jądro, autoradiografia wysokorozdzielcza, barwienie regresywne, dekondensacja, kompleksy transkrypcyjne, argyrofilia, technika cAu-RNaza.

Summary: During the last twenty years much progress has been made in understanding the molecular organisation of the cell nucleus. A number of new methods of nuclear structures visualization have been developed for EM. In the review, the selected methods of the cell nucleus research are presented: regressive EDTA staining, high resolution autoradiography, mild loosening of the nuclear content, spreading allowing the visualization of transcriptional complexes, RNase-gold technique and argyrophilic proteins visualization. Presented methods used in parallel provide complementary information and make possible the study of morphology and composition of RNP structures at the site of transcription and during intranuclear processing and transport.

Key words: nucleus, high resolution autoradiography, regressive staining, spreading, transcriptional complexes, argyrophilia, gold method.

1. WSTĘP

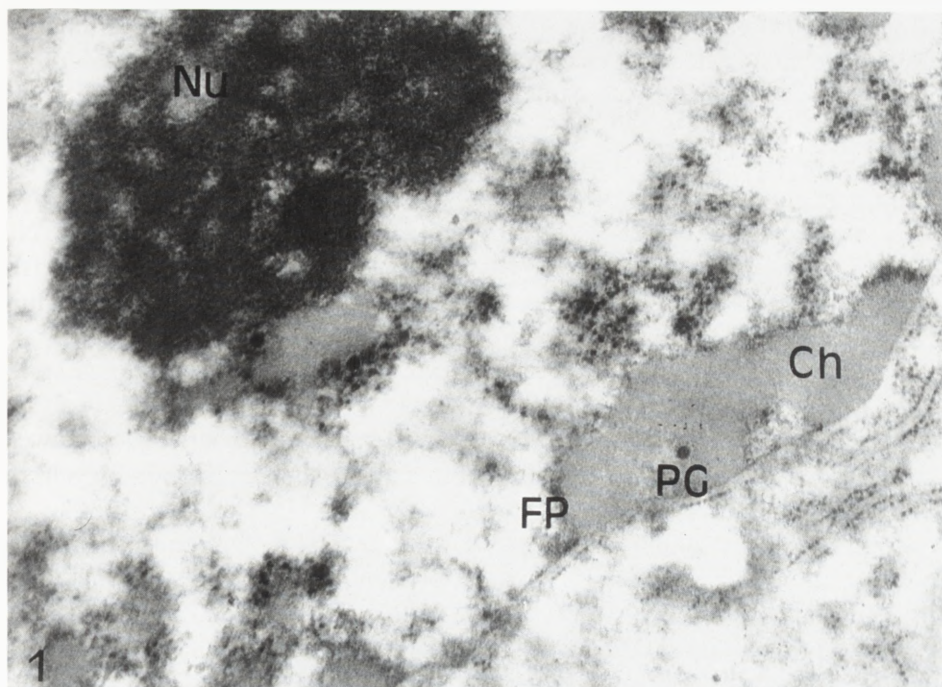
Od chwili uwidocznienia i opisania jądra komórkowego, zwanego początkowo cytoblastus, a od 1831 r. dzięki Robertowi Brownowi – *nucleus* [37], lawinowo

narasta ilość informacji dotyczących jego struktury i funkcji. Przez wiele lat mimo szybkiego rozwoju mikroskopii elektronowej, organizacja jądra znana była słabo ze względu na obecność dużych skupień chromatyny skondensowanej. Te ostatnie nie pozwalały na rozróżnienie żadnych struktur jądrowych z wyjątkiem otoczki i jąderka. Jeszcze w 1977 r. Berezney i Coffey wyróżniali jedynie cztery elementy struktury jądra: otoczkę, heterochromatynę, jąderko oraz przestrzeń między skupieniami heterochromatyny – interchromatynę [8]. Ostatnie lata przyniosły znaczny postęp w badaniach organizacji strukturalnej i czynnościowej jądra komórkowego. Badania biochemiczne przeprowadzone na wyizolowanych frakcjach, pozwoliły znacznie wcześniej określić charakter, masę i właściwości RNA zawartego w strukturach jądra [3, 21, 24]. Intensywny rozwój badań struktury jądra stał się możliwy z chwilą wprowadzenia szeregu nowych technik badawczych, a zwłaszcza:

- barwienia regresywnego (preferencyjnego) z EDTA [9],
- autoradiografii wysokorozdzielczej [4,13],
- metody częściowej dekondensacji struktury chromatyny [48],
- techniki zupełnego rozproszenia chromatyny umożliwiającej uwidocznienie kompleksów transkrypcyjnych [39],
- metody ultracytochemiczne z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych oraz złota koloidalnego jako znacznika [53,65],
- techniki hybrydyzacji *in situ* [1].

Wprowadzenie oraz rozwój tych technik umożliwił lokalizację w jądrze tak istotnych procesów, jak: replikacja, transkrypcja, proces dojrzewania różnych typów RNA oraz transport cząsteczek rybonukleoproteinowych (RNP) w przestrzeni interchromatynowej [19, 25]. Technikami immunocytochemicznymi oraz metodą hybrydyzacji uwidoczniono niskocząsteczkowe RNA (UsnRNA) zarówno w strukturach jąderka, jak również w pozajądrowych kompleksach rybonukleoproteinowych – spliceosomach [59, 64]. Ich rola w obróbce pierwotnych transkryptów pre-mRNA i pre-rRNA jest przedmiotem dyskusji do chwili obecnej [32, 64]. Rozwój technik badawczych pozwolił uwidocznić w przestrzeni interchromatynowej różnorodność struktur ziarnistych i włóknistych. W chwili obecnej w jądrze wyróżniamy następujące strefy (domeny) strukturalne, którym przypisywane są określone funkcje:

- 1) otoczka jądrowa,
- 2) chromatyna skondensowana,
- 3) jąderka,
- 4) strefa perichromatyny,
 - a) ziarna perichromatyny,
 - b) włókienka perichromatyny,
- 5) strefa interchromatyny,
 - a) ziarna interchromatyny,
 - b) włókienka interchromatyny,
- 6) ciała jądrowe.



Rys. 1. Fragment jądra komórki wątrobowej (zdjęcie z mikroskopu elektronowego, barwienie preferencyjne z EDTA): Nu – jąderko, PG – ziarnistości perichromatyny, FP – włókienka perichromatyny, Ch – chromatyna (pow. 21500 razy)

W niniejszym przeglądzie wybrano metody pozwalające na uwidocznienie domen strukturalnych jądra komórkowego. Liczni autorzy wyróżniają ponadto szereg domen czynnościowych, których funkcja i znaczenie biologiczne jest ciągle przedmiotem kontrowersji w literaturze [15, 32, 50, 58].

2. BARWIENIE PREFERENCYJNE Z EDTA

Technika barwienia z EDTA została opracowana przez Bernharda [9] i miała przełomowe znaczenie dla badania struktury jądra i różnicowania na jego obszarze struktur zawierających RNA i DNA. Metoda ta ma charakter barwienia regresywnego, jest niespecyficzna, ale wybiórcza. EDTA jako związek chelatujący odgrywa rolę czynnika różnicującego struktury jądrowe znane z zawartości rybo- i dezoksyrybonukleoproteidów (RNP i DNP). Metoda barwienia regresywnego jest szczególnie użyteczna w przypadku nagromadzenia dużych skupień chromatyny w jądrze, bowiem na tle wyraźnie przejaśnionej chromatyny dobrze uwidaczniają

się struktury zawierające RNP, np. ziarna perichromatyny, ziarna interchromatyny czy duże skupienia włókien perichromatynowych (FP).

Zasługą techniki z EDTA jest możliwość uwidocznienia intensywności transkrypcji pozająderekowej, której morfologicznym wykładnikiem są FP (rys. 1), widoczne na preparatach w postaci wyraźnej strefy zagęszczeń na obrzeżach przejaśnionej chromatyny skondensowanej [21, 25, 42]. Technika ta nie tylko uwidacznia, ale i różnicuje ziarnistości interchromatynowe od ziaren chromatyny. Natomiast w odniesieniu do jąderka, barwienie regresywne pozwala na lepsze uwidocznienie jego składników rybonukleoproteinowych, po przejaśnieniu chromatyny wewnątrzjąderekowej.

Mechanizm reakcji z EDTA nie jest do końca wyjaśniony. Przypuszcza się że barwienie przebiega kilkuetapowo [9]:

- W pierwszym etapie jony uranylu penetrują szybko, przebarwiając skrawek. Lokują się one w szczególnie dużym stężeniu w strukturach komórkowych zawierających RNP i DNP.

- W drugim etapie następuje kompleksowanie z EDTA. Działanie chelatujące tego związku, współzawodniczy z siłami, które umożliwiają pozostanie barwnika w strukturach RNP.

- Struktury zawierające DNP łatwiej uwalniają jony uranylu niż RNP; tworzące się rozpuszczalne chelaty są szybko usuwane ze skrawków.

- Dokontrastowanie cytrynianem ołowiu uwidacznia poła wybarwione uranylem, nie zmieniając ich lokalizacji.

2.1. Przygotowanie roztworu EDTA

- * Do 100 ml naczynia zawierającego 50 ml wody destylowanej dodać 7,44 g EDTA, stale mieszając,
- * do wodnego roztworu EDTA dodawać bardzo powoli 1 N NaOH (do chwili, gdy roztwór stanie się przezroczysty),
- * po zmierzeniu pH, powoli doprowadzić je przy pomocy 0,1 N NaOH do wartości 7,0,
- * uzupełnić zawartość naczynia wodą destylowaną do 100 ml.

Roztwór należy przechowywać w temperaturze 4°C i używać po czterech dniach przechowywania; trwałość roztworu wynosi kilka miesięcy. Przed barwieniem, roztwór EDTA należy doprowadzić do temperatury pokojowej.

2.2. Procedura

- * Skrawki należy kontrastować 5% roztworem wodnym octanu uranylu (2 min),

- * płukać wodą podwójnie destylowaną,
- * zanurzyć w roztworze EDTA (20–30 min),
- * płukać wodą podwójnie destylowaną,
- * wysuszyć w temperaturze 37°C (10–15 min),
- * kontrastować cytrynianem ołowiu (12 min),
- * płukać wodą podwójnie destylowaną,
- * wysuszyć w temperaturze 37°C (10–15 min).

Powyższa procedura dotyczy skrawków grubości 80–100 nm, skrojonych z blozków eponowych. Jej modyfikacje związane są z rodzajem badanego materiału, zastosowanym utrwalaniem i grubością skrawków.

3. AUTORADIOGRAFIA WYSOKOROZDZIELCZA (MIKROAUTORADIOGRAFIA – ARW)

Autoradiografia jest techniką pozwalającą na wykrywanie i lokalizację izotopów promieniotwórczych w materiale biologicznym. Promieniowanie jonizujące emitowane przez izotop powoduje redukcję bromku srebra (AgBr) zawartego w emulsji fotograficznej pokrywającej materiał biologiczny. Powstały w wyniku działania radioizotopu obraz utajony, po przeprowadzeniu procedury fotograficznej zostaje ujawniony w postaci ziaren metalicznego srebra [36, 57]. Z lokalizacji oraz dynamiki przemieszczania wprowadzonych do materiału biologicznego promieniotwórczych związków chemicznych można wnosić o ich metabolizmie w tkankach, w warunkach zarówno prawidłowych jak i patologicznych. Modyfikacja techniki autoradiografii do badań w ME nosi nazwę autoradiografii wysokorozdzielczej (ARW) [4, 12, 47]. ARW jest jedną z lepszych technik pozwalających zlokalizować RNA przy zastosowaniu ³H-urydyny bądź DNA po wprowadzeniu do badanych komórek ³H-tymidyny [12, 19, 24, 47]. Ograniczenie metody w badaniach ultrastrukturalnych wiąże się z jej długotrwałością (czas ekspozycji nawet od 3 do 4 miesięcy) oraz dużą pracochłonnością. Innym ograniczeniem jest wielkość ziaren srebra, która nawet w najlepszych autoradiogramach przekracza 40–50 nm. Ponadto ARW zastosowana z powodzeniem w przypadku komórek izolowanych lub hodowli stwarza duże kłopoty w badaniach *in vivo* i następowej ocenie na poziomie molekularnym [41]. Wiele czynników ma wpływ na jakość autoradiogramu. Jego czytelność i wysoka jakość zależy od rodzaju materiału biologicznego (izolowane komórki, skrawki, rozmaz), ale najbardziej istotnymi czynnikami są: rodzaj emulsji fotograficznej oraz zastosowany izotop.

3.1. Emulsja fotograficzna

Emulsja jest najistotniejszym czynnikiem ograniczającym zdolność rozdzielczą ARW. Składa się ona z kryształów AgBr zawieszonych w żelatynie. Stosunek wagowy tych składników jest różny; w emulsjach wykorzystywanych w autoradiografii wysokorozdzielczej struktur jądra komórkowego stosunek ten wynosi najczęściej 1:4 na korzyść AgBr [36, 57]. W technice ARW najczęściej stosowane są emulsje Kodak NTE oraz Ilford L4. Charakterystykę emulsji firmy Kodak przedstawiono w tabeli 1. Średnica kryształów emulsji Ilford L4, której używa się powszechnie w badaniach metabolizmu jądra komórkowego, wynosi 50–150 nm [13]. Emulsja ta oryginalnie zapakowana ma stałą konsystencję i przed użyciem powinna być upłynniona. W tym celu buteleczkę z emulsją umieszcza się w ciemni w łaźni wodnej o temperaturze 43–45°C. Proces upłynniania emulsji trwa od 45 do 60 min. W tym czasie emulsję należy delikatnie mieszać szklaną bagietką unikając gwałtownych ruchów. Takie postępowanie zapobiega powstaniu trudnych do usunięcia pęcherzyków na powierzchni emulsji. Jeżeli nie udało się tego uniknąć, próbujemy pęcherzyki usunąć przez delikatne zanurzenie w emulsji szkiełka podstawowego. Grubość emulsji, w zależności od stosowanej metody i potrzeb, możemy dowolnie regulować nie przekraczając rozcieńczenia 1:10.

3.2. Izotopy stosowane w ARW

W autoradiografii ma zastosowanie wywołujące intensywne jonizację promieniowanie β lub w mniejszym stopniu promieniowanie α . Szczególnie przydatne w ARW są izotopy emitujące cząstki β o małej energii, charakteryzujące się stosunkowo długim okresem połowicznego rozpadu [36]. Wartość izotopów stosowanych w autoradiografii określają dwa parametry: energia maksymalna cząsteczek β (E_{max}) oraz ich maksymalna droga w emulsji (P_{max}). Porównanie tych wartości dla najczęściej stosowanych radioizotopów zamieszczono w tabeli 2 [wg 36].

TABELA 1. Charakterystyka emulsji firmy Kodak

Typ	Średnica ziaren [μm]	Zastosowanie i właściwości
NTB 3	0,34	najwyższa wrażliwość, rejestruje wszystkie rozładowane cząsteczki
NTB 2	0,26	rejestruje ślad elektronu przy energii poniżej 0,2 MeV
NTB	0,29	rejestruje ślad przy energii poniżej 30 MeV
NTE	0,06	do ARW

3.3. Zdolność rozdzielcza i wydajność autoradiogramu

Zdolność rozdzielcza autoradiogramu jest prawie stukrotnie gorsza niż mikroskopu elektronowego. Wynika to z:

– istoty procesu fotograficznego wykrywającego promieniowanie,

– rozproszenia promieniowania na drodze od jego źródła do miejsca powstawania

obrazu utajonego; rozproszenie zależy od grubości skrawka oraz średnicy kryształów AgBr w emulsji.

Praktycznie, im mniejsza jest średnica kryształów AgBr i im mniejsza energia promieniowania, tym lepsza jest zdolność rozdzielcza autoradiogramu. Średnica kryształów AgBr w najczęściej stosowanej emulsji Ilforda L4 wynosi od 50 do 150 nm i jest dość duża w stosunku do rozmiarów większości struktur jądra komórkowego. Na rozdzielczość wpływa również gęstość upakowania kryształów tworzących jedną warstwę w emulsji, jak też sposób wywoływania (patrz niżej).

Wydajność autoradiogramu związana jest z liczbą ziaren powstających w emulsji pod wpływem rozpadu jądra atomowego w źródle promieniowania. Zależy ona od następujących czynników [57]:

- * rodzaju izotopu,
- * grubości skrawka,
- * emulsji (jeżeli grubość emulsji jest mniejsza od zasięgu cząstek, to wydajność autoradiogramu jest również odpowiednio mniejsza),
- * czasu ekspozycji,
- * procedury fotograficznej.

3.4. Procedura fotograficzna

3.4.1. Wywoływanie

Opiera się na chemicznej redukcji AgBr w środowisku zasadowym, w wyniku której powstają ziarna metalicznego srebra. Katalizatorem reakcji wywoływania jest metaliczne srebro. Badając wielkość ziaren srebra po zastosowaniu wywoływacza Kodak D 19b, wykazano zwiększanie ich rozmiarów podczas procesu wywoływania. W rezultacie całkowicie wywołane ziarna są od 3 do 4 razy większe niż kryształy utajone. Znacznie mniejsze ziarna uzyskuje się stosując wywoływacz phenidonowy [13]. Bardzo dobre efekty (niewielkie ziarna srebra, dużą wydajność i powtarzalność) zapewnia technika LIGOP (ang. *Loop-Interference-Gold-Latensification-Phenidon*)

TABELA 2. Izotopy najczęściej stosowane w autoradiografii [wg 36]

Izotop	E_{\max} [keV]	P_{\max} [μm]
^3H	18,6	3
^{14}C	156	96
^{45}Ca	260	220
^{131}J	608	775
^{32}P	1710	2800

opisana przez Bouteille i z powodzeniem wykorzystywana w badaniach RNP jądrowych [12, 17, 47], (patrz rozdział 3.6).

3.4.2. Utrwalanie

Utrwalanie odbywa się w obecności tiosiarczanu sodu i polega na tworzeniu kompleksów między kationami srebra kryształów AgBr oraz anionami z utrwalacza [4, 57].

3.5. Ocena autoradiogramu

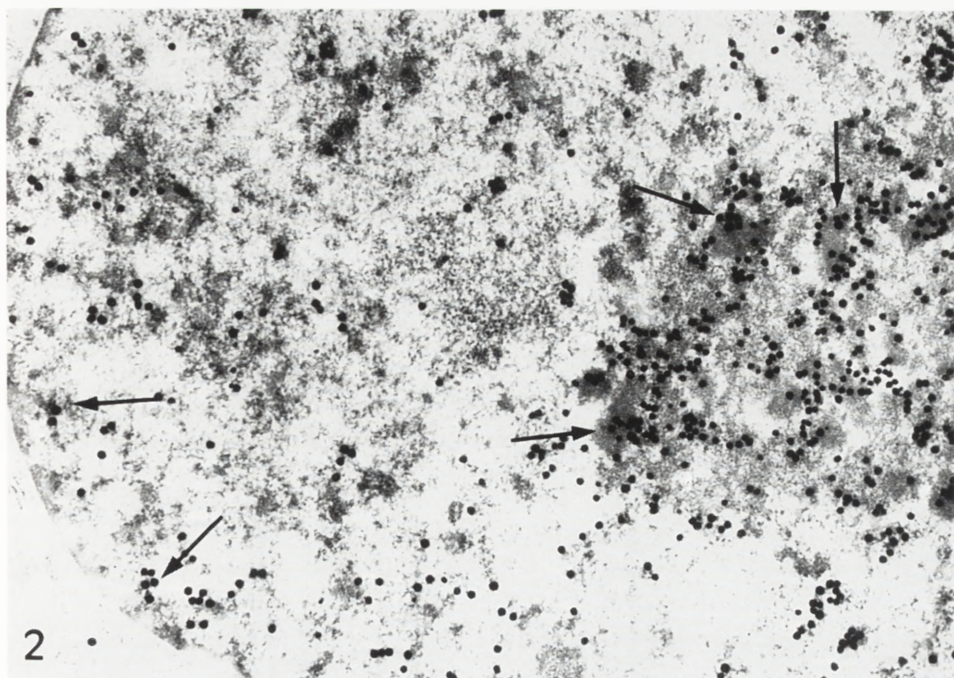
Wśród podstawowych parametrów oceny autoradiogramów najważniejszymi są: rozdzielczość, wydajność, wielkość i kształt ziaren, gęstość tła oraz czułość i specyficzność znakowania. Bardzo istotnym elementem interpretacji jest porównanie liczby ziaren srebra nad badanymi strukturami oraz poza nimi (określenie gęstości tła). Gęstość tła opisywana jest liczbą ziaren srebra na jednostkę powierzchni. W prawidłowo wykonanym autoradiogramie liczba ta nie powinna być większa niż $0,5 \text{ ziarna}/100 \mu\text{m}^2$ [22], a wg niektórych autorów nawet $0,1/100 \mu\text{m}^2$ [57].

W skrawkach parafinowych lub mrożonych niespecyficzna aktywacja ziaren srebra zachodzić może wzdłuż ostrza noża (w czasie skrawania) lub brzegów tkanek. W ARW „efekt ostrza” (ang. *edge artefact*), występuje na brzegu medium zatapiającego. Źródłem artefaktów w ARW jest także zjawisko chemoautografii, zarówno pozytywnej, jak i negatywnej [22]. Chemiczną aktywację kryształów utajonych (chemoautografię pozytywną) mogą wywoływać różne występujące w żywej tkance substancje redukujące lub barwniki. Zanikanie obrazów utajonych może z kolei zachodzić nad tkankami utrwalonymi roztworami zawierającymi OsO_4 , Hg^{++} , MnO_4^- , które przemieszczają się do emulsji w czasie ekspozycji [22]. Oceny tła ARW należy dokonywać nad strukturami nie wyznakowanymi izotopem, odnosząc je do struktur, które powinny specyficznie wbudować prekursor (rys. 2).

3.6. Procedura ARW w badaniach RNP jądrowych (zmodyfikowana wg [12 i 48])

3.6.1. Przygotowanie skrawków

- * Skrawki (grubość 0,7–0,8 μm , kolor złoty) trzeba zebrać na siatki do ME i kontrastować rutynowo,
- * siatki umieścić na wspornikach o średnicy 2,5 mm; średnica wsporników powinna być mniejsza niż średnica siatek dla łatwiejszego ich zdejmowania w ciemności (rys. 3a).

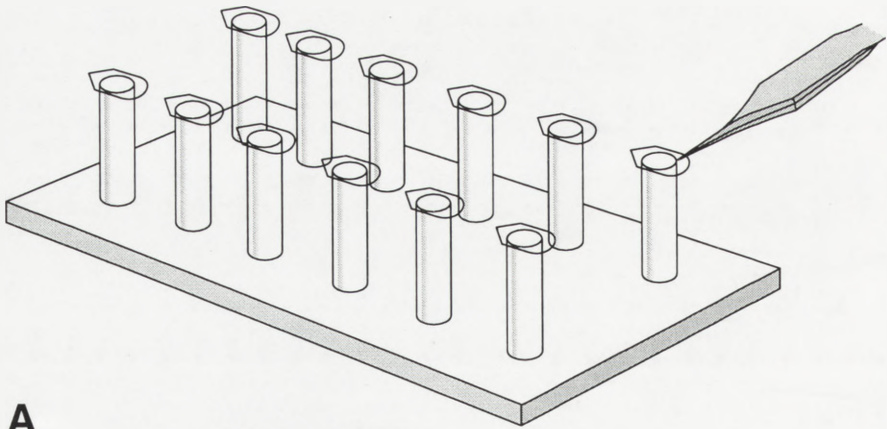
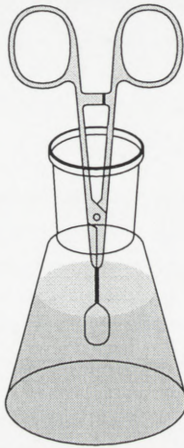
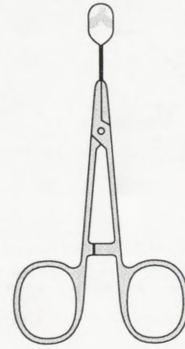
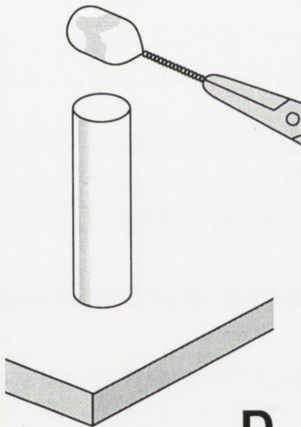
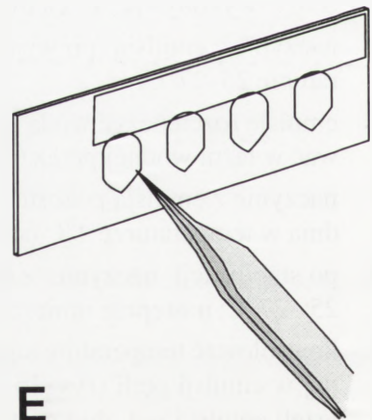


Rys. 2. Izolowane hepatocyty wyznakowane 5 min pulsem ^3H urydyny, inkorporacje trytowanej urydyny w obrębie DFC oraz na obrzeżach chromatyny (strzałki), pow. 25000 razy

3.6.2. Przygotowanie emulsji

W pomieszczeniu, w którym przygotowuje się emulsję, należy zapewnić temperaturę 25–27°C oraz wilgotność ok. 50%. Wszystkie czynności opisane w pkt 3.6.2. i 3.6.3. wykonywać w ciemności (światło czerwone):

- * naczynie z emulsją (po wyjęciu z lodówki) pozostawić na 30 min w temperaturze 25–27°C,
- * emulsję rozcieńczyć wodą podwójnie destylowaną w stosunku 1 : 4 i ogrzewać w łaźni wodnej przez 60 min mieszając bagietką szklaną co 15 min,
- * naczynie z emulsją pozostawić w światłoszczelnym pudełku do następnego dnia w temperaturze 4°C (stabilizacja emulsji),
- * po stabilizacji naczynie z emulsją pozostawić na 30 min w temperaturze 25–27°C; następnie umieścić w łaźni wodnej,
- * kontrolować temperaturę kąpeli tak, aby po pionowym ustawieniu zanurzonej w emulsji pętli (rys. 3b) tworzyła ona w jej oczku monolayer; *Uwaga:* jeżeli emulsja jest zbyt gęsta (ścieka z pionowo ustawionej pętli – rys. 3c), należy ją podgrzać w kąpeli wodnej,
- * jeżeli emulsja w obrębie pętli pęka, należy ją schłodzić.

**A****B****C****D****E**

Rys. 3. Schemat czynności w czasie pokrywania skrawków emulsją: A – wsporniki z umieszczonymi na nich siateczkami. B – zanurzanie pętli w emulsji, C – sprawdzanie właściwej grubości emulsji, D – pokrywanie siatek emulsją, E – umieszczanie siatek pokrytych emulsją na szkiełku podstawowym

3.6.3. Pokrywanie siatek emulsją (rys. 3d)

- * Zanurzyć pętlę w emulsji, ustawić pionowo do momentu, gdy spłynie jej nadmiar i w górnej części pętli utworzy się cienka warstwa.
- * Pokryć emulsją umieszczone na wspornikach siateczki (por. pkt 1).
- * Zalecane jest delikatne chuchnięcie na siatkę w celu lepszego przyklejenia emulsji i jej osuszenia. Pokryte emulsją siatki przymocować do szkiełka podstawowego przy pomocy taśmy klejącej (rys. 3e).
- * Szkiełka podstawowe z przymocowanymi do nich i oznakowanymi siatkami przechowywać w światłoszczelnym pudełku wypełnionym żelalem silikonowym.

3.6.4. Ekspozycja od 6 tygodni do 6 miesięcy w temperaturze 4°C

3.6.5. Przygotowanie roztworów

3.6.5.1. wywoływacz phenidonowy

* Skład:

kwask askorbinowy	12 g
phenidon	2 g
bromek potasu	4,8 g
węglan sodu	5,2 g
siarczan sodu kryst.	80 g
rodanek potasu	48 g
woda destylowana	do 800 ml

- * do cylindra o poj. 1 l wlać 0,6 l wody podwójnie destylowanej i rozpuścić wymienione składniki wywoływacza w podanej kolejności,
- * dla uzyskania końcowej objętości roztworu uzupełnić cylinder wodą do 800 ml;

Uwaga: unikać podgrzewania roztworu.

3.6.5.2. Utrwalacz

* Skład:

woda podwójnie destylowana	700 ml
tiosiarczan sodu	210 mg,

- * roztwór przefiltrować (30 min po rozpuszczeniu) i rozdzielić do 2 naczyń.

3.6.5.3. Kąpiel złotowa (ang. *gold latensification bath*)

* Skład:

kwask chlorozłoty 2%	2 ml
woda podwójnie destylowana	200 ml,

- * doprowadzić pH do 7,0 dodając 1 M, a następnie 0,1 M NaOH,

- * w momencie uzyskania żądanej wartości pH dodać 500 mg tiosiarczanu, a następnie 600 mg bromku potasu.

3.6.6. Procedura fotograficzna

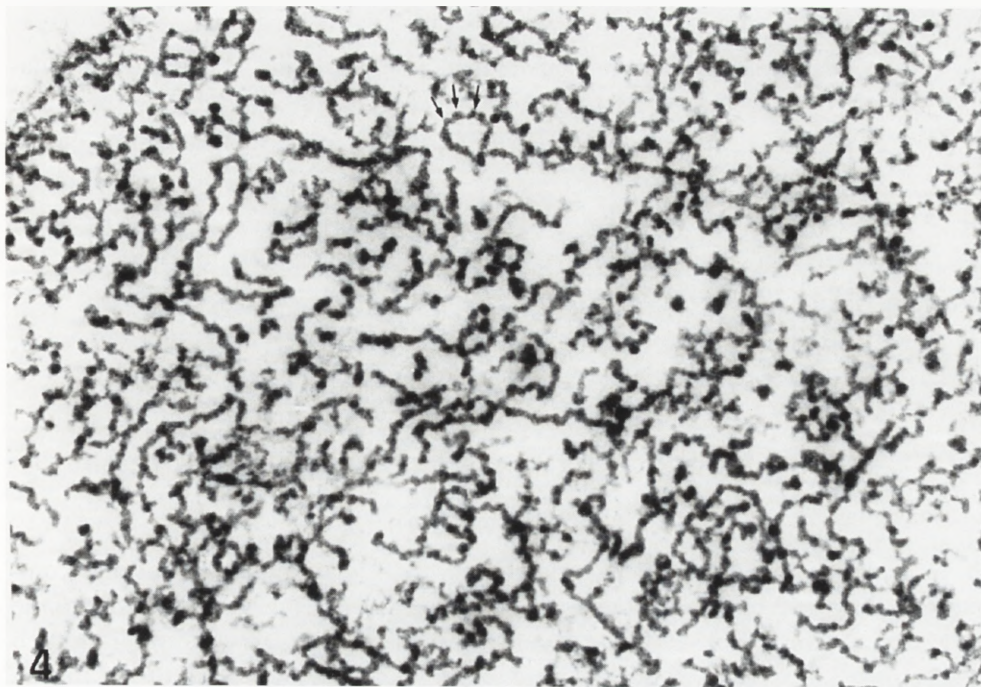
- * naczynia do wywoływania (6 sztuk) bardzo dokładnie umyć (detergent, woda bieżąca i woda destylowana); umieścić w łaźni wodnej i wypełnić przygotowanymi roztworami,
- * temperaturę roztworów utrzymywać w granicach 17–18°C,
- * materiał umieścić w kolejnych roztworach:

kąpiel złotowa	(5 min),
woda podwójnie destylowana	(20–30 s),
wywoływacz phenidonowy	(1 min),
utrwalacz I	(zanurzyć),
utrwalacz I	(6 min),
woda podwójnie destylowana	(opłukać 3 razy),
- * po wykonaniu wymienionych czynności można włączyć światło,
- * wypłukać preparaty w łagodnym strumieniu wody bieżącej, a następnie krótko w wodzie destylowanej,
- * wysuszyć w cieplarni w 37°C.

4. METODA CZĘŚCIOWEJ DEKONDENSACJI STRUKTURY CHROMATYNY

Jest to technika pozwalająca ocenić aktywność transkrypcyjną po częściowym rozluźnieniu chromatyny. Procedura została opracowana przez Puvion-Dutilleul i Puvion [48]; stanowi ona pomost pomiędzy klasycznymi metodami mikroskopii elektronowej, a zaproponowaną przez Millera i Beatty metodą całkowitego rozpraszania chromatyny (patrz rozdział 5). W procedurze częściowej dekonkondensacji, zmiany strukturalne w molekularnym upakowaniu chromatyny wywołuje preparat o nazwie Photo-flo, stosowany jako związek nawilżający w fotografii, wspomagany działaniem medium o niskiej sile jonowej i wysokim pH.

W wyniku działania Foto-flo systemy błonowe komórki ulegają dezintegracji, a cytoplazma redukcji do widocznych niekiedy fragmentów cytoszkieletu. W jądrze, po zniszczeniu otoczki jądrowej, widoczne są włókna chromatynowe o średnicy 20–25 nm biegnące promieniście w kierunku obwodu jądra oraz struktury rybonukleoproteinowe (rys. 4). Metoda częściowej dekonkondensacji umożliwia uwidocznienie kontaktu ziaren perichromatynowych z włóknami chromatyny. Liczne „garbki” widoczne na włóknach chromatyny, odpowiadają nukleosomom (rys. 4; strzałki). Zaletą



Rys. 4. Jądro komórki wątrobowej po częściowej dekondensacji: na przebiegu włókien chromatynowych widoczne „garbki” (strzałki) odpowiadające nukleosomom (pow. 64000 razy)

tej metody jest możliwość oceny relacji pomiędzy RNP i chromatyną w czasie transkrypcji oraz transportu i dojrzewania RNA.

4.1. Roztwory stosowane w metodzie częściowej dekondensacji chromatyny

4.1.1. Photo-flo: 0,4% roztwór w wodzie destylowanej (pH 8,5–9,0)

4.1.2. For-flo: 1% formaldehyd przygotowany z paraformaldehydu + 0,4% roztwór Photo-flo w stosunku 250 : 1 z dodatkiem 1,7 g sacharozy na 50 ml roztworu (pH 8,7–9,0).

4.1.3. H₂O destylowana (pH 9,0)

Uwaga: pH obu roztworów i wody destylowanej doprowadzić do żądanej wartości przy pomocy buforu boranowego.

4.2. Procedura

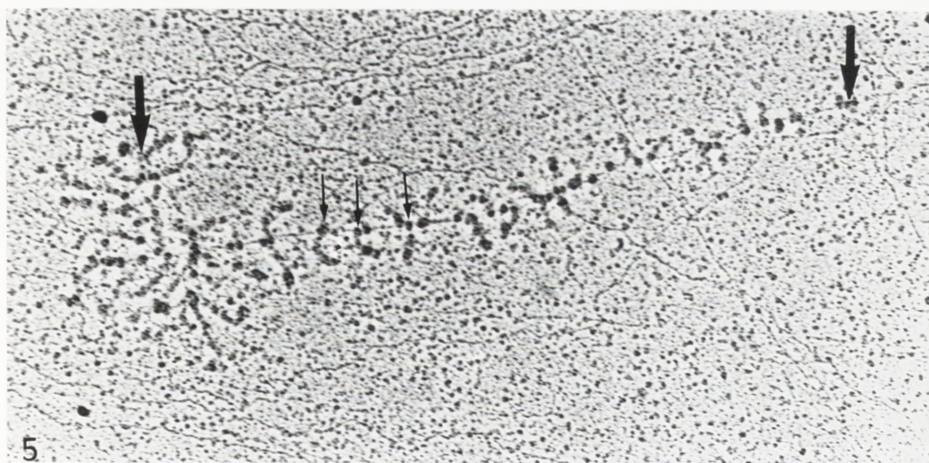
- * do naczyń zawierających hodowlę komórek, po usunięciu medium hodowlanego, wlać 4–5 ml roztworu Photo-flo (10 min),
- * komórki tworzące cienką warstwę zdrapać ze ścianki naczynia i przenieść do probówki wirówkowej,
- * wirować z szybkością 5500 obr./min (15 min),
- * usunąć supernatant i osad komórek zalać For-flo (45–60 min),
- * płukać w roztworze wody destylowanej o pH 9,0 (30 min),
- * próbki odwodnić we wzrastającym szeregu alkoholowym i zatopić w żywicy,
- * kontrastować w sposób rutynowy.

5. TECHNIKA CAŁKOWITEGO ROZPRASZANIA CHROMATYNY

Technika całkowitego rozpraszania chromatyny, pozwalająca uwidocznić kompleksy transkrypcyjne została opracowana przez Millera i Beatty [39]. Szczególnie korzystnym obiektem do badań tą metodą są wielkie jądra komórkowe, z których stosunkowo łatwo przez zastosowanie szoku hypotonicznego wyizolować można duże i liczne jąderka. Z tego względu kompleksy transkrypcyjne najczęściej uwiadczniane były w materiale pochodzącym z komórek owadów [38], glonów (*Ace-tabularia*) lub z oocytów płazów [26, 39]. Na przykład jądra oocytów *Xenopus laevis* osiągają średnicę do 1200 μm i zawierają 2×10^6 jednostek transkrypcyjnych, podczas gdy jądra ssaków, np. hepatocytów o średnicy zaledwie ok. 8 μm zawierają tylko 480–1100 takich jednostek [49]. Stosowane obecnie metody całkowitego rozpraszania chromatyny są modyfikacjami oryginalnej techniki Millera i Beatty, dla rozmaitych narządów i tkanek [24, 49]. Stosunkowo najłatwiej uzyskać można obrazy rozproszonej chromatyny z komórek izolowanych i hodowanych *in vitro* (tę modyfikację metody opisano szczegółowo w części 5.2). W takim przypadku szok hypotoniczny oraz działanie detergentów powodują szybką dezintegrację błon cytoplazmatycznych i otoczki jądrowej oraz oddzielenie białek od DNA we włóknach nukleohistonowych. Z wielu stosowanych detergentów, najlepsze wyniki osiąga się po zastosowaniu preparatu o nazwie Joy zawierającego zarówno jonowe, jak i niejonowe detergenty. W mikroskopie elektronowym rozproszona chromatyna ma wygląd licznych, krzyżujących się włókien DNP. Na włóknach tych można zauważyć regularnie rozmieszczone koralikowate struktury – nukleosomy.

Wśród sieci włókien nieaktywnych dość rzadko spotykane są kompleksy transkrypcyjne. Wyróżnia się dwa odmienne morfologicznie typy tych kompleksów:

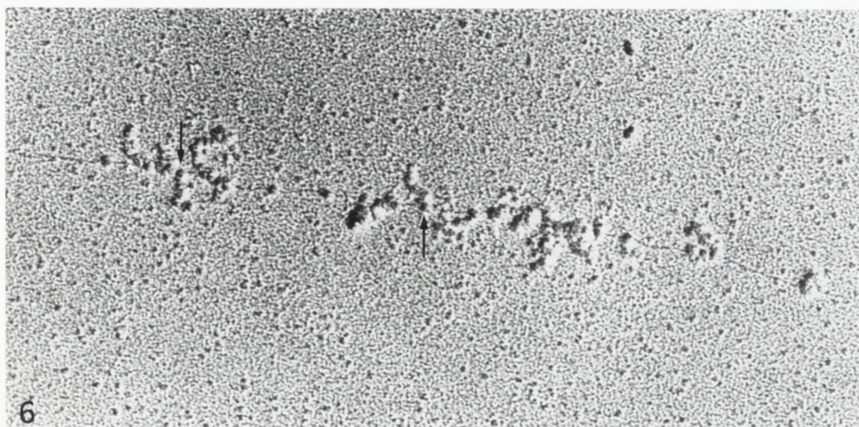
(1) Reprezentujące geny jąderkowe, o wyglądzie klasycznych „choinek” (ang. *Christmas tree*) (rys. 5). W tym typie kompleksów jednostki transkrypcyjne często



Rys. 5. Kompleks transkrypcyjny jąderkowy uwidoczniony po zupełnym rozproszeniu chromatyny hepatocytu: duże strzałki wskazują miejsca inicjacji i terminacji transkrypcji, krótkie – cząsteczki polimerazy I RNA u podstawy transkryptu (pow. 68000 razy)

ułożone są tandemowo i przedzielone segmentami nieprzepisywanymi. Oś kompleksu stanowi włókno DNA, pokryte gęsto transkryptami, których gęstość rozmieszczenia wzdłuż DNA odzwierciedla dynamikę ekspresji genu; u podstawy każdego transkryptu widoczna jest cząsteczka Polimerazy I RNA. Na nici DNA wyraźnie widoczny jest punkt inicjacji i terminacji transkrypcji (rys. 5; strzałki). Wolne końce każdego transkryptu tworzą granule końcowe (ang. *terminal knobs*), reprezentujące najprawdopodobniej zwinięty transkrypt.

(2) Reprezentujące geny pozająderekowe (tzw. pozająderekowe kompleksy transkrypcyjne) o zupełnie odmiennej morfologii (rys. 6). W tym typie kompleksów



Rys. 6 Kompleks transkrypcyjny pozająderekowy po zupełnym rozproszeniu chromatyny: strzałki wskazują cząsteczki polimerazy II RNA (pow. 62000 razy)

transkrypty rozmieszczone są na włóknie DNA nieregularnie, a ich grubość waha się od 3 do 25 nm i odpowiada zmiennej grubości FP; długość transkryptów nie rośnie wraz z odległością od punktu inicjacji, który często jest trudny do wykrycia (tym samym trudny jest do określenia kierunku transkrypcji). U podstawy każdego transkryptu widoczna jest cząsteczka polimerazy II RNA, niekiedy na ich wolnych końcach widoczne są granule końcowe (odpowiadające wielkością ziarnom perichromatynowym).

5.1. Roztwory stosowane w technice zupełnego rozproszenia chromatyny jąder komórek izolowanych

5.1.1. Detergent Joy: 0,5% roztwór w wodzie podwójnie destylowanej. (pH 8,7 –9,0).

5.1.2. 1% formaldehyd świeżo przygotowany z paraformaldehydu w roztworze sacharozy o stężeniu 0,1 M, (pH 9,0).

5.1.3. Woda podwójnie destylowana (pH 9,0).

5.1.4. Photo-flo: 0,4% roztwór w buforze boranowym (pH 7,4);

Uwaga: roztwory 1, 2, 3 przygotować przed każdym doświadczeniem i filtrować przy użyciu 0,2 m filtru miliporowego; pH roztworów 1, 2 i 3 doprowadzić do żądanej wartości przy pomocy buforu boranowego.

5.2. Procedura rozproszenia chromatyny dla uwidocznienia kompleksów transkrypcyjnych wg Millera i Beatty [39] w modyfikacji Puvion-Dutilleul i wsp. [49].

Przed rozpoczęciem rozpraszania, przygotować siateczki do ME pokrywając je grubą błoną węglową oraz płytki z pleksiglasu z otworami o średnicy nieco większej od średnicy siatek (rys. 7).

Uwaga: średnica płytek musi być dostosowana do rozmiarów naczyń wirówkowych (por. pkt. D).

A. Do rozpraszania można wykorzystać płytkę do oznaczania grup krwi z odpowiednio oznakowanymi zagłębieniami.

W kolejnych zagłębieniach płytki umieścić:

0,025 ml wody podwójnie destylowanej,

0,025 ml wody podwójnie destylowanej,

0,6 ml wody podwójnie destylowanej.

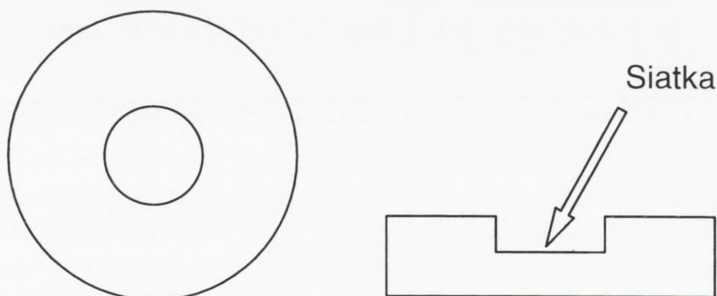
Do zagłębień a i b dodać 0,5% roztwór detergentu Joy w ilości:

0,125 ml,

0,175 ml.

B. Z naczynia Falcona usunąć medium hodowlane

* przepłukać hodowlę wodą podwójnie destylowaną,



Rys. 7. Schemat płytki umieszczonej w probówce wirówkowej: na dnie dołka umieszczona jest siateczka, a zagłębienie wypełnione jest zawiesiną komórek

- * dodać 0,2 ml 0,5% roztworu detergentu Joy,
 - * delikatnie manewrując naczyniem, rozprowadzić roztwór po hodowli,
 - * przy pomocy plastikowych płytek usunąć komórki ze ścianki naczynia,
 - * wymieszać zawiesinę komórek w roztworze detergentu przy użyciu pipety.
- D. Dwie krople zawiesiny komórek (pobrane pipetą Pasteura) umieścić w dołku a i delikatnie wymieszać
- * po upływie 2,5 min materiał z dołka a przenieść do dołka b i pozostawić na 5 min,
 - * z dołka c przenieść pipetą wodę destylowaną do dołka b na 5 min, w tym czasie dwukrotnie wymieszać jego zawartość; *Uwaga:* czas traktowania detergentem i wodą destylowaną powinien wynosić dokładnie 10 min.
 - * po tym czasie dodać do dołka b 2 krople roztworu For-flo (aby zatrzymać działanie detergentu i utrwalić materiał);
- E. Umieścić siatki w otworach płytki z plexiglasu
- * do otworu z siatką wpuścić dwie krople roztworu For-flo,
 - * wypełnić otwory zawiesiną komórek.
- F. Wirować zawiesinę w 2800 g (15 min w temperaturze 12°C)
- * po wirowaniu, otwór w płytce wypełnić roztworem For-flo, do uzyskania menisku wypukłego,
 - * odwrócić płytkę otworem do dołu, po czym z powierzchni kropli zdjąć delikatnie siateczkę.
- G. Płukać siatkę w roztworze Photo-flo.
- H. Suszyć siatki w temperaturze pokojowej (ok. 10 min).
- I. Pokryć siatki platyną w napyłarce (kąt 6–10).

6. METODY ULTRACYTOCHEMICZNE

6.1. TECHNIKA RNA-aza – ZŁOTO KOLOIDALNE (cAu-RNaza)

U podstaw ultracytochemicznego wykrywania RNA tą techniką, leży reakcja enzym-substrat, gwarantująca wysoką specyficzność reakcji [6]. Metoda umożliwia uwidocznienie produktów genów kodujących rRNA (rDNA) i genów pozająderekowych jedynie na powierzchni skrawka. Wśród najważniejszych zalet złota koloidalnego decydujących o jego szerokim zastosowaniu w cytochemii należy wymienić:

- * brak toksyczności, łatwość w użyciu [16, 65],
- * możliwość przygotowania szerokiego zakresu wielkości cząsteczek od 1 do 150 nm [16, 63],
- * zdolność do tworzenia stabilnych i aktywnych kompleksów z szeroką gamą związków biologicznych [7, 28, 29, 63],
- * niezmieniona aktywność biologiczna zaadsorbowanego białka [29, 63],
- * wysoka gęstość elektronowa cząsteczek złota [28, 63],
- * możliwość uzyskania monodispersji złota oraz jednakowej wielkości i kształtu cząsteczek [63, 65].

Ocenę ilościową znakowania kompleksem cAu-RNaza przeprowadza się wyliczając tzw. gęstość znakowania, tj. liczbę cząsteczek złota zlokalizowanych na $1 \mu\text{m}^2$ badanego składnika np. części włóknistej (DFC) czy granularnej (GC) jąderka [28, 43].

Procedura ta polega na trzech kolejnych reakcjach [63]:

1) redukcja HAuCl_4 związkami o charakterze reduktorów; rodzaj użytego reduktora oraz jego ilość mają decydujący wpływ na wielkość otrzymanych cząsteczek złota (np. sól sodowa kwasu askorbinowego: 10–15 nm, cytrynian sodu: 15–150 nm),

2) adsorbcja RNazy na powierzchni złota koloidalnego; najkorzystniejsze warunki adsorpcji uzyskuje się w pH zbliżonym do punktu izoelektrycznego, które dla RNazy trzustkowej wynosi 8,5–9,0, do uzyskaniażądanego pH stosuje się 0,1 M węglan potasu, RNaza zostaje zaadsorbowana na cząsteczkach złota na zasadzie sił elektrostatycznych Van der Waalsa i powoduje stabilizację koloidu,

3) wirowanie (60000 g przez 45 min) i ponowne zawieszenie cząsteczek kompleksu cAu-RNaza w roztworze (ten etap jest konieczny dla uzyskania czystej frakcji enzymu wyznakowanego złotem i usunięcia nadmiaru enzymu wolnego).

Dodatkową stabilizację kompleksu uzyskuje się dodając 1% glikol polietylenowy 20000. Do reakcji sprzęgania z enzymem można używać preparatów handlowych złota koloidalnego oznaczonych EM GC 10 (BioCell), o średnicy 10 nm i stężeniu 0,1% w roztworze buforu Tris o pH 7,4.

Tak wykonany kompleks cAu-RNaza, na zasadzie reakcji enzym-substrat, ujawnia lokalizację cząsteczek RNA na powierzchni skrawka (rys. 8).

6.1.2. Procedura

- * cienkie skrawki (0,5–0,6 μm) umieścić na siatkach niklowych, inkubować na kropli PBS (5 min, temperatura pokojowa),
- * siatki przenieść na kroplę roztworu cAu-RNaza i inkubować przez 30 min (temperatura pokojowa),
- * płukać intensywnie w dwóch naczyniach z wodą destylowaną,
- * kontrastować cytrynianem ołowiu i octanem uranylu.

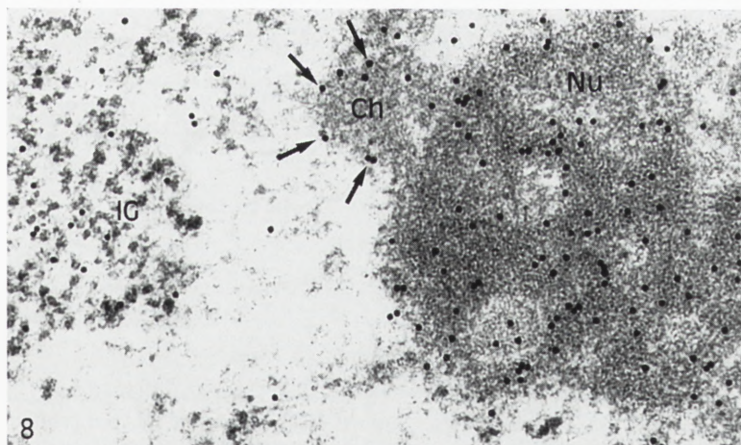
6.1.3. Kontrola reakcji

W celu sprawdzenia specyficzności znakowania kompleksem cAu-RNaza:

- * inkubować skrawki z nieznakowanym enzymem przez 30 min w temperaturze pokojowej,
- * traktować skrawki złotem koloidalnym bez RNazy (30 min).

6.2. Wykrywanie białek argyrofilnych w ME

Białka argyrofilne (*AgNOR proteins*) stanowią grupę białek zlokalizowanych podczas mitozy w organizatorach jąderkowych (NOR). Zostały one zidentyfikowane dzięki ich zdolności do redukcji soli srebra w warunkach kwaśnych, w których większość innych białek komórkowych pozostaje niezabarwiona [10, 30, 51, 52,



Rys. 8. Fragment jądra hepatocytu w 12 godzin po częściowej hepatektomii, znakowanie kompleksem cAu-RNaza, znacznik zlokalizowany głównie w polu jąderka (Nu) oraz na obrzeżu chromatyny skondensowanej (strzałki): IG – ziarnistości interchromatynowe, Ch – chromatyna (pow. 92000 razy)

Tabela 3. Czynniki wpływające na reakcję srebrzenia

	Barwienie Ag NOR	
	wzmocnienie reakcji	osłabienie reakcji
<i>Czynniki tkankowe</i>		
1. Materiał do badań		
– rodzaj materiału do badania	biopsja, cytologia	duże otorbione guzy, materiał autopsyjny
– przechowywanie materiału	chłodzenie próbeki	temperatura pokojowa
– miejscowe czynniki tkankowe (argyrofilia niespecyficzna)		włókna retikularne melanosomy tkanki martwicze
<i>Czynniki metodyczne</i>		
2. Utrwalanie		
– utrwalacz	alkohol, utrwalacze bazujące na alkoholu (Carnoy)	metale ciężkie (np. utrwalacze rtęciowe)
– początek utrwalania	bezpośrednio po pobraniu	po pewnym czasie
– czas	<12 godz.	<12 godz
3. Przygotowanie, barwienie		
– grubość skrawka		<5 μm nieostre granice depozytów srebra
– postfiksacja	preinkubacja w srebrze	
– barwienie srebrem	czas srebrzenia, temp. otoczenia >25°C	– brudne naczynia – przestarzałe odczynniki
4. Metody oceny		
– jakościowa	zmienna grubość skrawka	„postrzępione” AgNOR rozluźnienie AgNOR
– ilościowa		

6.2.1 Przygotowanie roztworów do wysrebrzenia

- 1) roztwór A: 2% żelatyna w 1% kwasie mrówkowym,
- 2) roztwór B: 50% azotan srebra,
- 3) 5% tiosiarczan sodu.

6.2.2 Procedura

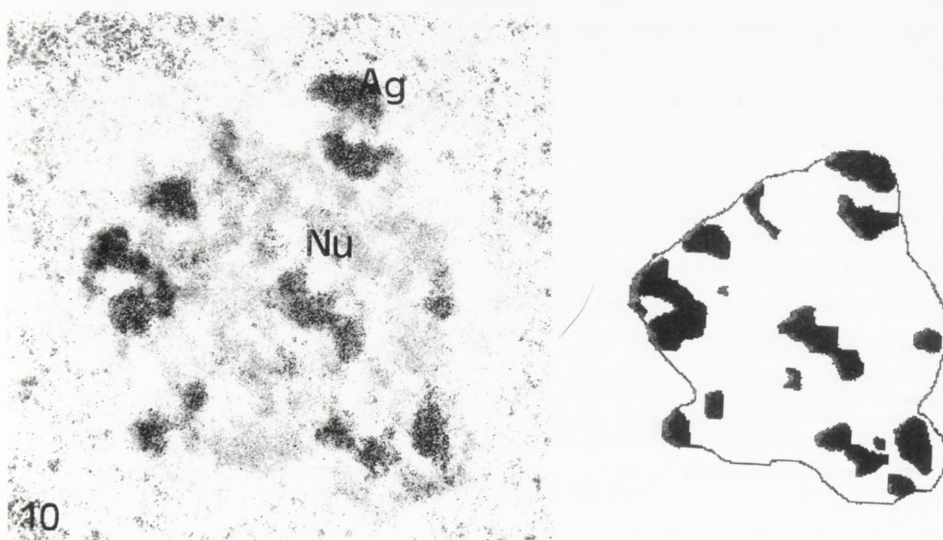
- * tkankę utrwalić (do 0,5 mm³) w 1,6% aldehydzie glutarowym w buforze fosforanowym, pH 7,2 (10 min w 4°C),
- * płukać w buforze fosforanowym, pH 7,2 (4 x 1 min),

- * nawodnić w malejących stężeniach alkoholu etylowego,
- * płukać w wodzie destylowanej,
- * barwić próbki w cieplarni (temperatura 37°C), w komorze wilgotnej przez 10–30 min w roztworze o składzie: 1 objętość roztworu A i 2 objętości roztworu B; *Uwaga*: roztwory A i B przygotowywać przed wykonaniem reakcji wysrebrzania, mieszać bezpośrednio przed barwieniem,
- * płukać materiał w wielu zmianach wody destylowanej (przynajmniej sześciokrotnie),
- * zanurzyć próbki w 5% roztworze tiosiarczanu sodu (10 min),
- * płukać w wielu zmianach wody destylowanej,
- * odwadniać w szeregu alkoholowym, zatapiać w Eponie.

6.2.3. Analiza ilościowa argyrofilii

W diagnostyce nowotworów ilość białek argyrofilnych mierzona jest różnymi parametrami: liczbą depozytów srebra, ich powierzchnią, czy wreszcie wskaźnikiem zawartości AgNOR (ang. *AgNOR content*) bądź też indeksami AgNOR [20, 54, 66]. Wyniki analiz korelacji między powyższymi wskaźnikami a stopniem histologicznego zróżnicowania nowotworów, ich zdolnością do przerzutów i prognozą są niejednoznaczne i stanowią przedmiot dyskusji do chwili obecnej [14, 18, 34, 44, 54, 56, 60]. Ponieważ procedurę wysrebrzania, chociaż stosunkowo prostą, może modyfikować szereg czynników (tab. 3), podejmowane są liczne próby standaryzacji metody [2, 18, 20, 23, 44, 55]. Podczas pierwszych międzynarodowych warsztatów „AgNORy w onkologii” (Berlin 1993), pod auspicjami Europejskiego Towarzystwa Patologów powołano *Committee on AgNOR Quantitation*. Owocem pracy Komitetu jest przewodnik, podejmujący próbę standaryzacji metod argyrofilii, określający przy wykorzystaniu metody Plotona dokładną procedurę srebrzenia materiału cytologicznego, skrawków mrożonych oraz histologicznych, utrwalanych w alkoholu lub innych utrwalaczach na nim bazujących [2]. Dla oceny liczby interfazalnych AgNORów zaproponowano (na poziomie mikroskopu świetlnego) liczenie pojedynczych AgNORów (przy powiększeniu 500) bądź komputerową analizę obrazową, pozwalającą precyzyjnie i powtarzalnie określić powierzchnię AgNORów w jądrze. W celu wyrównania różnic barwliwości w zależności od rodzaju i sposobu przygotowania materiału, jak również różnic w rozdzielczości różnych systemów analizy obrazu, powierzchnia AgNOR powinna być odnoszona do wewnętrznego standardu np. limfocytów [20, 55].

W obrazach ME depozyty srebra widoczne są zawsze w obrębie tych samych struktur jądra i jąderka. W nukleoplazmie wyraźne depozyty odnajdujemy w ziarnistościach interchromatynowych, natomiast w jąderku wysrebrzaniu ulegają: gęsty składnik włóknisty (DFC) oraz centrum włókniste (FC). Komputerowa analiza obrazu



Rys. 10. Jąderko komórki wątrobowej z uwidocznionymi białkami AgNOR pokrywającymi pola gęstego składnika włóknistego oraz odpowiadający mu schemat komputerowy dla wyliczenia współczynnika udziału argyrofili: Ag – depozyty srebra, Nu – jąderko (pow. 54000 razy)

umożliwia precyzyjny pomiar i wyliczenie współczynnika udziału argyrofili. Obliczając powierzchnie przekrojów jąderek (S_{nu}) jak również powierzchnie zajmowane przez depozyty srebra (S_{Ag}), ze wzoru

$$U = S_{Ag}/S_{nu}$$

można wyliczyć współczynnik udziału argyrofili U (rys. 10). Metoda srebrowa stanowi cenne uzupełnienie technik pozwalających uwidaczniać i oceniać aktywność transkrypcyjną komórek.

7. UWAGI KOŃCOWE

W badaniach ultrastrukturalnych jądra komórkowego stoimy zawsze przed dylematem wyboru metody, która w danych warunkach doświadczalnych byłaby dostatecznie czuła i swoista. Nie mniej istotny jest wybór odpowiedniego znacznika, który umożliwiłby uwidocznienie ekspresji genów. W tym kontekście zwrócono uwagę na szereg metod, z których każda niesie korzyści, ale i ograniczenia, np. autoradiografia wysokorozdzielcza z użyciem trytowanej urydyny umożliwia wykrycie miejsc transkrypcji. Następną inkubacja w obecności zimnej urydyny pozwala śledzić przemieszczanie radioaktywnych cząsteczek. Istotnym ograniczeniem tej metody jest niska zdolność rozdzielcza. Z kolei zastosowanie metod częściowego

lub całkowitego rozproszenia chromatyny ułatwia uwidocznienie relacji DNA i struktur RNP oraz ocenę morfologii kompleksów transkrypcyjnych na poziomie molekularnym. Niestety, badanie małych jąder o niewielkiej aktywności transkrypcyjnej tymi metodami jest technicznie trudne. Ocenie morfologicznych wykładników aktywności transkrypcyjnej służą techniki ultracytochemiczne: srebrzenie AgNORów i metoda cAu-RNaza. Pierwsza wykrywa wielofunkcyjne białka AgNOR, zaangażowane w proces dekondensacji i transkrypcji, druga pozwala wykryć powstałe *de novo* cząsteczki RNA na powierzchni skrawka. Reasumując, mimo pewnych ograniczeń metodycznych, przedstawione techniki właściwie dobrane i stosowane równolegle, dostarczają komplementarnych informacji dotyczących struktury i funkcji jądra komórkowego.

LITERATURA

- [1] ARROUA ML, HARTUNG M, DEVICTOR M, BERGE-LEFRANCJ L, STAHL A. Localisation of ribosomal genes by *in situ* hybridization in the fibrillar centre of the nucleolus in the human spermatocyte. *Biol Cell* 1982; **44**: 327–340.
- [2] AUBELE M, BIESTERFELD S, DERENZINI M, HUFNAGL P, MARTIN H, OFNER D, PLOTON D, RÜSCHOFF J. Guidelines of AgNOR quantitation. *Zentralbl Pathol* 1994; **140**: 107–108.
- [3] BACHELLERIE JP, PUVION E, ZALTA JP. Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin. RNA-protein complexes isolated from mammalian cell nuclei. *Eur J Biochem* 1975; **58**: 327–337.
- [4] BACHMANN L, SALPETER MM. Autoradiography with the electron microscope. *Lab Invest* 1965; **14**: 303–315.
- [5] BARTEL H, ORKISZ S, TOSIK D. Quantitative ultrastructural studies of the argyrophilic proteins in the rat hepatocyte nucleoli. Proc. of the 10th European Congress on Electron Microscopy, vol III, Granada, 1992: 809–810.
- [6] BENDAYAN M. Ultrastructural localization of nucleic acids by the use of enzyme-gold complexes. *J Histochem Cytochem* 1981; **29**: 531–541.
- [7] BENDAYAN M, PUVION E. Ultrastructural detection of RNA: Complementarity of high-resolution autoradiography and of RNase-gold method. *J Ultrastruct Res* 1983; **83**: 274–283.
- [8] BEREZNEY R, COFFEY DS. Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. *J Cell Biol* 1977; **73**: 616–637.
- [9] BERNHARD W. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J Ultrastruct Res* 1969; **27**: 250–265.
- [10] BIGGIOGERA M, KAUFMAN SM, SHARPER JM, GAS N, AMALRIC F, FAKAN S. Distribution of nucleolar proteins B-23 and nucleolin during mouse spermatogenesis. *Chromosoma* 1991; **100**: 162–172.
- [11] BILIŃSKI SM, BILIŃSKA B. A new version of the Ag-NOR technique. A combination with DAPI staining. *Histochem J* 1996; **28**: 651–656.
- [12] BOUTEILLE M. The LIGOP method for routine ultrastructural autoradiography. *J Microsc Biol Cell* 1976; **27**: 121–127.
- [13] BOUTEILLE M, FAKAN S, BURGLEN MJ. Efficiency, resolution, grain size and grain shape in routine electron-microscope autoradiography. *J Microsc Biol Cell* 1976; **27**: 171–176.

- [14] CARBONELLI DL, DURAN HA, SCHWINT A, MOLINARI DE REY B. Nucleolar organizer regions as a marker of incipient transformation in a model of experimental carcinogenesis. *Virchows Archiv* 1994; **425**: 165–170.
- [15] CARMO-FONESCA M, PEPPERKOK R, CARVALHO MT, LAMOND AI. Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs in coiled bodies. *J Cell Biol* 1992; **117**: 1–14.
- [16] CHANDLER J. Colloidal gold: theoretical and practical aspects in light and electron microscopy. *Microsc Electronica* 1992; **14**: 57–58.
- [17] CIECIURA L. Techniki stosowane w mikroskopii elektronowej. PWN, Warszawa, 1989: 133–153.
- [18] CROCKER J, BOLDY DAR, EGAN MJ. How should we count AgNORs?. Proposals for a standardized approach. *Pathology* 1989; **158**: 185–188.
- [19] DERENZINI M, PESSION-BRIZZI A, NOUVELLO F. Relationship between RNP particles containing heterogenous RNA and ultrastructure and function of chromatin in purified rat hepatocyte nuclei. *J Ultrastruct Res* 1981; **77**: 66–82.
- [20] DERENZINI M, TRERE D. Standardization of interphase AgNOR measurement by means of an automated image analysis system using lymphocytes as a control. *Pathology* 1991; **165**: 337–342.
- [21] DEVILLERS G, STEVENIN J, JACOB M. Ultrastructural control of a method of preparation of nuclear particles containing hnRNA. Analogy between isolated particles and perichromatin fibrils. *Biol Cell* 1977; **28**: 215–225.
- [22] DROZ B. Artefacts in radioautography. *J Microsc Biol Cell* 1976; **27**: 133–134.
- [23] DUSKOVA J, POVYSIL C, SCHREIBER V. AgNORsin estrogen-induced and thyroedin-inhibited rat anterior pituitary hyperplasia. Computer image analysis and nonautomated AgNOR typing. *Analyt Quant Cytol Histol* 1997; **19**: 55–61.
- [24] FAKAN S, HUGHES ME. Fine structural ribonucleoprotein components of the cell nucleus visualized after spreading and high resolution autoradiography. *Chromosoma* 1989; **98**: 242–249.
- [25] FAKAN S, PUVIONE E. The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int Rev Cytol* 1980; **65**: 255–299.
- [26] FRANKE WW, SCHEER U, SPRING H, TRENDELENBURG H, ZENTGRAF H. Organization of nucleolar chromatin.[w] Busch H.[red.] *The cell nucleus*. Vol 7, New York, Ac Press 1979: 49–96.
- [27] GRIZZLE WE. Theory and practice of silver staining in histopathology. *J Histotechnol* 1996; **19**: 183–195.
- [28] HAWKINS HK, REHML L, ZHU J. Colloidal gold labeling of sections and cell surfaces. *Ultrastruct Pathol* 1992; **16**: 61–70.
- [29] HERRERA GA. Ultrastructural immunolabeling: a general overview of techniques and applications. *Ultrastruct Pathol* 1992; **16**: 37–45.
- [30] JEWELL SD, CORDIAL CR. Silver staining of nucleolar organizer regions. *J Histotechnol* 1996; **19**: 241–255.
- [31] JUNERA HR, FORTEL RI, GERAUD G, HERNANDEZ-VERDUN D. A study by confocal microscopy of the three-dimensional organization of rDNA genes AgNOR proteins. Proc. of the 10th European Congress on Electron Microscopy, Granada, 1992, vol III: 621–622.
- [32] KILJAŃSKA Z, SZYMZYK P. Niskocząsteczkowe jąderkowe RNA (snoRNA); właściwości i funkcje. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 227–258.
- [33] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L. Cytobiochemia, Warszawa, PWN 1995: 257–420.
- [34] LEEK RD, ALISON MR, SARRA FC. Variations in the occurrence of silver staining nucleolar organizer regions(AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. *J Pathol* 1991; **165**: 43–51.
- [35] MARX J. The cell cycle coming under control. *Science* 1989; **24**: 252–255.

- [36] MASSE R. Action of radiation on nuclear emulsion. *J Microsc Biol Cell* 1976; **27**: 83–90.
- [37] MAZIARSKI S. *Histofizjologia człowieka*, Polska Akademia Umiejętności, Kraków, 1949.
- [38] Mc KNIGHT SL, MILLER OL. Post-replicative nonribosomal transcription units in *D. melanogaster* embryos. *Cell* 1979; **17**: 551–563.
- [39] MILLER OL, BEATTY BR. Visualization of nucleolar genes. *Science* 1969; **164**: 955–964.
- [40] MORENO S, NURSE P. Substrates for p34^{cdc2}: *in vivo* veritas? *Cell* 1989; **58**: 193–203.
- [41] NECHAUD B, VIRON A, PUVION E. Culture en monocouches de cellules hépatiques de souris adulte sécrétant l'albumine et l'alpha-fœtoprotéine. *C R Acad Sci Paris* 1979; **289**: 737–740.
- [42] ORKISZ S, BARTEL H. Morphology of nuclear ribonucleoproteins in the early period of liver regeneration after irradiation. *Histochemistry* 1981; **71**: 929–634.
- [43] ORKISZ S, BARTEL H, TOSIK D. Colloidal gold-RNase labeling of RNA in regenerating rat liver hepatocytes. *Folia Histochem Cytobiol* 1995; **33**: 247–253.
- [44] OFNER D, SCHMID KW. Standardized AgNOR analysis: its usefulness in surgical oncology. *Histochem Cell Biol* 1996; **106**: 193–196.
- [45] PIENKOWSKA A, ŚWITOŃSKI M. Obszary jąderkotwórcze (NOR) u ssaków. Występowanie i polimorfizm. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 135–143.
- [46] PLOTON D, MENAGER M, JEANESSON P, HIMBER G, PIGEON F, ADNET JJ. Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986; **18**: 5–14.
- [47] PUVION-DUTILLEUL F. *In situ* hybridization, immunocytochemistry, autoradiography: complementary tools for ultrastructural studies. Proc. of the 10th European Congress on Electron Microscopy, vol III, Granada, 1992: 151–155.
- [48] PUVION-DUTILLEUL F, PUVION E. New aspects of intranuclear structures following partial decondensation of chromatin: a cytochemical and high resolution autographical study. *J Cell Sci* 1980; **42**: 305–321.
- [49] PUVION-DUTILLEUL F, BERNADAC A, PUVION E, BERNHARD W. Visualization of two different types of nuclear transcriptional complexes in rat liver cells. *J Ultrastruct Res* 1977; **58**: 108–117.
- [50] RASKA I, KOBERNA K, DUNDR M. Subcompartmentalization of the cell nucleus: the case of the coiled body. Proc. of the 10th European Congress on Electron Microscopy, vol III, Granada, 1992: 361–362.
- [51] ROKICKA A. Obszary jąderkotwórcze (NOR) w badaniach cytogenetycznych. *Post Biol Kom* 1985; **12**: 145–162.
- [52] ROUSSEL P, HERNANDEZ-VERDUN D. Identification of AgNOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp Cell Res* 1994; **214**: 465–472.
- [53] ROTH J. The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry. *Techn Immunocytochem* 1983; **2**: 217–284.
- [54] RÜSCHOFF J. Nukleolus Organisierung Regionen (NORs) in der Pathomorphologischen Tumor Diagnostik. Stuttgart, Jena, New York, Gustav Fischer Verlag 1992: 19–101.
- [55] RÜSCHOFF J, PLATE KH, CONTRACTOR H, KERN S, ZIMMERMAN R, THOMAS C. Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization. *J Pathol* 1990; **161**: 113–118.
- [56] RÜSCHOFF J, PRASER CE, CORTEZ T, HOHNE HM, HOHENBERGER W, HOFSTADTER F. Diagnostic value of AgNOR staining in follicular cell neoplasms of the thyroid: comparison of evaluation methods and nucleolar features. *Am J Surg Pathol* 1993; **17**: 1281–1288.
- [57] SAWICKI W. Mikroautografia [w] Krygier-Stojałowska A, Godlewski H [red] Topochemiczne metody badań komórek i tkanek. Warszawa, PWN 1982, t I: 193–213.
- [58] SCHEER U, THIRY M, GOESSENS G. Structure, function and assembly of the nucleolus. *Trends Cell Biol* 1993, **3**: 236–241.

- [59] SPECTOR DL, FU XD. Associations between pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J* 1991; **10**: 3467–3481.
- [60] SZOT W, SZYBIŃSKI Z, ZACZEK M, KĘDRA D, DĄBROŚ E, PIOTROWSKA K, CHŁAP Z. Fine needle aspiration cytology combined with argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in diagnosis of thyroid neoplasms. *Endokrynologia Polska* 1993; **44**: 413–426.
- [61] THIRY M, GOESSENS G. Where, within the nucleolus, are the rRNA genes located? *Exp Cell Res* 1992; **200**: 1–4.
- [62] TRERE D, FARABEGOLI F, CANCELLIERIT A, CECCARELLI C, EUSEBI V, DERENZINI M. AgNOR area in interphase nuclei of human tumors correlates with proliferative activity evaluated by bromodeoxyuridine labeling and Ki-67 immunostaining. *J Pathol* 1991; **165**: 53–61.
- [63] WARCHOŁ JB, BRELIŃSKA R. Zastosowanie złota koloidalnego w immunocytochemii. [w] Zabel M [red.] Immunocytochemia. Warszawa, PWN 1990: 121–143.
- [64] WILCZYŃSKI G. Ultrastrukturalne i molekularne aspekty ekspresji jąderkowych genów rRNA. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 73–100.
- [65] ZABEL M. Immunocytochemia na poziomie ultrastrukturalnym. [w]: Zabel M. [red.] Immunocytochemia Warszawa, PWN 1990: 11–24.
- [66] ZACZEK M, DĄBROŚ E, MACIEJOWSKI J, SZOT W. Identification and assessment of nucleolar organizer regions (NORs) – technical problems. *Pat Pol* 1994; **45**: 35–38.

*Adres autora: Zakład Anatomii Prawidłowej
Katedry Nauk Podstawowych WAM
ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź*

FUNKcjONALNA ORGANIZACJA OSŁONKI JĄDROWEJ

FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE NUCLEAR ENVELOPE

JACEK GODULA

Zakład Zoologii Systematycznej i Zoogeografii, Instytut Zoologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Osłonka jądrowa stanowi dynamiczną i asymetryczną barierę, oddzielającą genom komórki od pozostałych jej składników. Tworzą ją dwie błony, rozdzielone przestrzenią wokółjądrową, oraz struktury będące częścią macierzy jądrowej: blaszka jądrowa i jądrowe kompleksy porowe. Błony osłonki w wielu miejscach łączą się ze sobą, tworząc otwory, zwane porami jądrowymi. Blaszką jądrową składa się z sieci filamentów pośrednich zbudowanych z lamin jądrowych. Pełni ona rolę podpory dla błon osłonki, jest odpowiedzialna za organizację chromosomów interfazowych, uczestniczy w procesach replikacji i transkrypcji DNA oraz stanowi miejsce zakotwiczenia filamentów cytoszkieletu. Jądrowe kompleksy porowe osadzone w porach osłonki jądrowej, są złożonymi kompleksami białek, zwanych nukleoporynami. Poprzez zlokalizowane w nich kanały odbywa się transport jonów (dyfuzja bierna) oraz białek i innych związków wysokocząsteczkowych (transport aktywny). Podczas podziału jądra komórkowego błony osłonki jądrowej rozpadają się na liczne pęcherzyki, które ulegają rozproszeniu w cytosolu. Równocześnie następuje dezintegracja blaszki jądrowej oraz demontaż jądrowych kompleksów porowych. Odbudowa osłonki jądrowej jest w zasadzie procesem odwrotnym do procesu jej rozpadu.

Słowa kluczowe: osłonka jądrowa, blaszka jądrowa, laminy, jądrowe kompleksy porowe, nukleoporyny.

Summary: The nuclear envelope is a dynamic and asymmetrical barrier separating the genome from other constituents of the cell. It consists of two membranes with the perinuclear space inbetween, as well as of structures belonging to the nuclear matrix: nuclear lamina and nuclear pore complexes. At many sites the membranes fuse to form openings called nuclear pores. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate filaments built of nuclear lamins. It supports the membranes, is responsible for the organization of interphase chromosomes, participates in DNA replication and transcription and is an anchorage site for cytoplasmic intermediate filaments. The nuclear pore complexes located in the pores of the nuclear envelope are highly organized sets of proteins called nucleoporins. They form channels serving for transport of ions (passive diffusion) as well as proteins and other macromolecular compounds (active transport). During cell division, the membranes of the nuclear envelope undergo fragmentation

into numerous vesicles dispersed in the cytosol and this process is accompanied by disintegration of the nuclear lamina and nuclear pore complexes. The reconstitution of the nuclear envelope after cell division is a reverse process.

Key words: nuclear envelope, nuclear lamina, lamins, nuclear pore complex, nucleoporins.

Powstanie osłonki jądrowej w toku ewolucji komórki pozwoliło na oddzielenie od siebie dwóch tworzących ją przedziałów: nukleoplazmy, z zawartym w niej genomem, i cytoplazmy, w której przebiegają główne procesy metaboliczne oraz zlokalizowane są dynamiczne elementy cytoszkieletu. Dzięki istotnym różnicom, jakie istnieją między obu przedziałami, osłonka jądrowa jest strukturą asymetryczną zarówno w sensie strukturalnym, jak i funkcjonalnym. Asymetria strukturalna jest związana z:

- 1) różnicami w składzie enzymatycznym między obu błonami osłonki,
- 2) obecnością rybosomów wyłącznie na błonie zewnętrznej,
- 3) występowaniem w błonie wewnętrznej specyficznych białek integralnych wiążących ją z laminami blaszki jądrowej.

O asymetrii funkcjonalnej osłonki świadczy natomiast jej rola jako selektywnej bariery, przez którą, z jądra do cytoplazmy, transportowane są rozmaite klasy RNA oraz podjednostki rybosomowe, natomiast z cytoplazmy do jądra przenoszone są białka i niektóre rybonukleoproteiny (np. snRNP).

Zgodnie z powszechnie przyjętą koncepcją [30, 135] osłonkę jądrową w jądrach interfazowych tworzą:

(1) dwie błony biegnące mniej więcej równoległe do siebie: przylegająca do nukleoplazmy błona jądrowa wewnętrzna oraz kontaktująca się bezpośrednio z cytoplazmą, błona jądrowa zewnętrzna;

(2) występująca między nimi przestrzeń okołojądrowa (pery nuklearna) szerokości ok. 40 nm;

(3) pory jądrowe, w których osadzone są jądrowe kompleksy porowe;

(4) blaszka jądrowa – cienka włóknista warstwa, zbudowana z białek zwanych laminami jądrowymi, przylegająca od strony nukleoplazmy do wewnętrznej błony jądrowej. Blaszkę jądrową wraz ze związanymi z nią strukturalnie jądrowymi kompleksami porowymi jest równocześnie częścią macierzy jądrowej [17, 93].

Współcześnie, błony osłonki jądrowej uważane są za wyspecjalizowaną część systemu błon szorstkiej siateczki śródplazmatycznej. Wskazuje na to, obserwowany często, bezpośredni kontakt błon cystern siateczki z zewnętrzną błoną jądrową, a także morfologiczne, biochemiczne i funkcjonalne podobieństwo między tymi błonami (obecność rybosomów i niektórych enzymów, np. glukozo-6-fosfatazy, cytochromu P450, cytochromu b₅, 5'-nukleotydazy). Błona jądrowa wewnętrzna różni się w istotny sposób od błony zewnętrznej. Wynika to głównie ze związku, jaki tworzy ona z blaszką jądrową. W komórkach wyższych *Eukaryota*, stwierdzono w niej szereg specyficznych białek integralnych [45], do których należą m.in. białka

LAP [34, 38, 78, 132, 133] i otefina [98] (patrz podrozdz. „Błaszka jądrowa”). Badania *in vitro* sugerują, że białka te wiążą się bezpośrednio z laminami blaszki jądrowej [34, 133], a niektóre z nich również z chromatyną [34, 137].

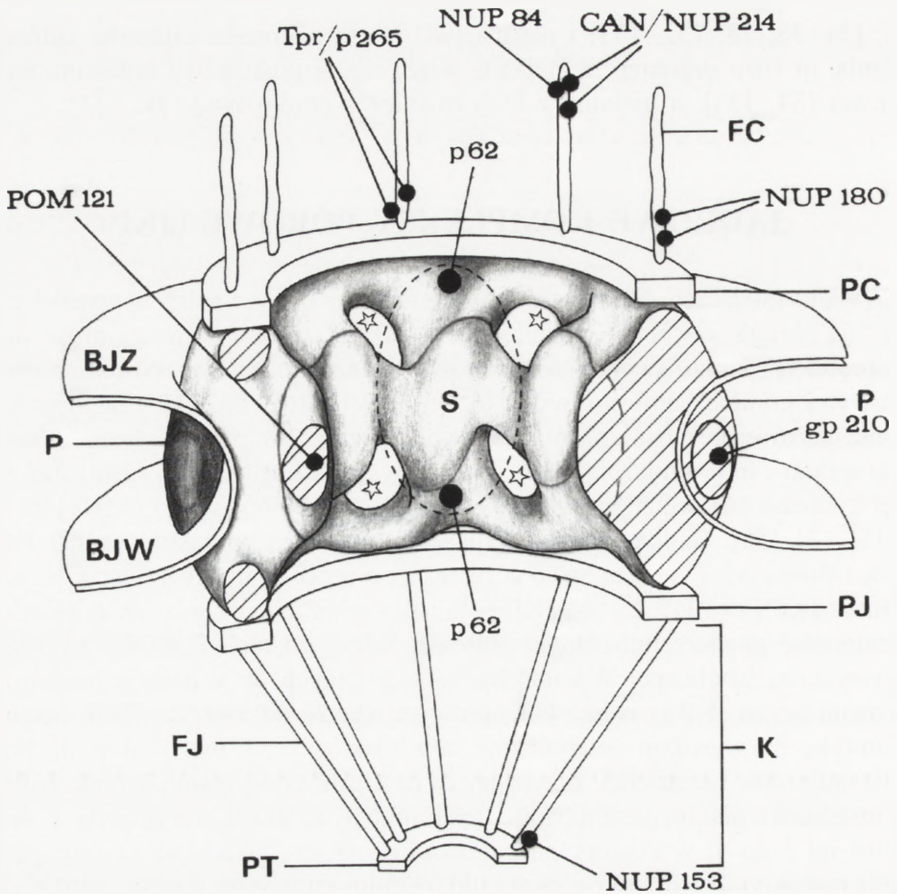
JĄDROWE KOMPLEKSY POROWE (JKP)

W wielu miejscach, błony osłonki jądrowej łączą się ze sobą, w wyniku czego powstają okrągłe otwory, o średnicy 120–150 nm, zwane porami jądrowymi. W ich obrębie osadzone są kompleksy białkowe o niezwykle złożonej strukturze zwane jądrowymi kompleksami porowymi [6, 7, 49, 101, 102, 60, 61]. Fragmenty błon osłonki jądrowej, bezpośrednio otaczające pory, tworzą wyspecjalizowane, odmienne strukturalnie i biochemicznie, domeny. U wyższych *Eukaryota* stwierdzono w ich obrębie obecność dwóch specyficznych białek transbłonowych: gp 210 [46, 134] i POM 121 [56]. Białka te, jak przypuszcza się, służą do zakotwiczenia JKP w błonie osłonki jądrowej, a ponadto uczestniczą w procesie inicjacji (ang. *nucleation*) montażu JKP [46, 134]. Liczba JKP w jądrze komórkowym oraz ich zagęszczenie na jednostkę powierzchni osłonki jądrowej zależą od typu komórki, jej wieku i aktywności metabolicznej. W komórkach somatycznych, np. w hepatocytach myszy, całkowita liczba JKP w jądrze komórkowym wynosi od 3000 do 7000, natomiast w komórkach o wysokim metabolizmie, takich jak oocyty *X. laevis*, może dochodzić do 40 milionów. Liczba JKP przypadająca na $1 \mu\text{m}^2$ powierzchni osłonki jądrowej w komórkach o niskim metabolizmie (np. limfocyty człowieka, erytrocyty *X. laevis*) wynosi od 3 do 4; w komórkach bardziej aktywnych, takich jak oocyty płazów, 50–60, podczas gdy u orzęsków około 100 (*Didinium nasutum*), a nawet 140 (*Nassula* sp.) [111].

Każdy JKP (rys. 1 i 2) stanowi niezwykle złożoną strukturę białkową o masie (w przypadku komórek kręgowców) równej około 125 MDa (tj. 125×10^6 Da) [112]. W przybliżeniu jest to struktura cylindryczna o oktagonalnym kształcie [60, 61, 69, 103, 112], średnicy ok. 124 nm i wysokości ok. 70 nm (wartości te odnoszą się do JKP w jądrach oocytów *X. laevis* [103]). W komórkach drożdży JKP są nieco mniejsze: ich średnica wynosi ok. 100 nm, natomiast masa równa się ok. 66 MDa [113]. JKP składają się z trzech oktagonalnych pierścieni [60, 102, 103]:

1) kompleksu szprych (ang. *spoke complex*), określanego też jako zrąb podstawowy (ang. *basic framework*), złożonego z 8 szprych otaczających kanał centralny, w którym często widoczna jest struktura, zwana kompleksem kanału centralnego;

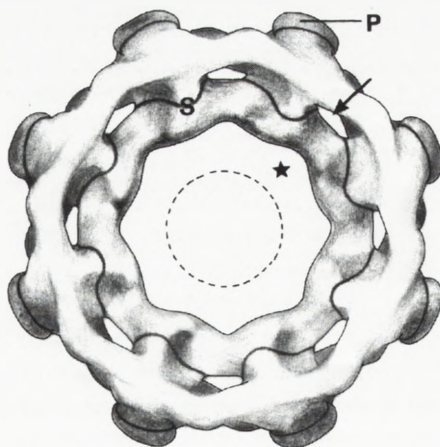
2) pierścienia cytoplazmatycznego (ang. *cytoplasmic ring*), o średnicy 110 nm, leżącego w płaszczyźnie błony jądrowej wewnętrznej i przylegającego do kompleksu szprych od strony cytoplazmy oraz



Rys. 1. Model przestrzenny jądrowego kompleksu porowego (przekrój podłużny), czarnymi krążkami zaznaczono lokalizację zidentyfikowanych dotąd nukleoporyn, BJW – błona jądrowa wewnętrzna, BZJ – błona jądrowa zewnętrzna, FC – filament cytoplazmatyczny, FJ – filament jądrowy, K – „koszyk”, PC – pierścień cytoplazmatyczny, PJ – pierścień jądrowy, P – podjednostka szprychy zlokalizowana we wnętrzu przestrzeni okołojądrowej; PT – pierścień terminalny; S – szprycha; kompleks kanału centralnego oraz kanały peryferyczne zaznaczono odpowiednio: linią przerywaną i gwiazdkami (wg Bastos i wsp. [11] nieco zmienione)

3) pierścienia jądrowego (ang. *nuclear ring*), o średnicy 90–100 nm, zlokalizowanego w płaszczyźnie błony jądrowej wewnętrznej i przylegającego do kompleksu szprych od strony nukleoplazmy.

Według modelu zaproponowanego przez Hinshaw [60,61] (rys. 2), każda szprycha zrębu podstawowego składa się z czterech podjednostek, z których jedna, zwana podjednostką wnętrza przestrzeni okołojądrowej (ang. *luminal subunit*) (rys. 1 i 2), wnika do przestrzeni okołojądrowej i służy do zakotwiczenia JKP w błonie osłonki jądrowej. W rezultacie, między dwoma sąsiednimi szprychami i błoną osłonki



Rys. 2. Model przestrzenny kompleksu szprych JKP widziany z góry: P – podjednostka szprychy zlokalizowana we wnętrzu przestrzeni okołojądrowej, S – szprycha; kanał centralny i kompleks kanału centralnego zaznaczono odpowiednio: gwiazdką i linią przerywaną; strzałka wskazuje jeden z kanałów peryferycznych; (wg Hinshaw [60] nieco zmienione)

tworzy się niewielki kanał o średnicy około 10 nm. W sumie, w obrębie JKP powstaje osiem takich kanałów, zwanych peryferycznymi (rys. 1 i 2), które, zdaniem Hinshaw [60,61] mogą reprezentować miejsca biernej dyfuzji jonów i małych cząsteczek o średnicy poniżej 10 nm. Kanały te, jak sugerują inni autorzy [120, 130], prawdopodobnie ułatwiają również import z cytoplazmy białek tworzących wewnętrzną błonę jądrową. Odmienny pogląd na temat lokalizacji tych kanałów wyrażają Akey i Rademacher [7]; ich zdaniem, są one usytuowane między dwoma sąsiednimi szprychami a kompleksem kanału centralnego.

Charakterystyczną cechą zarówno pierścienia cytoplazmatycznego, jak i jądrowego są zakotwiczone w nich delikatne filamenty [49, 50, 69, 103]. Z pierścienia cytoplazmatycznego wyrasta w głąb cytoplazmy 8 filamentów, długości ok. 100 nm, które mogą kurczyć się przyjmując kształt pałeczek. Podobny system 8 filamentów o długości 50–100 nm, wyrasta również z pierścienia jądrowego. Jednakże w przeciwieństwie do filamentów pierścienia cytoplazmatycznego, których końce dystalne tkwią wolno w cytosolu, końce filamentów jądrowych łączą się w nukleoplazmie z tzw. z pierścieniem terminalnym, o średnicy 30–50 nm, tworząc charakterystyczny „koszyk” [49, 69] (rys. 1). Budowa molekularna filamentów JKP nie jest do tej pory w pełni wyjaśniona. Dzięki zastosowaniu metod immunologicznych zidentyfikowano w nich szereg białek [11, 71, 105, 127, 131], które zostaną szerzej omówione w podrozdziale „Nukleoporyny”. Niewiele również wiadomo na temat roli tych filamentów w funkcjonowaniu JKP. Szereg faktów wskazuje, iż są one związane z transportem białek do jądra i prawdopodobnie zawierają miejsca akceptorowe (ang. *docking sites*) z którymi białka te wiążą się, zanim nastąpi ich translokacja do wnętrza jądra [10, 104] (patrz podrozdział „Transport przez JKP”). Zakłada się, iż analogiczną funkcję pełnią filamenty jądrowe podczas eksportu materiału z jądra do cytoplazmy [82].

We wnętrzu kanału centralnego JKP obserwuje się często strukturę, zwaną kompleksem kanału centralnego (ang. *central canal complex*), zatyczką centralną (ang. *central plug*) lub transporterem (rys. 1). Struktura ta przyjmuje różną postać w zależności od zastosowanej techniki badawczej. Opinie na temat budowy, funkcjonowania, a także rzeczywistego istnienia tych kompleksów nie są zgodne. Zdaniem Panté i Aebi [100] kompleks kanału centralnego może działać jak zatyczka, która jest wciągana (w celu zamknięcia kanału) lub wysuwana z niego w stopniu umożliwiającym przejście określonej cząsteczki białka. Według innych autorów [42, 69], często obserwowany brak tego kompleksu, a także jego zmienna morfologia, sugerują, iż prawdopodobnie reprezentuje on materiał białkowy w trakcie transportu przez JKP, a nie integralny składnik JKP. Z kolei badania Akeya [5] oraz Akeya i Radermachera [7] wskazują, iż kompleks centralny jest stałym składnikiem JKP, który przyjmuje szereg różnych konfiguracji w czasie transportu białek przez kanał centralny.

NUKLEOPORYNY

W skład JKP wchodzi ok. 100 różnych polipeptydów, zwanych nukleoporynami (NUP) [10, 11, 32, 102, 114, 124a], z których część została zidentyfikowana a ich epitopy zlokalizowane w określonych strukturach JKP [11, 103] (rys. 1). Nukleoporyny występujące u kręgowców można podzielić na dwie grupy: jedną z nich tworzy rodzina glikoprotein, o masie cząsteczkowej od 45 do 230 kDa, zawierających N-acetyloglukozaminę połączoną z białkiem wiązaniem O-glikozykowym [11, 63, 103]; do tego typu nukleoporyn należą: p62, CAN/NUP214, NUP 153, POM 121. Drugą grupę nukleoporyn reprezentują glikoproteiny nie zawierające N-acetyloglukozaminy. W licznych eksperymentach *in vitro* wykazano, że białko p62 ma zasadnicze znaczenie dla formowania się i funkcji JKP [25, 33, 103] i najprawdopodobniej jest związane z kompleksem centralnym JKP [54]. Drugim ważnym białkiem jest CAN/NUP 214. Białko to występuje w filamentach cytoplazmatycznych JKP i przypuszczalnie pełni rolę czynnika rozpoznającego kompleksy białko kariofilne-NLS-receptor przed ich translokacją do wnętrza jądra [2, 42] (patrz podrozdział „Transport przez JKP”). Ostatnio wykazano [12], że z CAN/NUP 214 związana jest inna nukleoporyna, NUP 84, która prawdopodobnie wiąże CAN/NUP214 z cytoplazmą otaczającą JKP. Białko NUP 153 jest jedyną nukleoporyną stwierdzoną dotąd w „koszyku” JKP [24, 124]. Występuje ono najprawdopodobniej w pierścieniu terminalnym i charakteryzuje się obecnością czterech palców cynkowych (ang. *zinc fingers*), które, jak wykazały badania w warunkach *in vitro*, zdolne są do wiązania DNA. W związku z tym, przypuszcza się, iż białko to może uczestniczyć w organizacji chromatyny sąsiadującej z JKP [11]. Wysuwane

są również sugestie, że NUP 153 pełni funkcję stabilizującą strukturę "koszyka" [69, 105].

Do nukleoporyn nie zawierających N-acetyloglukozaminy należą: Tpr/p265 (Tpr, ang. *Translocated promoter region*), NUP180, NUP107, NUP 155, gp210 i odkryta ostatnio NUP84. Dwa pierwsze białka, o niewyjaśnionej dotąd funkcji, są składnikami filamentów cytoplazmatycznych JKP. Wilken i wsp. [131] sugerują, że NUP 180 jest odpowiedzialna za tworzenie łączników [22] między cytoplazmatycznymi filamentami JKP a filamentami pośrednimi cytoszkieletu, natomiast zdaniem Byrd i wsp. [21], białko to prawdopodobnie tworzy rdzeń filamentów cytoplazmatycznych JKP. Nukleoporyna gp210 [46, 134] i wspomniana wyżej POM121 [56] należą do glikoprotein transbłonowych zlokalizowanych w błonie jądrowej otaczającej JKP. Białka te, jak się przypuszcza, służą do zakotwiczenia JKP w osłonce jądrowej, a także uczestniczą w inicjowaniu formowania JKP [46, 134].

Przed przystąpieniem komórki do podziału liczba JKP przypadająca na jednostkę powierzchni osłonki jądrowej prawie nie ulega zmianie, mimo że powierzchnia ta powiększa się niemal dwukrotnie. Fakt ten wskazuje, iż JKP muszą tworzyć się *de novo* [80]; mechanizm tego procesu nie został jednakże dotąd wyjaśniony. Niewiele informacji istnieje również na temat biosyntezy nukleoporyn. Wiadomo m.in., że glikozylacja tych białek odbywa się w cytosolu, gdzie stwierdzono obecność transferazy N-acetyloglukozaminowej [57] oraz że gp 210 (a prawdopodobnie także inne nukleoporyny) są syntetyzowane na polirybosomach siateczki śródplazmatycznej i zewnętrznej błony jądrowej. Utworzone białka, drogą dyfuzji bocznej przemieszczają się do miejsc, gdzie odbywa się montaż JKP [11].

TRANSPORT PRZEZ JKP

Osłonka jądrowa stanowi barierę zapewniającą selektywną, dwukierunkową wymianę substancji między wnętrzem jądra a cytoplazmą. Wymiana ta odbywa się głównie przez JKR (w drodze transportu biernego lub aktywnego) i zapewnia utrzymanie stałej łączności między tymi dwoma przedziałami komórki [32, 67, 79, 91, 100, 103, 114]. Transport jonów, nukleotydów i białek o niewielkiej masie, odbywa się w sposób nieselektywny w drodze dyfuzji biernej przez osiem kanałów zlokalizowanych w obrębie JKP [60, 61] (patrz podrozdział „Jądrowe kompleksy porowe”). Do transportu cząstek o większej masie i średnicy nie przekraczającej 26 nm, np. podjednostek rybosomowych, cząsteczek RNP, polimeraz DNA i RNA, lamin [4], służy kanał centralny JKP, którego maksymalna średnica wynosi około 26 nm. Transport przez ten kanał ma charakter aktywny i wymaga dostarczenia energii, a także obecności różnego typu czynników cytosolowych [36, 42, 64, 84]. Obecnie wiadomo, że tzw. białka kariofilne (białka transportowane z cytoplazmy

do jądra) zaopatrzone są w krótkie sekwencje aminokwasowe, zwane sekwencjami (lub sygnałami) lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization sequences* lub *signals*), które umożliwiają dotarcie do JKP, a następnie wniknięcie do jądra komórkowego [29, 39, 119]. Sekwencje te, bogate w aminokwasy zasadowe (lizyna, arginina), zlokalizowane są zwykle na powierzchni białek kariofilnych, dzięki czemu są łatwo rozpoznawane przez receptory cytosolu. Przykładem białek kariofilnych są nukleoplazmina i laminy jądrowe.

Przypuszczalny mechanizm transportu białek z cytoplazmy do jądra złożony jest wg Panté i Aebi [103] z kilku etapów:

(1) związanie białka kariofilnego (przez NLS) z określonym receptorem cytosolowym [2] (do receptorów takich należą np.: białko p54/p56 [2] i przypuszczalnie importyna wyizolowana z jaj *X. laevis* [53]); interakcja białka kariofilnego z receptorem zwykle jest stabilizowana przez czynniki cytosolowe, do których należy np. białko hsc 70 [66, 118];

(2) asocjacja powstałego kompleksu białko kariofilne-NLS-receptor z peryferyjnymi elementami JKP (pierścieniem cytoplazmatycznym lub filamentami cytoplazmatycznymi [1, 42, 122]; przypuszcza się, że rolę miejsca zakotwiczonego (*docking site*) transportowane białko na filamentach cytoplazmatycznych pełni CAN/NUP214 [12];

(3) związanie transportowanego kompleksu białkowego z kompleksem centralnym JKP; prawdopodobnie w procesie tym istotną rolę odgrywa nukleoporyna p62 (rys. 1);

(4) zamknięcie kanału centralnego i wymagający energii proces translokacji kompleksu białkowego do wnętrza jądra [85,89];

(5) uwolnienie receptora i jego recykliczacja (powrót do cytoplazmy) [2].

Kwestią niewyjaśnioną do końca jest pochodzenie energii zużywanej w aktywnym transporcie białek do wnętrza jądra. Powszechnie akceptowany jest pogląd, że translokacja białka przez kanał centralny jest zależna od hydrolizy ATP (obecność tego kwasu została stwierdzona na nukleoplazmatycznej powierzchni osłonki jądrowej [128]). Tymczasem badania Melchior i wsp. [85] oraz Moore i Blobel [89] dowiodły, że w procesie tym jest wykorzystywany również GTP. Udział tego związku jako źródła energii potwierdzony został również przez Pruschy [110], który wykazał, że w warunkach *in vitro* transport kalmoduliny do jądra nie wymaga hydrolizy ATP.

Mechanizm transportu kwasów rybonukleinowych z jądra do cytoplazmy (zwykle w postaci cząsteczek RNP [31, 67]) jest generalnie podobny do mechanizmu importu substancji z cytoplazmy. Wymaga on również obecności sekwencji sygnałowych, receptorów i źródła energii [13, 26, 30, 68]. Badania nad transportem mRNA wykazały, że:

– jest on zależny od ATP [4];

– sekwencją sygnałową jest najczęściej odcinek poli(A) zlokalizowany na końcu 3' łańcucha polinukleotydowego;

– koniec 5' jest z reguły tym końcem, który pierwszy nawiązuje kontakt z JKP [4, 82].

Transport tRNA nie wymaga obecności ATP; sekwencje sygnałowe zlokalizowane są w tym związku w pętlach D i T; ponadto wykazano, że jeżeli G₅₇ w pętli D zostanie zastąpiony przez inną zasadę, szybkość transportu tego kwasu maleje 20-krotnie [4].

Transport 5S rRNA zależy od jego interakcji z czynnikiem transkrypcyjnym TFIIIA lub z białkiem rybosomowym L5 [55]. W przypadku, gdy białka te ulegną mutacji, która uniemożliwia wiązanie się ich z RNA, następuje zablokowanie transportu kwasu do cytoplazmy. W cząsteczkach snRNP, importowanych przez jądro z cytoplazmy, sekwencje sygnałowe, jak wykazano, zlokalizowane są w snRNA, np. w U2snRNA, tworzy ją sekwencja AU_nG (n = ok. 6) [4].

BLASZKA JĄDROWA

Blaszka jądrowa jest istotnym elementem struktury jądra komórkowego odpowiedzialnym za utrzymanie jego właściwej organizacji przestrzennej i prawidłowe funkcjonowanie w cyklu komórkowym. W okresie interfazy blaszka jądrowa pełni szereg ważnych funkcji:

1. Stanowi podporę dla błon osłonki jądrowej [41, 95, 96] wpływając równocześnie na kształt jądra.

2. Stanowi miejsce przyczepu dla pętli chromatynowych, przez co pełni ważną rolę w organizacji chromosomów interfazowych [19, 41, 44, 47, 48, 62, 95, 99, 125, 138].

3. Jest odpowiedzialna za właściwą organizację JKP i ich zakotwiczenie w błonach osłonki jądrowej [3, 49].

4. Odgrywa rolę w procesach replikacji i transkrypcji DNA [65, 83, 87, 92]; badania nad laminami *X. laevis* wykazały, że jądra komórkowe pozbawione blaszki jądrowej są niezdolne do zainicjowania replikacji [83].

5. Stanowi miejsce zakotwiczenia filamentów pośrednich [35,40], co zapewnia bezpośredni kontakt jądra z błoną komórkową, wpływa na kształt jądra [115] i umożliwia przekazywanie sygnałów z cytoplazmy do jego wnętrza [88, 93]; kontakt między laminami jądra a filamentami pośrednimi cytoplazmy odbywa się, najprawdopodobniej, za pośrednictwem JKP [40, 51, 70].

6. Jest ściśle związana z rozpadem i rekonstrukcją błon osłonki jądrowej podczas podziału jądra (patrz podrozdział „Osłonka jądrowa w czasie podziału jądra komórkowego”).

Błaszczkę jądrową tworzy cienka warstwa grubości od 30 do 100 nm, zbudowana z sieci filamentów o średnicy 10 nm, przylegająca od strony nukleoplazmy do błony wewnętrznej osłonki jądrowej [27, 49, 81, 88, 95, 96, 123]. Grubość blaszki w obrębie jądra jest często zróżnicowana, przy czym najbardziej zgrubiałe jej odcinki zlokalizowane są z reguły w sąsiedztwie chromatyny [14]. Głównym składnikiem blaszki jądrowej są białka, zwane laminami jądrowymi, należące do rodziny białek filamentów pośrednich [37, 41, 45, 59, 65, 73, 86, 88, 107]. Lamininy występują powszechnie w komórkach eukariotycznych; oprócz kręgowców stwierdzono je m.in. w komórkach bruzdnic, drożdży, roślin wyższych [90]. W blaszce jądrowej komórek kręgowców wyróżniono lamininy A, B1, B2, B3 i C. Lamininy B1 i B2 występują wyłącznie w komórkach somatycznych, natomiast lamininy B3 są specyficzne dla plemników.

Błaszka jądrowa jest ściśle zespolona z błoną wewnętrzną osłonki jądrowej. Za integrację obu tych struktur odpowiedzialne są specyficzne białka zlokalizowane w wewnętrznej błonie jądrowej [8, 9, 34, 117, 132]. Do białek tych, określanych jako LAP (ang. *lamin-associated proteins*), należą m.in.: p55 [117], p58, zwane też LBR (ang. *Lamin B Receptor*) [8, 9, 132, 133, 136] oraz LAP 1A, 1B, 1C i LAP2 [34]. Badania w warunkach *in vitro* wykazały, że N-terminalna domena białka p58 łączy się z laminą B, a także z DNA, co wskazuje, że białko to wnika w głąb nukleoplazmy [136].

Błaszka jądrowa jest strukturą dynamiczną. Świadczy o tym nie tylko jej aktywny udział w procesie podziału jądra komórkowego (patrz podrozdział „Osłonka jądrowa w czasie podziału jądra komórkowego”), ale także mobilność budujących ją lamin w czasie interfazy. Jak wykazano, lamininy tworzą na terenie nukleoplazmy niewielkie skupienia (ang. *foci*) [77, 87, 116], które występują najliczniej we wczesnej fazie G₁ oraz w środkowej części fazy S [18, 52, 87]. W fazie G₁ skupienia te zawierają lamininy A i C i najprawdopodobniej są zaangażowane w reorganizację chromatyny [18, 52], natomiast w fazie S tworzą je głównie lamininy B związane z replikacją DNA [87, 88]. Udział lamin B w procesie replikacji potwierdza fakt wiązania się tych białek z tzw. sekwencjami MAR (ang. *Matrix-Attached Region*) – specyficznymi sekwencjami nukleotydowymi uważanymi za miejsca inicjujące replikację DNA [74, 75].

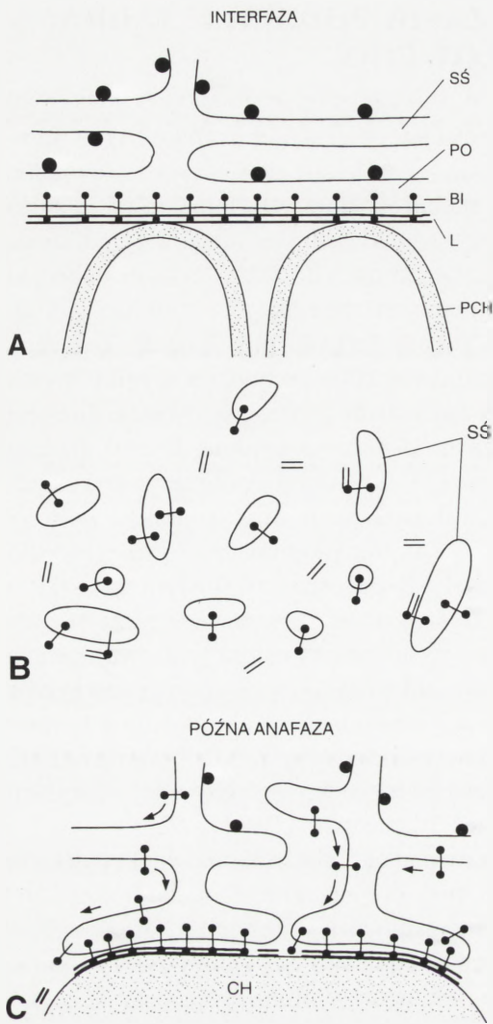
Według niektórych autorów skupienia lamin w nukleoplazmie jąder interfazowych reprezentują również miejsca, w których prawdopodobnie odbywa się posttranslacyjna modyfikacja tych białek, poprzedzająca wbudowywanie ich w blaszkę jądrową [18, 52, 88].

OSŁONKA JĄDROWA W CZASIE PODZIAŁU JĄDRA KOMÓRKOWEGO

W stadium profazy, błony osłonki jądrowej w większości komórek eukariotycznych ulegają dezintegracji, przekształcając się w liczne pęcherzyki i niewielkie cysterny. Struktury te są morfologicznie nieodróżnialne od elementów siateczki śródplazmatycznej, która podobnie jak błony osłonki jądrowej ulega w tym okresie rozpadowi [129]. Dezintegracja błon osłonki jądrowej (a także cystern siateczki śródplazmatycznej) umożliwi przekazanie materiału tworzącego te struktury jądom i cytoplazmie komórek potomnych [129]. Proces rozpadu błon osłonki związany jest z depolimeryzacją filamentów blaszki jądrowej, która zachodzi w wyniku hiperfosforylacji tworzących ją lamin [97]. Za ten ostatni proces odpowiedzialna jest kinaza białkowa fazy M, zwana też MPF (ang. *M-phase-promoting factor*), będąca kluczowym regulatorem cyklu komórkowego [28, 94, 108]. Depolimeryzacja składników blaszki jądrowej pociąga za sobą jej dezintegrację oraz demontaż JKP. W wyniku rozpadu blaszki jądrowej, laminy A i C tracą kontakt z błonami osłonki i są uwalniane do cytosolu, natomiast laminy B pozostają w ścisłym związku z ich fragmentami [19, 43, 72].

Podczas późnej anafazy rozpoczyna się proces odbudowy osłonki jądrowej; polega on na wiązaniu się lamin oraz elementów siateczki śródplazmatycznej (pęcherzyków i krótkich cystern) z powierzchnią ulegających dekondensacji chromosomów; równocześnie, w odtwarzającą się osłonkę wbudowywane zostają JKP. Odbudowa blaszki jądrowej jest procesem odwrotnym do procesu jej rozpadu i polega na defosforylacji lamin, a następnie ich polimeryzacji w sieć filamentów [19, 47, 52].

Pomimo iż wiedza na temat mechanizmu rozpadu i rekonstrukcji osłonki jądrowej znacznie wzbogaciła się w ostatnich latach, niektóre zagadnienia nadal budzą kontrowersje wśród badaczy. Jednym z takich zagadnień jest kolejność, w jakiej formowane są poszczególne składniki osłonki podczas jej odbudowy. Wyniki niektórych badań sugerują, iż wiązanie się elementów błoniastych osłonki z powierzchnią chromosomów, a następnie ich fuzja w kompletną osłonkę, poprzedzone jest wiązaniem się lamin z chromosomami [19, 47, 126]. Zgodnie z modelem zaproponowanym przez Burke i Gerace [20], w pierwszym etapie, na powierzchni chromosomów skupiają się laminy A i C, a następnie laminy B (wraz z pozostającymi z nimi w kontakcie fragmentami siateczki śródplazmatycznej). Inne obserwacje [15, 16, 23, 92] z kolei sugerują, iż rekonstrukcja błon osłonki jądrowej może zachodzić przed rozpoczęciem repolimeryzacji blaszki jądrowej. Wyniki badań przeprowadzonych ostatnio przez Yang i wsp. [135] z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej, przemawiają za pierwszą z koncepcji. Badania ich dowodzą, iż rekonstrukcja osłonki jądrowej rozpoczyna się repolimeryzacją lamin na powierzchni chromosomów, co zapewnia powstanie miejsc wiążących dla białek integralnych



Rys. 3. Model przedstawiający zachowanie się białek integralnych błony jądrowej wewnętrznej podczas podziału jądra komórkowego: A – interfaza; białka integralne (BI) związane są z laminami (L) blaszki jądrowej i pętlami chromatyny (PCH); SS – siateczka śródplazmatyczna; B – w wyniku dezintegracji osłonki jądrowej, białka integralne ulegają rozproszeniu w błonach siateczki śródplazmatycznej; C – późna anafaza; proces odbudowy osłonki jądrowej; białka integralne zostają wyselekcjonowane i drogą dyfuzji, przez system błon siateczki śródplazmatycznej, przemieszczają się na powierzchnię dekondensujących się chromosomów (CH), gdzie wiążą się z laminami oraz chromatyną (wg Yang i wsp. [135] nieco zmienione)

wchodzących w skład błony jądrowej wewnętrznej (np. LAP1, LAP2, p58/LBR).

Innym kontrowersyjnym zagadnieniem są losy białek wchodzących w skład błon osłonki jądrowej po ich rozpadzie w czasie profazy dzielącego się jądra. Według [23, 76] białka te akumulowane są wewnątrz rozmaitych subpopulacji pęcherzyków powstających w rezultacie rozpadu błon osłonki. Podczas rekonstrukcji jąder potomnych, pęcherzyki te wiążą się z powierzchnią chromosomów inicjując odtworzenie osłonek jądrowych. Za takim przebiegiem zdarzeń przemawiają losy dwóch badanych białek: gp210 i p58/LBR [23]. Białka te, w wyniku rozpadu osłonki jądrowej, są segregowane do dwóch różnych subpopulacji pęcherzyków. Podczas rekonstrukcji osłonki jądrowej pęcherzyki te (wraz z zawartymi w nich białkami) wiążą się w różnym czasie z dekondensującymi się chromosomami: w anafazie, pęcherzyki zawierające białko p58/LBR, natomiast podczas telofazy i cytokinezy pęcherzyki, które są nośnikami białka p58/LBR. Z kolei, inne dane [15, 135] wskazują, że białka błon osłonki jądrowej nie gromadzą się w wyodrębnionych grupach pęcherzyków pochodzących z ich rozpadu, lecz ulegają rozproszeniu w błonach siateczki śródplazmatycznej dzielącej się komórki (rys. 3B). Podczas odbudowy osłonki, zostają one wyselekcjonowane spośród innych białek siateczki i przemieszczone drogą dyfuzji do błon siateczki związanych już z powierzchnią dekondensujących się chromosomów, gdzie wiążą się z laminami lub chro-

matyną (rys. 3C). Powyższe fakty są wyraźnym dowodem na to, iż błony osłonki jądrowej, po ich degradacji w profazie, tracą swoją tożsamość jako wyspecjalizowana część siateczki śródplazmatycznej.

U wielu niższych *Eukaryota* (np. niektóre pierwotniaki i glony), osłonka jądrowa podczas podziału jądra nie ulega rozpadowi (tzw. mitozą zamkniętą) [58, 111, 121]. W takim przypadku, po rozdzieleniu chromosomów potomnych, jądro ulega przewężeniu w płaszczyźnie równikowej, co w efekcie prowadzi do pęknięcia osłonki jądrowej na dwie części, z których każda otacza jedno z dwóch jąder potomnych.

PODZIĘKOWANIE

Szłam serdeczne podziękowanie Panu prof. dr hab. Szczepanowi Bilińskiemu za wnikliwą korektę manuskryptu, wiele cennych uwag, dzięki którym treść pracy znacznie zyskała na zwięzłości i jasności oraz Pani mgr Władysławie Jankowskiej za wykonanie rysunków.

LITERATURA

- [1] ADAM JH, ADAM SH. Identification of cytosolic factors required for nuclear localization sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1994; **125**: 547–555.
- [2] ADAM SA, GERACE L. Cytosolic proteins that specifically bind nuclear localization signals are receptors for nuclear import. *Cell* 1991; **66**: 837–847.
- [3] AEBI U, COHN JB, BUHLE L, GERACE L. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature (Lond.)* 1986; **323**: 560–564.
- [4] AGUTTER PS. *Between Nucleus and Cytoplasm*. Chapman and Hall 1991.
- [5] AKEY CW. Visualization of transport-related configurations of the nuclear pore transporter. *Biophys J* 1990; **58**: 341–355.
- [6] AKEY CW. The nuclear pore complex: a macromolecular transporter. [w] Feldheer C [red.] *Nuclear Trafficking*. New York: Academic Press 1992: 31–70.
- [7] AKEY CW, RADERMACHER M. Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J Cell Biol* 1993; **122**: 1–19.
- [8] APPELBAUM J, BLOBEL G, GEORGATOS SD. *In vivo* phosphorylation of the lamin B receptor. Binding of lamin B to its nuclear membrane is affected by phosphorylation. *J Biol Chem* 1990; **265**: 4181–4184.
- [9] BAILER SM, EPPENBERGER HM, GRIFFITHS G, NIGG EA. Characterization of a 54-kD protein of the inner nuclear membrane: evidence for cell cycle-dependent interaction with the nuclear lamina. *J Cell Biol* 1991; **114**: 389–400.
- [10] BASTOS R, LIN A, ENARSON M, BURKE B. Targeting and function in mRNA export of nuclear pore complex protein Nup 153. *J Cell Biol* 1996; **134**: 1141–1156.
- [11] BASTOS R, PANTÉ N, BURKE B. Nuclear pore complex proteins. *Int Rev Cytol* 1995; **162B**: 257–302.

- [12] BASTOS R, RIBAS DE POUPLANA L, ENARSON M, BODOOR K, BURKE B. Nup84, a novel nucleoporin that is associated with CAN/Nup214 on the cytoplasmic face of the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1997; **137**: 989–1000.
- [13] BATAILLÉ N, HELSER T, FRIED HM. Cytoplasmic transport of ribosomal subunits microinjected into the *Xenopus laevis* oocyte nucleus: A generalized, facilitated process. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1571–1582.
- [14] BELMONT AS, ZHAI Y, THILENIUS A. Lamin B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and electron microscopy tomography. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1671–1685.
- [15] BENAVENTE R. Postmitotic nuclear reorganization events analyzed in living cells. *Chromosoma* 1991; **100**: 215–220.
- [16] BENAVENTE R, SCHEER U, CHALY N. Nucleocytoplasmic sorting of macromolecules following mitosis: Fate of nuclear constituents after inhibition of pore complex function. *Eur J Cell Biol* 1989; **50**: 209–219.
- [17] BEREZNEY R, MORTILLARO MJ, MA H, WEI X, SAMARABANDU J. The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int Rev Cytol* 1995; **162A**: 1–65. P2
- [18] BRIDGER JM, KILL IR, O'FARRELL M, HUTCHINSON CJ. Internal lamin structures within G1 nuclei of human dermal fibroblasts. *J Cell Sci* 1993; **104**: 297–306.
- [19] BURKE B. On the cell-free association of lamins A and C with metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 1990; **186**: 169–176.
- [20] BURKE B, GERACE L. A cell-free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* 1986; **44**: 639–652.
- [21] BYRD D, SWEET DJ, PANTÉ N, KONSTANTINOV KN, GUAN T, SAPHIRE ACS, MITCHELL PJ, COOPER CS, AEBI U, GERACE L. A large coiled-coil protein whose amino-terminus is involved in activation of oncogenic kinases, is localized to the cytoplasmic surface of the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1994; **127**: 1515–1526.
- [22] CARMO-FONSECA M, CIDADAO AJ, DAVID-FERREIRA JF. Filamentous cross-bridges link intermediate filaments to the nuclear pore complexes. *Eur J Cell Biol* 1987; **45**: 282–290.
- [23] CHAUDHARY N, COURVALIN J-C. Stepwise reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *J Cell Biol* 1993; **122**: 295–306.
- [24] CORDES VC, REIDENBACH S, KOHLER A, STUURMAN N, VANDRIEL R, FRANKE WW. Intranuclear filaments containing a nuclear pore complex protein. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1333–1344.
- [25] DABAUVALLE M-C, LOOS K, SCHEER U. Identification of a soluble precursor complex essential for nuclear pore assembly *in vitro*. *Chromosoma* 1990; **100**: 56–66.
- [26] DARGEMONT C, KÜHN LC. Export of mRNA from microinjected nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Biol* 1992; **118**: 1–9.
- [27] DESSEV G. The nuclear lamina. An intermediate filament protein structure of the cell nucleus. [w] GOLDMAN RD, STEINERT PM [red.] *Cellular and Molecular Biology of Intermediate Filaments*. New York: Plenum Press 1990: 129–145.
- [28] DESSEV G, IOVCHEVA-DESSEV C, BISCHOFF JR, BEACH D, GOLDMAN R. A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes *in vitro*. *J Cell Biol* 1991; **112**: 523–533.
- [29] DINGWALL C, LASKEY R. Nuclear targeting sequences – a consensus? *Trends Biochem Sci* 1991; **16**: 478–481.
- [30] DINGWALL C, LASKEY R. The nuclear membrane. *Science (Wash. DC)* 1992; **258**: 942–947.
- [31] DREYFUSS G, MATUNIS MJ, PINOL-ROMA S, BURD CG. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 1993; **62**: 289–321.
- [32] FABRE E, HURT EC. Nuclear transport. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 335–342.

- [33] FINLAY DR, MEIER E, BRADLEY P, HORECKA J, FORBES DJ. A complex of nuclear pore proteins required for pore function. *J Cell Biol* 1991; **114**: 169–183.
- [34] FOISNER R, GERACE L. Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* 1993; **73**: 1267–1279.
- [35] FOISNER R, TRAUB P, WICHE G. Protein kinase A- and protein kinase C-regulated interaction of plectin with lamin B and vimentin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3812–3816.
- [36] FORBES DJ. Structure and function of the nuclear pore complex. *Annu Rev Cell Biol* 1992; **8**: 495–527.
- [37] FUCHS E, WEBER K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annu Rev Biochem* 1994; **63**: 345–382.
- [38] FURUKAWA K, PANTÉ N, AEBI U, GERACE L. Cloning of a cDNA for lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) and identification of regions that specify targeting to the nuclear envelope. *EMBO J* 1995; **14**: 1626–1636.
- [39] GARCIA-BUSTOS J, HEITMAN J, HALL MN. Nuclear protein localization. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1071**: 83–101.
- [40] GEORGATOS SD, BLOBEL G. Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1987; **105**: 117–125.
- [41] GEORGATOS SD, MEIER J, SIMOS G. Lamins and lamin-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 347–353.
- [42] GERACE L. Molecular trafficking across the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol* 1992; **4**: 637–645.
- [43] GERACE L, BLOBEL G. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 1980; **19**: 277–287.
- [44] GERACE L, BURKE B. Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol* 1988; **4**: 335–374.
- [45] GERACE L, FOISNER R. Integral membrane proteins and dynamic organization of the nuclear envelope. *Trends Cell Biol* 1994; **4**: 127–131.
- [46] GERACE L, OTTAVIANO Y, KONDOR-KOCH C. Identification of a major polypeptide of the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1982; **95**: 826–837.
- [47] GLASS JR, GERACE L. Lamins A and C bind and assemble at the surface of mitotic chromosomes. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1047–1057.
- [48] GLASS CA, GLASS JR, TANIURA H, HASEL KW, BLEVITT JM, GERACE L. The α -helical rod domain of human lamins A and C contains a chromatin binding site. *EMBO J* 1993; **12**: 4413–4424.
- [49] GOLDBERG MW, ALLEN TD. High resolution scanning electron microscopy of the nuclear envelope: demonstration of a new, regular, fibrous lattice attached to the baskets of the nucleoplasmic face of the nuclear pores. *J Cell Biol* 1992; **119**: 1429–1440.
- [50] GOLDIE KN, PANTÉ N, ENGEL A, AEBI U. Exploring native nuclear pore complex structure and conformation by scanning force microscopy in physiological buffers. *J Vac Sci Technol B* 1994; **12**: 1482–1485.
- [51] GOLDMAN AE, MAUL G, STEINERT PM, YANG H-Y, GOLDMAN RD. Keratin-like proteins that coisolate with intermediate filaments of BHK-21 cells are nuclear lamins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 3839–3943.
- [52] GOLDMAN AE, MOIR RD, MONTAG-LOWY M, STEWART M, GOLDMAN RD. Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1992; **119**: 725–735.
- [53] GÖRLICH D, PREHN S, LASKEY R, HARTMANN E. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* 1994; **79**: 767–778.
- [54] GUAN T, MÜLLER S, KLEIR G, PANTÉ N, BLEVITT JM, HÄNER M, PASCHAL B, AEBI U, GERACE L. Structural analysis of the p62 complex, an assembly of O-linked glycoproteins

- that localizes near the central gated channel of the nuclear pore complex. Submitted for publication. 1995; cyt. z [103].
- [55] GUDDAT U, BAKKEN AH, PIELER T. Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in *Xenopus* oocytes. *Cell* 1990; **60**: 619–628.
- [56] HALLBERG E, WOZNIAK RW, BLOBEL G. An integral membrane protein of the pore membrane domain of the nuclear envelope contains a nucleoporin-like region. *J Cell Biol* 1993; **122**: 513–521.
- [57] HALTIWANGER RS, BLOMBERG MA, HART GW. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-*N*-acetylglucosamine:polypeptide-*N*-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 1992; **267**: 9005–9013.
- [58] HEATH IB. Variant mitoses in lower eukaryotes: indicators of the evolution of mitosis? *Int Rev Cytol* 1980; **64**: 1–80.
- [59] HEINS S, AEBI U. Making heads and tails of intermediate filament assembly, dynamics and networks. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 25–33.
- [60] HINSHAW JE. Architecture of the nuclear pore complex and its involvement in nucleocytoplasmic transport. *Biochem Pharmacol* 1994; **47**: 15–20.
- [61] HINSHAW JE, CARRAGHER BO, MILLIGAN RA. Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* 1992; **69**: 1133–1141.
- [62] HÖGER TH, KROHNE G, KLEINSCHMIDT JA. Interaction of *Xenopus* lamins A and LII with chromatin *in vitro* mediated by a sequence element in the carboxyterminal domain. *Exp Cell Res* 1991; **197**: 280–289.
- [63] HOLT GD, SNOW CM, SENIOR A, HALTIWANGER RS, GERACE L, HART GW. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J Cell Biol* 1987; **104**: 1157–1164.
- [64] HORST A. Przepływ substancji pomiędzy cytoplazmą a jądrem komórkowym. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 335–356.
- [65] HUTCHISON CJ, BRIDGER JM, COX LS, KILL IR. Weaving a pattern from disparate threads: Lamin function in nuclear assembly and DNA replication. *J Cell Sci* 1994; **107**: 3259–3269.
- [66] IMAMOTO N, MATSUOKA Y, KURIHARA T, KOHNO K, MIYAGI M, SAKIYAMA F, OKADA Y, TSUNASAWA S, YONEDA Y. Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins. *J Cell Biol* 1992; **119**: 1047–1061.
- [67] IZAURRALDE E, MATTAJ IW. Transport of RNA between nucleus and cytoplasm. *Semin Cell Biol* 1992; **3**: 279–288.
- [68] JARMOLOWSKI A, BOELEN WC, IZAURRALDE E, MATTAJ IW. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J Cell Biol* 1994; **124**: 627–635.
- [69] JARNIK M, AEBI U. Toward a more complete 3-D structure of the nuclear pore complex. *J Struct Biol* 1991; **107**: 291–308.
- [70] JONES JCR, GOLDMAN AE, YANG H-Y, GOLDMAN RD. The organizational fate of intermediate filament networks in two epithelial cell types during mitosis. *J Cell Biol* 1985; **100**: 93–102.
- [71] 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.
- [72] KROHNE G, WAIZENEGGER I, HÖGER TH. The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1989; **109**: 2003–2011.
- [73] LOURIM D, KROHNE G. Lamin-dependent nuclear envelope reassembly following mitosis. *Trends Cell Biol* 1994; **4**: 314–318.

- [74] LUDÉRUS MEE, den BLAAUWEN JL, deSMIT, OJ, COMPTON DA, van DRIEL R. Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 6297–6305.
- [75] LUDÉRUS MEE, de GRAAFA, MATTIA E, den BLAAUWEN JL, GRANDE MA, de JONG L, van DRIEL R. Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* 1992; **70**: 949–959.
- [76] MAISON C, HORSTMANN H, GEORGATOS SD. Regulated docking of nuclear membrane vesicles to vimentin filaments during mitosis. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1491–1505.
- [77] MANCINI MA, SHAN B, NICKERSON JA, PENMAN S, LEE WH. The retinoblastoma gene product is a cell cycle dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 418–422.
- [78] MARTIN L, CRIMAUDDO C, GERACE L. cDNA cloning and characterization of lamina-associated polypeptide 1C (LAP1C), an integral protein of the inner nuclear membrane. *J Biol Chem* 1995; **270**: 8822–8828.
- [79] MATTAJ IW, BOELENS W, IZAURRALDE E, JARMOŁOWSKI A, KAMBACH C. Nucleocytoplasmic transport and snRNP assembly. *Mol Biol Rep* 1993; **18**: 79–83.
- [80] MAUL GG. Nuclear pore complexes: Elimination and reconstruction during mitosis. *J Cell Biol* 1977; **74**: 492–500.
- [81] McKEON F. Nuclear lamin proteins: Domains required for nuclear targeting, assembly and cell-cycle-regulated dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 1991; **3**: 82–86.
- [82] MEHLIN H, DANEHOLT B, SKOGLUND U. Translocation of a specific premessenger ribonucleoprotein particle through the nuclear pore studied with electron microscope tomography. *Cell* 1992; **69**: 605–613.
- [83] MEIER J, CAMPBELL KH, FORD CC, STICK R, HUTCHISON CJ. The role of lamin LIII in nuclear assembly and DNA replication, in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* 1991; **98**: 271–279.
- [84] MELCHIOR F, GERACE L. Mechanisms of nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 310–318.
- [85] MELCHIOR F, PASCHAL B, EVANS J, GERACE L. Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1649–1659.
- [86] MOIR, RD, GOLDMAN RD. Lamin dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 408–411.
- [87] MOIR RD, MONTAG-LOWY M, GOLDMAN RD. Dynamic properties of nuclear lamins: Lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol* 1994; **125**: 1201–1212.
- [88] MOIR RD, SPANN TP, GOLDMAN RD. The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. *Int Rev Cytol* 1995; **162B**: 141–182.
- [89] MOORE MS, BLOBEL G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature (London)* 1993; **365**: 661–663.
- [90] MORENO DIAZ DE LA ESPINA S. Nuclear matrix isolated from plant cells. *Int Rev Cytol* 1995; **162B**: 75–139.
- [91] NEWMAYER DD. The nuclear pore complex and nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 395–707.
- [92] NEWPORT JW, WILSON KL, DUNPHY WG. A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol* 1990; **111**: 2247–2259.
- [93] NICKERSON JA, BLENCOWE BJ, PENMAN S. The architectural organization of nuclear metabolism. *Int Rev Cytol* 1995; **162A**: 67–123.
- [94] NIGG EA. Nuclear function and organization: The potential of immunochemical approaches. *Int Rev Cytol* **110**: 27–92.
- [95] NIGG EA. Assembly-disassembly of the nuclear lamina. *Curr Opin Cell Biol* 1992a; **4**: 105–109.
- [96] NIGG EA. Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. *Semin Cell Biol* 1992b; **3**: 245–253.

- [97] OTTAVIANO Y, GERACE L. Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis. *J Biol Chem* 1985; **260**: 624–632.
- [98] PADAN R, NAINUDEL-EPSTEYN S, GOITEIN R, FAINSOD A, GRUENBAUM Y. Isolation and characterization of the *Drosophila* nuclear envelope otefin cDNA. *J Biol Chem* 1990; **265**: 7808–7813.
- [99] PADDY MR, BELMONT AS, SAUMWEBER H, AGARD DA, SEDAT JW. Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery. *Cell* 1990; **62**: 89–106.
- [100] PANTÉ N, AEBI U. The nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1993; **122**: 977–984.
- [101] PANTÉ N, AEBI U. Towards understanding the three-dimensional structure of the nuclear pore complex at the molecular level. *Curr Opin Struct Biol* 1994a; **4**: 187–196.
- [102] PANTÉ N, AEBI U. Toward the molecular details of the nuclear pore complex. *J Struct Biol* 1994b; **113**: 179–189.
- [103] PANTÉ N, AEBI U. Toward a molecular understanding of the structure and function of the nuclear pore complex. *Int Rev Cytol* 1995; **162B**: 225–255.
- [104] PANTÉ N, AEBI U. Sequential binding of import ligands to distinct nucleopore regions during their nuclear import. *Science* 1996; **273**: 1729–1732.
- [105] PANTÉ N, BASTOS R, McMORROW I, BURKE B, AEBI U. Interactions and three-dimensional localization of a group of nuclear complex proteins. *J Cell Biol* 1994; **126**: 603–617.
- [106] PAINE PL, MOORE LC, HOROWITZ SB. Nuclear envelope permeability. *Nature (London)* 1975; **254**: 109–114.
- [107] PARRY DAD, STEINERT PM. Intermediate filament structure. *Curr Opin Cell Biol* 1992; **4**: 94–98.
- [108] PETER M, HEITLINGER E, HANER M, AEBI U, NIGG EA. Disassembly of *in vitro* formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase. *EMBO J* 1991; **10**: 1535–1544.
- [109] PETER M, NAKAGAWA J, DORÉE M, LABBÉ JC, NIGG EA. *In vitro* disassembly of the nuclear lamina and M-phase specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 1990; **61**: 591–602.
- [110] PRUSCHY M, JU Y, SPITZL, CARAFOLIE, GOLDFARB DS. Facilitated nuclear transport of calmodulin in tissue culture cells. *J Cell Biol* 1994; **127**: 1527–1536.
- [111] RAIKOV IB. The Protozoan Nucleus. Morphology and Evolution. *Cell Biology Monographs* 1982; **9**.
- [112] REICHEL T, HOLZENBURG A, BUHLE EL, JARNIK M, ENGEL A, AEBI U. Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex, and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* 1990; **110**: 883–894.
- [113] ROUT MP, BLOBEL G. Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1993; **123**: 771–783.
- [114] ROUT MP, WENTE SR. Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol* 1994; **4**: 357–365.
- [115] SARRIA AJ, LIEBER JG, NORDEEN SK, EVANS RM. The presence or absence of a vimentin-type intermediate filament network affects the shape of the nucleus in human SW-13 cells. *J Cell Sci* 1994; **107**: 1593–1607.
- [116] SASSEVILLE AM-J, RAYMOND Y. Lamin A precursor is localized to intranuclear foci. *J Cell Sci* 1995; **106**: 273–285.
- [117] SENIOR A, GERACE L. Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *J Cell Biol* 1988; **107**: 2029–2036.
- [118] SHI Y, THOMAS YO. The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytoplasmic cognate. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 2186–2192.
- [119] SILVER PA. How proteins enter the nucleus. *Cell* 1991; **64**: 489–497.
- [120] SOULLAN B, WORMAN HJ. The amino-terminal domain of the lamina B receptor is a nuclear envelope targeting signal. *J Cell Biol* 1993; **120**: 1093–1100.

- [121] SOUTH GR, WHITTICK A. Introduction to Phycology. Blackwell Scientific Publications. 1987.
- [122] STERNE-MARRR, BLEVITT JM, GERACE L. O-linked glycoproteins of the nuclear pore complex interact with a cytosolic factor required for nuclear protein import. *J Cell Biol* 1992; **116**: 271–280.
- [123] STEWART M, WHYTOCK S, MOIR RD. Nuclear envelope dynamics and nucleocytoplasmic transport. *J Cell Sci Suppl* 1991; **14**: 79–82.
- [124] SUKEGAWA J, BLOBEL G. A nuclear pore complex protein that contains zinc finger motifs, binds DNA, and faces the nucleoplasm. *Cell* 1993; **72**: 29–38.
- [125] TANIURA H, GLASS C, GERACE L. A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J Cell Biol* 1995; **131**: 33–44.
- [126] ULITZUR N, HAREL A, FEINSTEIN N, GRUENBAUM Y. Lamin activity is essential for nuclear envelope assembly in a *Drosophila* embryo cell-free extract. *J Cell Biol* 1992; **119**: 17–25.
- [127] van DEURSEN J, BOER J, KASPER L, GROSVELD G. G₂ arrest and impaired nucleocytoplasmic transport in mouse embryos lacking the protooncogene CAN/Nup214. *EMBO J* 1996; **15**: 5574–5583.
- [128] VORBTODT A, MAUL GG. Cytochemical studies on the relation of nucleoside triphosphatase activity to ribonucleoproteins in isolated rat liver nuclei. *J Histochem Cytochem* 1980; **28**: 27–35.
- [129] WARREN G, WICKNER W. Organelle inheritance. *Cell* 1996; **84**: 395–400.
- [130] WIESE C, WILSON KL. Nuclear membrane dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 387–394.
- [131] WILKEN N, KOSSNER U, SENECAJL, SCHEER U, DABAUVALLE MC. Nup180, a novel nuclear pore complex protein localizing to the cytoplasmic ring and associated fibrils. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1345–1354.
- [132] WORMAN HJ, EVANS CD, BLOBEL G. The lamina B receptor of the nuclear envelope inner membrane: a polytopic protein with eight potential transmembrane domains. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1535–1542.
- [133] WORMAN HJ, YUAN J, BLOBEL G, GEORGATOS SD. A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 8531–8534.
- [134] WOŹNIAK RW, BARTNIK E, BLOBEL G. Primary structure analysis of an integral membrane glycoprotein of the nuclear pore. *J Cell Biol* 1989; **108**: 2083–2092.
- [135] YANG L, GUAN T, GERACE L. Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *J Cell Biol* 1997; **137**: 1199–1210.
- [136] YE Q, WORMAN HJ. Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem* 1994; **269**: 11306–11311.
- [137] YE Q, WORMAN HJ. Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to *Drosophila* HP1. *J Biol Chem* 1996; **271**: 14653–14656.
- [138] YUAN J, SIMOS G, BLOBEL G, GEORGATOS SD. Binding of lamin A to polynucleosomes. *J Biol Chem* 1991; **266**: 9211–9215.

Adres autora: ul. R. Ingardena 6, 30-060 Kraków

MODELOWANIE DNA W JĄDRACH LIMFOCYTÓW

DNA MODELLING IN THE NUCLEI OF LYMPHOCYTES

BARBARA PŁYTYCZ

Zakład Immunobiologii Ewolucyjnej Instytutu Zoologii UJ, Kraków

Streszczenie: Limfocyty definiujemy jako komórki mające receptory specyficzne dla antygenów, kodowane przez ulegające rearanzacji geny $V(D)J$. Receptory te są z reguły heterodimerami zbudowanymi z łańcuchów α/β lub γ/δ (w receptorach TcR limfocytów T), bądź H/L (w receptorach Ig limfocytów B). Każdy łańcuch składa się z dwóch lub większej liczby (w łańcuchach H) domen. Zewnętrzne domeny heterodimerów są niezwykle zmienne dzięki specyficznemu dla limfocytów procesowi somatycznej rekombinacji genów $V-J$ i $V-D-J$. Część stała łańcucha H receptora Ig kodowana jest przez liczne zespoły genów (u ssaków $\mu, \delta, \gamma, \epsilon$ i α), ulegające rekombinacjom w ontogenezie limfocytów B, co prowadzi do zmiany klas immunoglobulin. Limfocyty z receptorami kodowanymi przez geny $V(D)J$ występują u wszystkich kręgowców zuchwowych. Nie udało się jeszcze wykryć genów $V(D)J$ u bezzuchwoców (minogów i śluzic), choć mają one komórki o morfologii limfocytów i plazmocytów.

Słowa kluczowe: limfocyty, receptory limfocytów, rekombinacje somatyczne, immunoglobuliny, filogeneza odporności

Summary: The lymphocytes are defined as cells with antigen-specific receptors encoded by rearranged $v(D)j$ genes. The receptors are as a rule heterodimers consisting of α/β or γ/δ chains (in T-lymphocyte TcR receptors) and H/L chains (in B-lymphocyte Ig receptors), each chain consisting of two or more (H) domains. The external domains of heterodimers are extremely variable due to the the lymphocyte-specific process of somatic recombination of $V-J$ and $V-D-J$ genes. Constant parts of H chains of Ig are encoded by several gene clusters ($\mu, \delta, \gamma, \epsilon$ and α in mammals) which recombine during the B lymphocyte ontogeny leading to Ig class changes. The cells (lymphocytes) with $V(D)J$ -encoded receptors are present in all jawed vertebrates. Attempts to find the cells with the rearranged $V(D)J$ genes in jawless vertebrates (lampreys and catfish) failed so far despite the presence of cells with morphology of lymphocytes and plasmocytes.

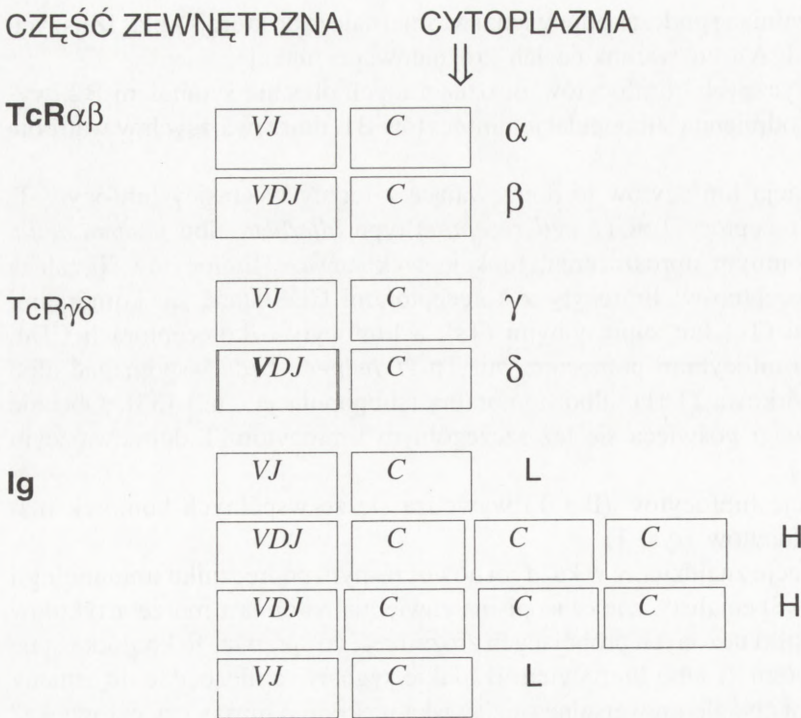
Key words: lymphocytes, lymphocyte receptors, somatic recombinations, immunoglobulins, phylogeny of immunity

Nowoczesna definicja limfocytów określa je jako komórki o receptorach dla antygenów. Receptory te są kodowane drogą rearanzacji genów $V(D)J$. Tak zdefiniowane limfocyty występują jedynie u kręgowców, u których rekombinacje somatyczne genów VJ lub VDJ zapewniają praktycznie nieograniczoną różnorodność receptorów, a co za tym idzie – rozróżnianie nieograniczonej liczby antygenów i specyfikę reakcji odpornościowych. Rekombinacje somatyczne warunkujące powstanie genów dla receptorów limfocytów mają unikatowy charakter, dlatego proces modelowania DNA na potrzeby układu odpornościowego zdecydowałam się nazywać terminem „rearanzacja genetyczna”. Receptory dla antygenów kodowane w sposób „tradycyjny” są natomiast bez wątpienia rozpowszechnione u wszystkich zwierząt wielokomórkowych, gdyż właśnie dzięki nim komórki źerne potrafią rozpoznać i usunąć drobnoustroje oraz uszkodzone lub stare komórki własne, nie naruszając prawidłowych struktur danego organizmu [2, 47].

1. RODZAJE I FUNKCJE LIMFOCYTÓW

Dany limfocyt ma tylko jeden rodzaj receptorów dla antygenów, jednakże ogromna liczba potencjalnych konfiguracji receptorów powoduje, że praktycznie każdy limfocyt może mieć receptory dla innego antygenów. W naszym organizmie limfocyty krążą w krwi i limfie między wyspecjalizowanymi narządami limfatycznymi, a także zasiedlają skórę i jelito. W stanie spoczynku są to niepozorne komórki (z dużym, homogennym jądrem i wąskim rąbkiem cytoplazmy), które po napotkaniu swoistego antygenów i uzyskaniu dodatkowych sygnałów proliferują, co prowadzi do powstania klonów komórek o identycznych receptorach. Część z nich staje się komórkami pamięci immunologicznej, dzięki którym kolejna inwazja takiego samego drobnoustroju będzie wykryta i zwalczona szybciej, a część limfocytów potomnych będzie pełnić funkcje wykonawcze.

Jeśli aktywacji ulegnie limfocyt B (dojrzewający z reguły w szpiku) – komórkami wykonawczymi będą duże plazmocyty o jądrami z charakterystycznie „szprychowato” umieszczoną chromatyną i obfitej cytoplazmie z bardzo rozbudowaną szorstką siateczką plazmatyczną, co jest morfologicznym wykładnikiem syntezy białek na eksport. Białkami tymi są przeciwciała (immunoglobuliny, Ig), będące rozpuszczalną formą receptorów Ig limfocytów B, uczestniczące w tzw. odporności humoralnej. Podczas pierwszej „potyczki” z antygenem, stężenie przeciwciał (zazwyczaj ciężkich pentamerów klasy IgM) rośnie powoli i dość szybko spada. W czasie inwazji wtórnej zawartość przeciwciał w surowicy rośnie bardzo szybko i długo utrzymuje się na wysokim poziomie. Oprócz takiej zmiany ilościowej zachodzi też zmiana jakości przeciwciał, gdyż zostają wyselekcjonowane przeciwciała najlepiej dopasowane do danego antygenów (co określa się terminem „dojrzewania” przeciwciał). Co więcej,



Rys. 2. Schemat budowy i kodowania (przez geny *VDJC*) receptorów Ig i TcR, strzałka pokazuje miejsce zakotwiczenia receptora w błonie cytoplazmatycznej

2.1. Receptory limfocytów T

Receptory limfocytów T $\alpha\beta$ składają się z dwudomenowych łańcuchów *alfa* i *beta* (TcR $\alpha\beta$), a limfocytów T $\gamma\delta$ – z dwudomenowych łańcuchów *gamma* i *delta* (TcR $\gamma\delta$) (rys. 2).

2.2. Receptory limfocytów B

Receptory na limfocytach B są immunoglobulinami (Ig) powierzchniowymi tych komórek. Są one zbudowane z dwóch identycznych łańcuchów ciężkich (H) zakotwiczonych w błonie komórkowej oraz przyłączonych do nich dwóch identycznych łańcuchów lekkich (L). Schemat budowy takiej Y-kształtnej cząsteczki opisuje więc wzór LH-HL (rys. 2). Jedno przeciwciało ma dwa miejsca wiążące antygen, w częściach LH oddalonych od błony komórkowej.

U ssaków występują tylko dwa rodzaje łańcuchów lekkich IgL: *kappa* (κ) lub *lambda* (λ). Dana komórka produkuje więc przeciwciała o strukturze κ H-H κ albo

λ H-H λ . Ssaki charakteryzuje natomiast większa liczba rozmaitych łańcuchów ciężkich Ig (IgH), na podstawie których wyodrębniamy różne klasy przeciwciał: IgM (z łańcuchami *mi*), IgG (*gamma*), IgD (*delta*), IgA (*alfa*), oraz IgE (*epsilon*); wśród nich można wyróżnić jeszcze podklasy różniące się w szczegółach struktury i funkcji. Przeciwciała uwalniane przez plazmocyty są nieco zmodyfikowanymi receptorami tych komórek.

3. KODOWANIE RECEPTORÓW LIMFOCYTÓW

Część wiążąca antygen każdego receptora składa się z domen zewnętrznych dwóch łańcuchów, z których jedna jest kodowana przez trzy geny (*VDJ*), a druga tylko przez dwa geny (*VJ*). Geny *VDJ* kodują część zmienną łańcuchów IgH, TcR β i TcR δ , a geny *VJ* – część zmienną łańcuchów Ig κ , Ig λ , TcR α , TcR γ (rys. 2).

Genetyczne podłoże różnorodności receptorów dla antygenów zostało odkryte dzięki badaniom zespołu S. Tonegawy. Okazało się, że stosunkowo niewielka liczba genów *VJ* lub *VDJ* podlegających rekombinacjom somatycznym może kodować ogromną liczbę receptorów. Uczony ten uhonorowany został w roku 1987 nagrodą Nobla [57].

3.1. Istota rearanzacji genetycznej

W ogromnym uproszczeniu istotę tego zjawiska przedstawia fikcyjny przykład (rys. 3).

W DNA linii zarodkowej jednego z chromosomów (A) znajduje się np. 10 genów *V* (*V1-V10*) i 4 geny *J* (*J1-J4*). W DNA komórki, która stanie się limfocyt, jeden z genów *V* połączy się z jednym z genów *J*. W naszym przykładzie w jednej komórce (limfocyt 1) „skleją się” geny *V3* z *J2*, a w innej (limfocyt 2) *V9* z *J3*. Białko *V3J2* będzie inne niż białko *V9J3*.

Na innym chromosomie (B), w DNA linii zarodkowej znajduje się zestaw 5 genów *V*, 3 geny *D* i 5 genów *J*. W DNA komórki, która stanie się limfocyt, najpierw jeden z genów *D* sklei się z jednym z genów *J*, a potem do takiego zestawu *DJ* przyłączy się jeden z genów *V*. Ze względu na losowość tych procesów, w jednej komórce powstanie kompleks np. *V2D1J4*, a w drugiej *V5D2J2*, co doprowadzi do powstania różnych białek [29].

3.2. Genetyczne podłoże różnorodności receptorów

Wyobraźmy sobie, że na nici DNA mamy 100 różnych genów *V* oraz 5 różnych genów *J*. Dzięki ich rearanzacji genetycznej (polegającej na losowym sklejeniu się jednego ze 100 genów *V* z jednym z 5 genów *J*), otrzymamy $100 \times 5 = 500$

CHROMOSOM A:

DNA linii zarodkowej
 --V1-V2-V3-V4-V5-V6-V7-V8-V9-V10----J1-J2-J3-J4--
 ↓↓

DNA limfocytu 1:
 --V1-V2-V3J2-J3-J4----

DNA limfocytu 2:
 --V1-V2-V3-V4-V5-V6-V7-V8-V9J3-J4--

CHROMOSOM B:

DNA linii zarodkowej:
 --V1-V2-V3-V4-V5----D1-D2-D3----J1-J2-J3-J4-J5--
 ↓↓

DNA limfocytu 1:
 --V1-V2-V3-V4-V5----D1J4-J5--
 ↓↓

DNA limfocytu 2:
 --V1-V2-V3-V4-V5----D1-D2J2-J3-J4-J5--
 ↓↓

--V1-V2D1J4-J5--

--V1-V2-V3-V4-V5D2J2-J3-J4-J5--

Rys. 3. Istota procesu rearanżacji genetycznej

różnych odcinków DNA (VJ). Tak więc na podstawie 105 genów syntetyzowanych powstaje aż 500 różnych białek. Przy takim „sklejaniu” materiału genetycznego często dochodzi do pomyłek na „złączach”, co zwiększa różnorodność. Może też dojść do wklejenia dodatkowych nowych (N) fragmentów DNA, co jeszcze bardziej zwiększy liczbę łańcuchów zmiennych.

Podobnie, wyobraźmy sobie, że fragment DNA kodujący część zmienną drugiego z łańcuchów receptora zawiera np. 200 genów V , 3 geny D i 10 genów J , co daje aż $200 \times 3 \times 10 = 6000$ różnych białek tylko w wyniku rearanżacji genetycznej, oczywiście również w tym przypadku zachodzą pomyłki na „złączach” i wklejanie nowych odcinków.

W rezultacie w danej komórce funkcjonować będzie heterodimer zbudowany z jednego spośród (co najmniej) 500 łańcuchów VJ , oraz jednego spośród (co najmniej) 6000 łańcuchów VDJ . Zatem dana komórka będzie miała jeden spośród $500 \times 6000 = 3000000$ (trzech milionów!) różnych receptorów. Jak już podkreślono, błędy na „złączach” i wklejanie nowych fragmentów DNA z wielokrotnia tę liczbę. Liczba receptorów ulegnie dalszemu zwiększeniu na skutek mutacji somatycznych.

Hunkapiller i Hood [25] wyliczyli, że potencjalna liczba różnych receptorów Ig przekracza 10^{18} , a liczba receptorów $TcR\alpha\beta$ teoretycznie może przekroczyć nawet 10^{22} !

3.3. Rola rekombinaz RAG-1 i RAG-2

Informacje o najnowszych osiągnięciach w dziedzinie badania rekombinacji genów $V(D)J$ znaleźć można w artykule M. Gellerta [14]. Rearanżacja genów $V(D)J$ wymaga aktywności specyficznych dla limfocytów białek – rekombinaz RAG-1 i RAG-2, które tną nić DNA [35, 56, 60]. Myszy pozbawione genów kodujących RAG-1 lub RAG-2 (ang. *recombination activating genes*) mają kompletnie zablokowany rozwój limfocytów T i B, co dowodzi, że rearanżacja genetyczna jest absolutnie niezbędna dla ich różnicowania [36, 37].

4. JAK KOMÓRKA STAJE SIĘ LIMFOCYTEM

W DNA każdej komórki organizmu ssaków znajdują się zestawy genów dla wszystkich łańcuchów budujących wszystkie rodzaje receptorów limfocytów: Ig (IgH, Ig λ , Ig κ), TcR $\alpha\beta$ (TcR α , TcR β) i TcR $\gamma\delta$ (TcR γ i TcR δ). Lokalizacje tych genów na poszczególnych chromosomach człowieka i myszy zobrazowano w tabeli 1 [20]. Limfocytem stanie się jednak tylko ta komórka, w której dokona się udana rearanżacja genów $V-D-J$ (dla IgH lub TcR β albo TcR δ) oraz $V-J$ (dla Ig λ lub Ig κ , albo TcR α lub TcR γ). Jeśli rearanżacja ta dotyczy genów dla IgH/Ig λ – komórka stanie się limfocytom B z receptorami IgH κ albo IgH λ . Rearanżacja genów TcR prowadzi do powstania limfocytu T, którym będzie limfocyt z receptorami TcR $\alpha\beta$ lub TcR $\gamma\delta$. Udana rearanżacja na jednym z chromosomów wyklucza rearanżację na chromosomie homologicznym, toteż dany limfocyt będzie miał tylko jeden rodzaj danego łańcucha.

W obrębie każdej linii komórkowej segmenty genów podlegają rearanżacji w określonym porządku. W limfocytach B najpierw podlega temu procesowi IgH, potem Ig κ , wreszcie Ig λ . W limfocytach T wcześniej TcR β niż TcR α [14, 29].

Nasuwa się pytanie, co wyzwala w komórce mechanizm rearanżacji genetycznej? Ponieważ transkrypcja niektórych genów $V-D-J$ zachodzi jeszcze przed rearanżacją [6], jedna z hipotez różnicowania się komórek w kierunku limfocytów zakłada, że właśnie transkrypcja genów linii zarodkowej lokalnie odsłania struktury chromatynowe udostępniając je dla działania rekombinaz [52]. Udokumentowano też, że czynnikiem niezbędnym dla zainicjowania rearanżacji genetycznej jest związenie

TABELA 1. Lokalizacja genów kodujących łańcuchy receptorów limfocytów człowieka i myszy [wg 20]

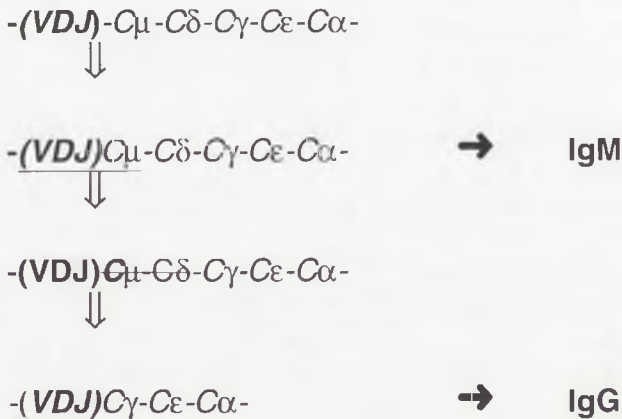
Łańcuch (geny)	Chromosom	
	człowieka	myszy
IgH ($V-D-J-C$)	14	12
Ig λ ($V-J-C$)	22	16
Ig κ ($V-J-C$)	2	6
TcR α ($V-J-C$)	14	14
TcR β ($V-D-J-C$)	7	6
TcR γ ($V-J-C$)	7	13
TcR δ ($V-D-J-C$)	14	14

receptorów dla jednej z cytokin – interleukiny 7 (IL-7) [7].

Rearanżacja genetyczna jest precyzyjnie regulowana. Pomimo że te same białka RAG-1 i RAG-2 funkcjonują w komórkach różnicujących się w kierunku limfocytów B i T, to geny Ig ulegają pełnej rearanżacji i ekspresji tylko w komórkach B, a geny dla TcR tylko w komórkach T. Rearanżacja genów TcR i dojrzewanie limfocytów T odbywa się głównie (choć nie wyłącznie) w grasicy, toteż w regulacji tych procesów uczestniczą zapewne czynniki kreujące specyficzne mikrośrodowisko tego narządu [5, 66]. Współczesny stan wiedzy o mikrośrodowisku, w którym dojrzewają limfocyty B, podsumowała ostatnio D. Opstelten [41].

5. ZMIANA KLASY PRZECIWCIAŁ

Najnowsze informacje o „przełączeniu” klas przeciwciał (ang. *antibody class switching*) podsumowane zostały w artykule J. Stavnezer [54]. Zmiana klasy przeciwciała jest procesem specyficznym dla łańcuchów ciężkich (H) limfocytów B, podczas którego geny *VDJ* tych łańcuchów połączone początkowo z genami kodującymi domeny stałe łańcucha *mi* ($C\mu$) (a więc kodujące immunoglobuliny IgM), „sklejają się” z genami kodującymi domeny stałe innego łańcucha, np. *gamma* ($C\gamma$), kodując immunoglobulinę IgG (rys. 4). Najczęściej odbywa się to przez „wypętlenie” i delecję fragmentu DNA zawartego między genami *VDJ* a genami dla nowego łańcucha ciężkiego (np. *gamma*) (rys. 4). Drugą możliwością jest połączenie genów *VDJ* z odpowiednimi genami *C* na chromosomie homologicznym.



Rys. 4. Istota zmiany klasy przeciwciała z IgM na IgG, geny podkreślone ulegają ekspresji, a geny przekreślone ulegają delecji (dalsze objaśnienia w tekście)

Dany limfocyt B podejmuje zatem syntezę innej niż dotąd części stałej łańcucha ciężkiego, bez zmiany części zmiennej tego łańcucha oraz bez żadnych zmian w łańcuchu lekkim. W rezultacie powstają immunoglobuliny o nie zmienionych miejscach wiążących antygen, lecz należące do innej klasy. Zmiana klasy przeciwciał z IgM (charakterystycznych dla wczesnych etapów odpowiedzi pierwotnej) prowadzi do pojawienia się wyspecjalizowanych przeciwciał IgG, IgE lub IgA.

Wiadomo, że wśród wielu sygnałów niezbędnych dla zmiany klasy przeciwciał kluczową rolę odgrywają interleukiny. Na przykład, czynnikiem włączającym (ang. *switch factor*) syntezę IgA jest IL-4 [40], IgG1 – IL-5 [30, 31], a IgG3 – IL-10 [51]. Jedną z hipotez zakłada, że niezbędnym warunkiem do zmiany klasy przeciwciał jest dostępność odpowiedniego fragmentu DNA [53]. Hipoteza ta oparta jest na obserwacji, że przełączenie w kierunku nowej klasy immunoglobulin (np. IgE) jest poprzedzone pojawieniem się RNA charakterystycznego dla IgE [9, 19, 54].

6. LIMFOCYTY W FILOGENEZIE ZWIERZĄT

6.1. Brak limfocytów u bezkręgowców

Poszukiwania genów dla receptorów Ig i TcR wśród przedstawicieli zwierząt bezkręgowych nie przyniosły rezultatów. Immunobiolodzy o nastawieniu ewolucyjnym są więc obecnie zgodni, że niewielkie komórki o wąskim rąbku cytoplazmy opisywane u przedstawicieli rozmaitych typów bezkręgowców jako limfocyty lub komórki podobne do limfocytów (ang. *lymphocyte-like*) nie mają z limfocytami nic wspólnego, z wyjątkiem podobieństwa morfologicznego. Należy jednak pamiętać, że bezkręgowce, obejmujące prawie 97% współczesnych gatunków zwierząt, mają znakomicie rozwinięte systemy odpornościowe pomimo braku limfocytów i przeciwciał [47].

6.2. Kręgowce: czy bezzuchwowce mają limfocyty?

U minogów i śluzic opisano komórki o morfologii limfocytów i komórek plazmatycznych [28, 63, 64], jednak nie odnaleziono u nich narządu odpowiadającego grasicy [65]. W surowicy opisano obecność białek przypominających przeciwciała, o nietypowej budowie, a mianowicie o dwóch różnych łańcuchach ciężkich połączonych z identycznymi łańcuchami lekkimi (a więc o schemacie LH1-H2L) [61]. Nie udało się natomiast u omówionych zwierząt wykryć odcinków DNA homologicznych do tych, jakie kodują receptory limfocytów kręgowców zuchwowych ani genów *RAG* [13]. Oczywiście, nie stanowi to dowodu na brak takich genów, jednak współczesny stan wiedzy nie upoważnia do stwierdzenia, że komórki bezzuchwowców o morfologii limfocytów są homologiczne do limfocytów zu-

chwowców. W konsekwencji nie możemy twierdzić, że minogi i śluzice mają rozwinięta adaptacyjną odporność swoistą z udziałem limfocytów i przeciwciał. Intensywne badania odporności tej zagadkowej grupy zwierząt trwają jednak nadal.

6.3. Kręgowce: limfocyty występują u wszystkich zuchwowców

Komórki o morfologii limfocytów oraz plazmocytów, a także krążące w krwi i limfie przeciwciała, wykrywa się u wszystkich badanych pod tym kątem gatunków kręgowców zuchwowych, a więc u ryb [32], płazów [24], gadów, ptaków [27] i ssaków [58]. U wszystkich wykryto też geny kodujące rekombinazy RAG-1 i RAG-2 [3, 17], geny kodujące immunoglobuliny [15, 16, 34, 42, 45] oraz geny dla receptorów TcR [8, 12, 43, 44, 48]. W tej sytuacji uwaga immunologów-ewolucjonistów skupia się na wykryciu elementów specyficznych dla poszczególnych jednostek systematycznych.

7. RECEPTORY LIMFOCYTÓW U NIŻSZYCH KRĘGOWCÓW

7.1. Unikatowość receptorów rekinów

Niezwykle przeciwciała wykryto u rekinów. Najbardziej unikatowe wśród nich są rozpuszczalne receptory oznaczone symbolem NAR (ang. *nurse shark new antigen receptors*) będące homodimerami dwóch łańcuchów ciężkich H-H, pozbawionymi łańcuchów lekkich [15]. Każda z dwóch identycznych części zmiennych tych przeciwciał jest w stanie samodzielnie „uchwycić” antygen [13], obalając tym samym dogmat, że antygen musi być ujęty w „szczypec” utworzone przez części zmienne łańcucha H i L. Okazało się więc, że łańcuch L nie jest niezbędny do funkcjonowania receptora. Przeciwciała pozbawione łańcucha lekkiego znajdują się też w surowicy niektórych ssaków, a mianowicie u wielbłądów [18].

7.2. Różnorodność przeciwciał u niższych kręgowców

Wbrew wcześniejszym poglądom, niższe kręgowce nie ustępują ssakom pod względem liczby klas przeciwciał. Do niedawna sądzono, że filogenetycznie najstarsze są przeciwciała IgM, obecne u wszystkich kręgowców. U poszczególnych gatunków wykrywano zazwyczaj jeszcze inne przeciwciała o mniejszej masie cząsteczkowej, opisywane jako IgX, IgY, IgR [23, 39, 42]. Ostatnio okazało się jednak, że ewolucyjnie najstarsze zuchwowce, a mianowicie ryby chrzęstnoszkieletowe mają ogromne bogactwo przeciwciał. Oprócz wspomnianych już niezwykle receptorów NAR [15] mają też przeciwciała NARC [16], bardziej klasyczne IgR/IgX i filo-

genetycznie wszechobecne IgM [59]. Zwraca też uwagę ogromny udział mutacji somatycznych w kształtowaniu repertuaru immunoglobulin ryb [13]. Niewielki repertuar przeciwciał i znikomy udział mutacji somatycznych opisano natomiast u płaza bezogonowego – płatanny (*Xenopus laevis*) [10, 11, 55, 62].

7.3. Różnorodność rozmieszczenia genów *V-D-J* w genomie kręgowców

Omówiony na początku zespół genów kodujących receptory występuje nie tylko u człowieka, lecz także u myszy, płatanny (płaza) i dorsza (ryby kostnoszkieletowej) (rys. 5). Odmienny układ genów opisano u ptaków i królika. W tym przypadku różnorodność nielicznych funkcjonujących genów *V* jest skutkiem konwersji z bardzo licznymi pseudogenami *ypsylon* (Ψ). Jak więc widać, sposób kodowania receptorów limfocytów nie koreluje z pozycją systematyczną zwierzęcia [11].

Najbardziej odległy od „ludzkiego” sposób kodowania receptorów limfocytów opisano u ryb chrzęstnoszkieletowych, które mają liczne zespoły genów *V-DD-J-C*, z których dana komórka „wybiera” jeden, ulegający następnie mutacjom somatycznym. Jeszcze bardziej zaskakujące było odkrycie, że liczne rejony *VDJ* są „sklejane” już w DNA linii zarodkowej [15, 42] (rys. 5). Zjawisko to jest uznane za

SSAKI (mysz, człowiek)

--V-V-V-V-V-V-V-V-V-V-V-V---D-D-D-D-D---J-J-J-J---C--

SSAKI (królik)

---V--- $\Psi\Psi\Psi\Psi\Psi\Psi\Psi\Psi\Psi$ --- V---D-D-D-D-D--- J-J-J-J-J---C

PTAKI (kura)

--- $\Psi\Psi\Psi\Psi\Psi\Psi\Psi\Psi\Psi$ --- V--- D-D-D--- J--- C

PŁAZY (płatanna)

---V-V-V-V-V-V-V-V-V-V-V-V--- D-D-D--- J-J-J--- C

RYBY KOSTNOSZKIELETOWE (dorsz)

---V-V-V-V-V-V-V-V-V-V-V-V-V-V-V---D-D-D--- J-J-J--- C

RYBY CHRZESTNOSZKIELETOWE (rekin)

---V--D-D-J-C- --V--D-D-J--C- --V-D-D-J--C-- ---VDD JC--

Rys. 5. Schemat rozmieszczenia genów *V, D, J* i pseudogenów Ψ (*ypsylon*) w genomie kilku gatunków kręgowców (wg [11] zmienione)

unikatowe wśród kręgowców, gdyż regułą jest występowanie rearanżacji $V(D)J$ dopiero w różnicujących się w limfocyty komórkach somatycznych.

8. Pochodzenie limfocytów

Jak widzimy, limfocyty definiowane jako komórki o receptorach kodowanych przez geny $V(D)J$ pojawiły się dopiero u przodków kręgowców żuchwowców, a być może nieco wcześniej, u przodków bezżuchwowców. Jako wyspecjalizowany typ komórek mają zatem nie więcej niż 400–500 mln lat.

Pojawienie się limfocytów musiało być skorelowane z pojawieniem się genów RAG [56] uruchamiających mechanizm „sklejania genów” $V(D)J$, co warunkuje różnorodność receptorów dla antygenów. Pojawienie się zjawiska rearanżacji genetycznej słusznie zostało nazwane przez Marchalonisa i Schlutera [33] „wielkim wybuchem” (ang. *big-bang*) w ewolucji odporności.

Narzuca się pytanie, które komórki wtóroustych bezkręgowców były przodkami limfocytów? Szukając odpowiedzi możemy jedynie spekulować. W całym królestwie zwierząt komórkami zaangażowanymi w reakcje obronne są fagocyty. Spośród współczesnych limfocytów cechy najbliższe fagocytom mają tzw. limfocyty B1, pojawiające się najwcześniej w ontogenezie i nie wymagające dla rozwinięcia swej aktywności pomocy ze strony limfocytów Th. Limfocyty B1 w odpowiednich warunkach mogą przekształcać się w komórki przypominające makrofagi i wykazujące wybitne właściwości żerne [4, 21, 22]. Być może właśnie makrofagi przodków kręgowców były komórkami, w których dokonała się pra-rearanżacja genów $V(D)J$, pozwalająca na pojawienie się specyficznych receptorów dla antygenów [46]?

LITERATURA

- [1] ABO T, WATANABE H, SATO K, IIAI T, MORODA T, TAKEDA K, SEKI S. Extrathymic T cells stand at an intermediate phylogenetic position between natural killer cells and thymus-derived T cells. *Nat Immun* 1995; **14**: 173–187.
- [2] BAYNE CJ. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *BioScience* 1990; **40**: 723–731.
- [3] BERNSTEIN RM, SCHLUTER SF, LAKE DF, MARCHALONIS JJ. Evolutionary conservation and molecular cloning of the recombinase activating gene 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **205**: 687–692.
- [4] BORRELLO AM, PHIPPS RP. The B/macrophage cell: an elusive link between CD5⁺ B lymphocytes and macrophages. *Immunol Today* 1996; **17**: 471–475.
- [5] BREKELMANS P, VAN EWIJK W. Phenotypic characterization of murine thymic environments. *Semin Immunol* 1990; **2**: 13–24.

- [6] CANDEIAS S, HARDY RR, LI YS, STAERZ UD T cell receptor V beta 8.2 gene germ-line transcription: an early event of lymphocyte differentiation. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 3073–3081.
- [7] CANDEIAS S, MUEGGE K, DURUM SK IL-7 receptor and VDJ recombination: trophic versus mechanistic action. *Immunity* 1997; **6**: 501–508.
- [8] CHARLEMAGNE J. Phylogeny of the T-cell receptor. *Dev Comp Immunol* 1997; **21**: 86–86.
- [9] COFFMAN RL, LEBMAN DA, ROTHMAN PB Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol* 1993; **54**: 229–270.
- [10] DU PASQUIER L. Antibody diversity in lower vertebrates – why is it so restricted? *Nature* 1982; **296**: 311–313.
- [11] DU PASQUIER L. Origin and evolution of the vertebrate immune system. *APMIS* 1992; **100**: 383–392.
- [12] FELLAH JS, KERFOURN F, CHARLEMAGNE J. Evolution of T cell receptor genes. Extensive diversity of V β families in the Mexican axolotl. *J Immunol* 1994; **153**: 4539–4544.
- [13] FLAJNIK M. Secreted antigen receptors in cartilaginous fish. *Dev Comp Immunol* 1997; **21**: 82–83.
- [14] GELLERT M. Recent advances in understanding V(D)J recombination. *Adv Immunol* 1997; **64**: 39–64.
- [15] GREENBERG AS, AVILA D, HUGHES M, HUGHES A, MCKINNEY EC, FLAJNIK MF A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* 1995; **374**: 168–173.
- [16] GREENBERG AS, HUGHES AL, GUO J, MCKINNEY EC, FLAJNIK MF. A novel „chimeric” antibody class in cartilaginous fish: IgM may not be the primordial immunoglobulin. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 1123–1129.
- [17] GREENHALGH P, OLESEN CEM, STEINER LA. Characterization and expression of recombination activating genes (RAG-1 and RAG-2) in *Xenopus laevis*. *J Immunol* 1993; **151**, 3100–3110.
- [18] HAMERS-CASTERMAN C, ATARHOUCHE T, MUYLDERMANS S, ROBINSON G, HAMERS C, BAYJANA SONGA E, BENDAHMAN N, HAMERS R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993; **363**: 446–448.
- [19] HARRIMAN W, VOLK H, DEFRANOUX N, WABL M Immunoglobulin class switching recombination. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**: 361–384.
- [20] HAY F. The generation of diversity. [w] Roitt I, Brostoff J, Male D [red] Immunology. London, Baltimore, Barcelona: Mosby, 1996: 6.2–6.14.
- [21] HERZENBERG LA, KANTOR AB B-cell lineages exist in the mouse. *Immunol Today* 1993, **14**: 79–83.
- [22] HERZENBERG LA, KANTOR AB, HERZENBERG LA Layered evolution in the immune system. *Ann NY Acad Sci* 1992; **651**: 1–9.
- [23] HORTON J, RATCLIFFE N. Evolution of immunity. [w] Roitt I, Brostoff J, Male D. [red] Immunology. London, Baltimore, Barcelona: Mosby 1996: 15.1–15–22.
- [24] HORTON JD. Amphibians. [w] Turner RJ [red.] Immunology. A Comparative Approach. Chichester, New York: Wiley & Sons, 1994: 101–136.
- [25] HUNKAPILLER T, HOOD L. Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv Immunol* 1989; **44**: 1–65.
- [26] JAKÓBISIAK M [red] Immunologia. Warszawa: PWN 1996.
- [27] JURD RD. Reptiles and birds. [w] Turner RJ [red.] Immunology. A Comparative Approach. Chichester, New York: Wiley & Sons, 1994: 137–172.
- [26] KILARSKI W, PLYTYCZ B. The presence of plasma cells in the lamprey (*Agnatha*). *Dev Comp Immunol* 1981; **5**: 361–366.
- [29] LEWIS SM. The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv Immunol* 1994; **56**: 27–150.

- [30] MANDLER R, CHU CC, PAUL WE, MAX EE, SNAPPER CM. Interleukin 4 induces S mu-S gamma 1 DNA rearrangement in B cells activated with dextran-anti-IgD antibodies and interleukin 4: a three component model for Ig class switching. *J Exp Med* 1993; **178**: 1577–1586.
- [31] MANDLER R, FINKELMAN FD, LEVINE AD, SNAPPER CM. IL-4 induction of IgE class switching by lipopolysaccharide-activated murine B cells occurs predominantly through sequential switching. *J Immunol* 1993; **150**: 407–418.
- [32] MANNING MJ. Fishes. [w] Turner RJ [red.] Immunology. A Comparative Approach. Chichester, New York: Wiley & Sons, 1994: 69–100.
- [33] MARCHALONIS JJ, SCHLUTER SF. On the relevance of invertebrate recognition and defence mechanisms to the emergence of the immune response to vertebrates. *Scand J Immunol* 1990; **32**: 13–20.
- [34] MATSUNAGA T, ANDERSSON E. Evolution of vertebrate antibody genes. *Fish & Shellfish Immunol* 1994; **4**: 413–419.
- [35] MCBLANE JF, VAN GENT DC, RAMSDEN DA, ROMEO C., CUOMO CA, GELLERT M., OETTINGER MA. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 1995; **83**: 387–395.
- [36] MOMBAERTS P, IACOMONI J, JOHNSON RS, HERRUP K, TONEGAWA S, PAPAIOANNOU VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992; **68**: 869–877.
- [37] MOMBAERTS P. Lymphocyte development and function in T-cell receptor and RAG-1 mutant mice. *Int Rev Immunol* 1995; **13**: 43–63.
- [38] MOSMANN TR, SAD S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; **17**: 138–145.
- [39] MUSSMANN R., DU PASQUIER L., HSU H. Is *Xenopus* IgX an analog of IgA? *Eur J Immunol* 1996; **26**: 2823–2830.
- [40] NAKAMURA M, KONDO S, SUGAI M, NAZAREA M, IMAMURA S, HONJO T. High frequency class switching of an IgM+ lymphoma clone CH12F3 to IgA+ cells. *Int Immunol* 1996; **8**: 193–201.
- [41] OPSTELTEN D. B lymphocyte development and transcription regulation *in vivo*. *Adv Immunol* 1996; **63**: 197–268.
- [42] PARHAM P. A boost to immunity from nurse sharks. *Current Biol* 1995; **5**: 696–699.
- [43] PARTULA S, DE GUERRA A, FELLAH JS, CHARLEMAGNE J. Structure and diversity of the T cell antigen receptor β -chain in a teleost fish. *J Immunol* 1995; **155**: 699–706.
- [44] PARTULA S, FELLAH JS, DE GUERRA A, CHARLEMAGNE J. Identification of cDNA clones encoding the T-cell receptor β chain in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *CR Acad Sci [D] (Paris)* 1994; **317**: 765–775.
- [45] PILSTROM L, BENGTEEN E. Immunoglobulin in fish – genes, expression and structure. *Fish & Shellfish Immunol* 1996; **6**: 243–262.
- [46] PŁYTYCZ B, SELJELID R. B-1/macrophages as „living fossils”. *Immunology Today* 1997: w druku.
- [47] PŁYTYCZ B, SELJELID R. Evolution of phagocyte- and lymphocyte-mediated immunity. *Central-Eur J Immunol* 1996; **21**: 3–11.
- [48] RAST JP, LITMAN GW. T-cell receptor gene homologs are present in the most primitive jawed vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 9248–9252.
- [49] ROITTI I, BROSTOFF J, MALE D [red] Immunology. London, Baltimore, Barcelona: Mosby, 1996.
- [50] ROITTI I. Essential Immunology. London, Edinburgh: Blackwell Sci Publ, 1994.
- [51] SHPARAGO N, ZELAZOWSKI P, LIN L, MCINTYRE TM, STUBER E, PECANHA LMT, KEHRY MR, MOND JJ, MAX EE, SNAPPER CM. IL-10 selectively regulates murine Ig isotype switching. *Int Immunol* 1996; **8**: 781–790.

- [52] SLECKMAN BP, GORMAN JR, ALT FW. Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 459–481.
- [53] SNAPPER CM, MARCU KB, ZELAZOWSKI P. The immunoglobulin class switch: beyond „accessibility”. *Immunity* 1997; **6**: 217–223.
- [54] STAVNEZER J. Antibody class switching. *Adv Immunol* 1996; **61**: 79–146.
- [55] STEWART SE, DU PASQUIER L, STEINER LA. Diversity of expressed V and J regions of immunoglobulin light chains in *Xenopus laevis*. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 1980–1986.
- [56] THOMPSON C.B. New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity* 1995; **3**: 531–539.
- [57] TONEGAWA S. Nobel lecture in physiology or medicine – 1987. Somatic generation of immune diversity. *In Vitro Cell Dev Biol* 1988; **24**: 253–265.
- [58] TURNER RJ. Mammals. [w] Turner RJ [red.] Immunology. A Comparative Approach. Chichester, New York: Wiley & Sons, 1994: 173–214.
- [59] WARR GW. Evolution of the immunoglobulin genes. *Dev Comp Immunol* 1997; **21**: 157.
- [60] VAN GENT DC, MCBLANE JF, RAMSDEN DA, SADOFSKY MJ, HESSE JE, GELLERT M. Initiation of V(D)J recombinations in a cell-free system by RAG1 and RAG2 proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; **217**: 1–10.
- [61] VARNER J, NEAMEP, LITMAN GW. A serum heterodimer from hagfish (*Eptatretus stoutii*) exhibits structural similarity and partial sequence identity with immunoglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 1746–1750.
- [62] WILSON M, HSU E, MARCUZ A, COURTET M, DU PASQUIER L, STEINBERG C. What limits affinity maturation of antibodies in *Xenopus* – the rate of somatic mutation or the ability to select mutants? *EMBO J* 1992; **11**: 4337–4347.
- [63] ZAPATA A, FANGER, MATTISSON A, VILLENA A. Plasma cells in adult Atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*. *Cell Tissue Res* 1984; **235**: 691–693.
- [64] ZAPATA AG, ARDAVIN CF, GOMARIZ RP, LECETA J. Plasma cells in the ammocoetes of *Petromyzon marinus*. *Cell Tissue Res* 1981; **221**: 203–208.
- [65] ZAPATA AG, TORROBA M, VICENTE A, VARAS A, SACEDON R, JIMENEZ E. The relevance of cell microenvironments for the appearance of lympho-haemopoietic tissues in primitive vertebrates. *Histol Histopathol* 1995; **10**: 761–778.
- [66] ZAPATA AG. Ontogeny of vertebrate lymphocytes. *Dev Comp Immunol* 1997; **21**: 193.

Adres autora: R. Ingardena 6, 30-060 Kraków

STRATEGIE GROMADZENIA rRNA W KOMÓRKACH JAJOWYCH ZWIERZĄT

STRATEGIES OF rRNA ACCUMULATION IN ANIMAL EGG CELLS

JANUSZ KUBRAKIEWICZ

Zakład Zoologii Ogólnej, Instytut Zoologiczny Uniwersytetu Wrocławskiego

Streszczenie. Szybkie tempo podziałów mitotycznych oraz znaczne skrócenie okresu interfazy w początkowych etapach rozwoju zarodkowego powoduje ograniczenie lub całkowite zahamowanie transkrypcji w komórkach wczesnego zarodka. Intensywna synteza białek odbywa się więc na rybosomach i matrycach mRNA zgromadzonych wcześniej – w okresie oogenezy. Tempo tworzenia i akumulacji rybosomów w komórce jajowej zależy przede wszystkim od liczby zaangażowanych, aktywnych transkrypcyjnie genów rybosomalnych. W produkcji rybosomów uczestniczyć mogą komórki wspomagające; może również dochodzić do amplifikacji genów rybosomalnych w jądrze oocyty. Tempo akumulacji rybosomów ma istotny wpływ na szybkość wzrostu komórki jajowej i embriogenezy.

Słowa kluczowe: oogeneza, rybosomy, komórki odżywcze, amplifikacja rDNA.

Summary. High rate of mitotic divisions and significant shortening of interphase at the initial stages of embryonic development result in limitation or even total inhibition of transcription in the cells of an early embryo. Intense protein synthesis takes place on ribosomes and mRNA templates accumulated earlier in the egg cell i.e. during oogenesis. Rate of ribosome synthesis and accumulation in the egg cell depends, most of all, on the number of transcriptionally active ribosomal genes. Nurse cells can be engaged in ribosome production; ribosomal genes can also be amplified in the oocyte nucleus. Rate of ribosome accumulation seems to exert an influence on the rate of egg cell growth and embryogenesis.

Key words: oogenesis, ribosomes, nurse cells, rDNA amplification

WSTĘP

Tworzone w czasie oogenezy komórki jajowe osiągają zwykle duże rozmiary. Znaczny i często dość gwałtowny wzrost objętościowy tych komórek spowodowany jest m.in. gromadzeniem w ich cytoplazmie rybosomów oraz substancji zapasowych,

takich jak glikoproteidy, lipidy czy glikogen. Pierwsze etapy rozwoju zarodkowego przebiegają w izolacji od środowiska zewnętrznego, toteż zgromadzone w komórce jajowej substancje zapasowe wykorzystywane są jako materiał budulcowy lub energetyczny. Moment zapłodnienia inicjuje serię podziałów mitotycznych (tzw. brudkowanie), w wyniku których powstaje wielokomórkowy zarodek. Komórki wczesnego zarodka (=blastomery) charakteryzuje szybkie tempo podziałów mitotycznych oraz znaczne skrócenie okresu interfazy. Ze zwiększoną intensywnością przebiega replikacja DNA, podczas gdy ograniczeniu lub całkowitemu zahamowaniu ulega proces transkrypcji. Inaktywacja genów zygotycznych utrzymuje się do momentu zwolnienia tempa podziałów komórek zarodkowych. Na przykład u płazów geny zygotyczne aktywowane są w stadium tzw. średniej blastuli, u owadów w stadium blastodermi komórkowej. Jednocześnie duże zapotrzebowanie na tworzone *de novo* białka (np. histony, tubuliny i in.) powoduje, że już od pierwszych etapów rozwoju w blastomerach zachodzi intensywne translacja. Zahamowanie aktywności transkrypcyjnej przy jednoczesnym zintensyfikowaniu translacji sprawia, że synteza białka we wczesnych etapach rozwoju zarodkowego odbywać się musi na matrycach mRNA oraz rybosomach zgromadzonych w cytoplazmie komórki jajowej jeszcze podczas oogenezy [9].

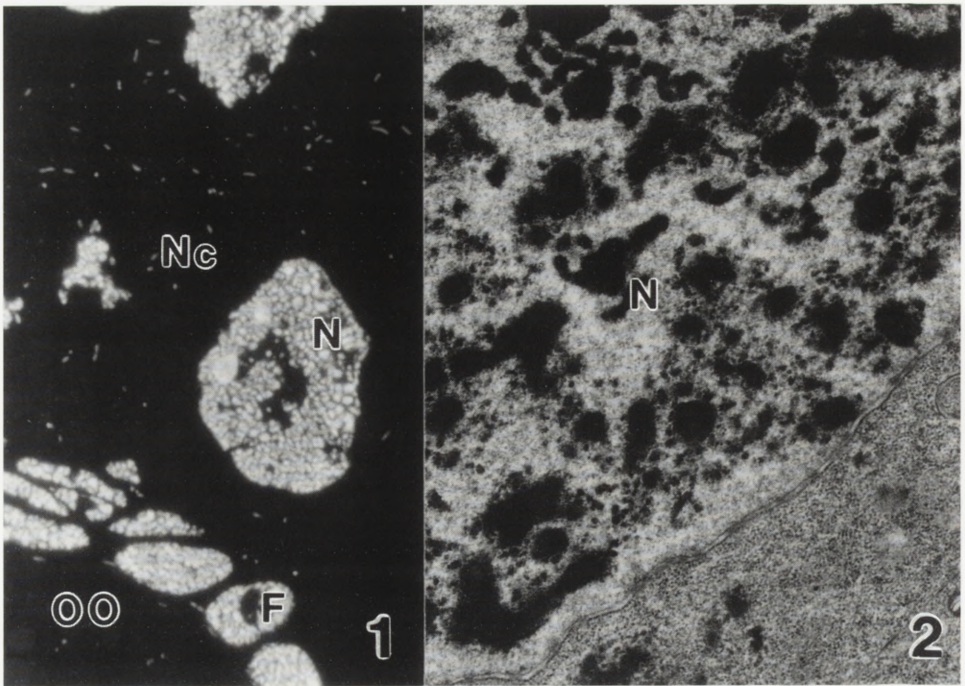
Do akumulacji rybosomów dochodzi przede wszystkim we wczesnych stadiach oogenezy (prewitelogeneza); liczba rybosomów wyprodukowanych w tym okresie jest olbrzymia, np. w oocytyce żaby szponiastej, *Xenopus laevis* wynosi 10^{12} , a u muszki owocowej, *Drosophila melanogaster* – $4,5 \times 10^{10}$ [15]. Wytworzenie tak dużej liczby podjednostek rybosomalnych wymaga zwiększonej syntezy specyficznych białek rybosomalnych oraz trzech klas rybosomalnego RNA (5S, 18S i 28S). Tempo tworzenia rybosomów zależy przede wszystkim od intensywności syntezy ciężkich frakcji rRNA (18S, 28S). Synteza tych frakcji odbywa się na genach rybosomalnych (= rDNA) zawartych w tzw. organizatorze jąderkowym (ang. *Nucleolar Organizing Region* – NOR) [53]. Pomimo iż geny rybosomalne występują w obrębie NOR w wielu kopiach, ich liczba jest zwykle zbyt mała, aby możliwe było utworzenie tak znacznej liczby rybosomów na potrzeby wzrastającego oocyty. W jajnikach wielu grup zwierząt dochodzi więc do uruchomienia mechanizmów intensyfikujących syntezę rRNA. U podstaw tych mechanizmów leży zwielokrotnienie liczby aktywnych transkrypcyjnie genów rybosomalnych. Okazało się bowiem, że czynnikiem warunkującym wzrost tempa tworzenia rRNA jest liczba zaangażowanych genów rybosomalnych [15]. Duża różnorodność strategii prowadzących do zwiększenia liczby genów rybosomalnych znajduje swe odzwierciedlenie zarówno w zróżnicowaniu struktury jajników, jak również w specyficznych modyfikacjach ich funkcji. Poza oocytami, w produkcję rybosomów zaangażowane być mogą komórki wspomagające, zarówno przekształcone komórki płciowe jak i wyspecjalizowane komórki somatyczne. Liczba genów rybosomalnych może się w nich

zwiększyć w wyniku poliploidyzacji, politenizacji czy selektywnemu namnożeniu fragmentów organizatora jąderkowego (amplifikacja rDNA).

TWORZENIE RYBOSOMÓW PRZY UDZIALE KOMÓREK ODŻYWCZYCH

Podstawowym kryterium klasyfikacji jajników jest określenie losu oraz wzajemnych relacji komórek płciowych. Na tej podstawie wyróżniono dwa zasadnicze typy jajnika¹. Jajnik panoistyczny to ten typ gonady żeńskiej, w którym wszystkie komórki płciowe mogą przekształcić się w gamety (od gr. *pan* – wszystko). W jajniku meroistycznym, natomiast, tylko część komórek płciowych różnicuje w komórki jajowe (gr. *meros* – część), podczas gdy pozostałe funkcjonują jako tzw. komórki odżywcze (= trofocyty). W jajniku meroistycznym podziały mitotyczne komórek gonialnych zakończone są niepełnymi cytokinezami. Wynikiem tego jest utworzenie gron komórek płciowych połączonych wzajemnie tzw. mostkami międzykomórkowymi. W obrębie poszczególnych gron komórki ulegają zróżnicowaniu na oocyt(y) oraz komórki odżywcze. Występowanie jajników typu meroistycznego stwierdzono wśród zwierząt bezkręgowych m.in. u owadów [10, 45], skorupiaków [1, 26], pierścienic [2, 19,20] czy niesporczaków [5]. Badania prowadzone technikami histochemicznymi i autoradiograficznymi (przede wszystkim na jajnikach owadów) wykazały, że jedną z podstawowych funkcji komórek odżywczych jest produkcja rRNA (rybosomów) [10]. Wytworzone w komórkach odżywczych rybosomy transportowane są do cytoplazmy wzrastających oocytów przez system mostków międzykomórkowych. By zapewnić odpowiednie wzmocnienie aktywności transkrypcyjnej, w czasie różnicowania komórek odżywczych dochodzi najczęściej do głębokich zmian ich genomu. W wyniku replikacji endomitotycznej genom tych komórek ulega poliploidyzacji (bądź rzadziej politenizacji) [10, 45] (rys. 1, 2). Wzrostowi ploidii towarzyszy zwielokrotnienie organizatorów jąderkowych, a co za tym idzie liczby genów rybosomalnych. Na przykład, w komórkach odżywczych *Drosophila melanogaster* liczba tych genów wzrasta ok. 1000-krotnie [15]. Stopień poliploidyzacji komórek odżywczych może być bardzo różny, nie zawsze jednak odzwierciedla stopień zwielokrotnienia organizatorów jąderkowych. Fragmenty genomu zawierające rDNA ulegają najczęściej niedoreplikowaniu (ang. *underreplication*) [15, 38], chociaż znane są również przypadki selektywnej nadreplikacji organizatorów jąderkowych [18]. Niemniej jednak stwierdzono, że u *Drosophila*

¹Wprowadzony w 1874 r. przez Brandta [8] podział jajników na panoistyczne i meroistyczne dotyczył gonad żeńskich owadów. Stosowanie tej klasyfikacji w szerszym zakresie wydaje się jak najbardziej uzasadnione.



Rys. 1, 2. Komórki odżywcze w jajniku sieciarki, *Semidalis aleurodiformis* (Insecta, Neuroptera): 1 – wyraźna fluorescencja DNA w poliploidalnych jądrach (N) komórek odżywczych (Nc). F – jądra komórek foliularnych; OO – oocyt, skrawek żywicy akrylowej (Histocryl) barwiony odczynnikiem DAPI (fluorescencja DNA – pow. 750x); 2 – charakterystyczny obraz elektronomikroskopowy poliploidi dalnego jądra(N) komórki odżywczej (pow. 21 600x)

poziom syntezy rRNA w początkowych etapach oogenezy jest wprost proporcjonalny do stopnia poliploidyzacji komórek odżywczych oraz do całkowitej liczby genów rybosomalnych zaangażowanych w syntezę rRNA na potrzeby jednej komórki jajowej. Co więcej okazało się, że szybkość tworzenia rybosomów może w istotny sposób wpływać na tempo procesu oogenezy [15, 32]. Przykładem takich zależności może być sytuacja opisywana u mutantów typu *bobbed* muszki owocowej. Mutacja ta polega na delecji różnej długości fragmentów organizatora jąderkowego. Czas trwania oogenezy u osobników zmutowanych zależy od liczby pozostałych w genomie komórek odżywczych, aktywnych transkrypcyjnie genów rybosomalnych. Na przykład u mutantów zawierających jedynie trzecią część normalnego zestawu genów rRNA, oogeneza trwa ok. 200 godzin, podczas gdy w warunkach kontrolnych dojrzała komórka jajowa tworzona jest w ciągu 75 godzin. Warto zaznaczyć, że jaja wyprodukowane przez samice *bobbed* zawierają tę samą ilość rRNA co jaja typu dzikiego [15, 33, 34].

Szczegółowe dane dotyczące funkcjonowania komórek odżywczych w jajnikach meroistycznych pochodzą przede wszystkim z badań morfologicznych, genetycznych

i molekularnych gonad żeńskich owadów [10, 15]. Podwyższona ploidia, wzmożona aktywność transkrypcyjna jak również obecność rozbudowanego aparatu jąderkowego w komórkach odżywczych występujących w jajnikach innych grup zwierzęcych (np. pierścienic czy skorupiaków) pozwalają sądzić, że podobnie jak u owadów, komórki te zaangażowane są przede wszystkim w masową produkcję rybosomów na rzecz tworzonych komórek jajowych [1, 19, 20, 26].

ZWIELOKROTNIE NIE KOPII GENÓW RYBOSOMALNYCH W JĄDRZE OOCYTU

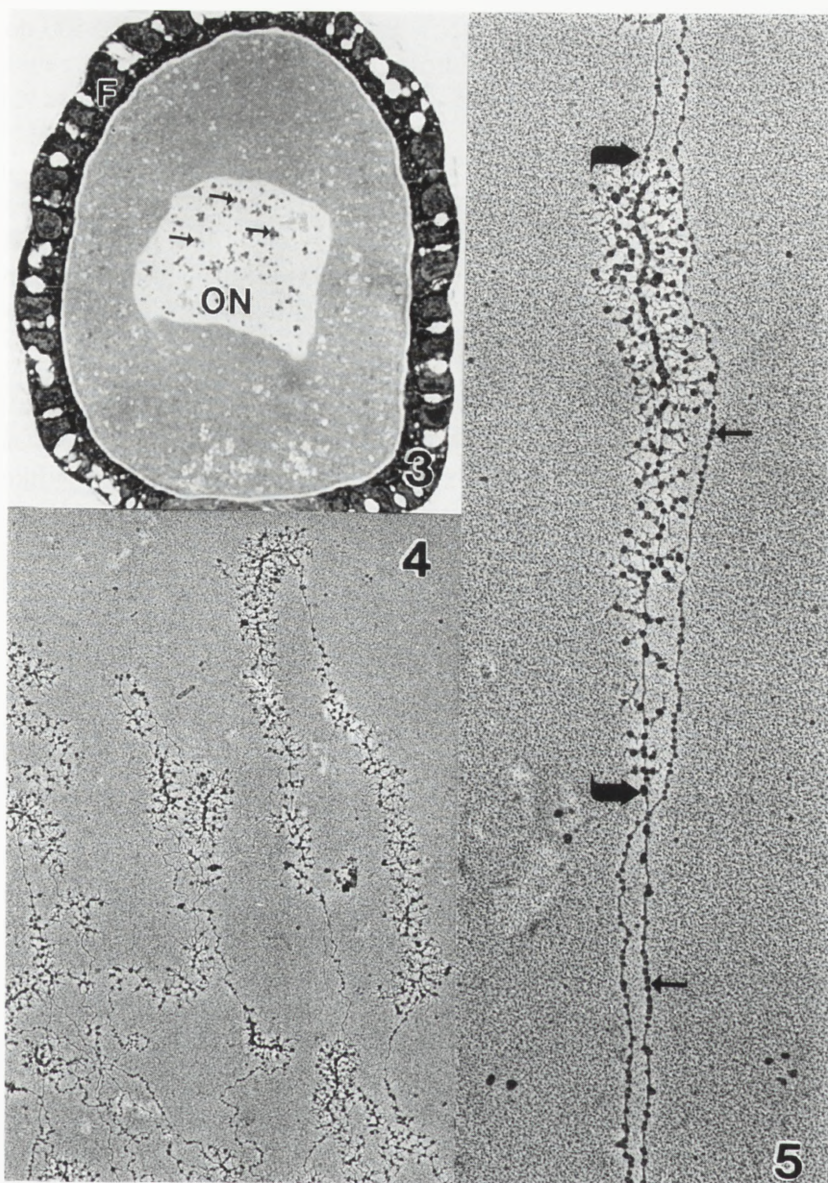
W jajnikach meroistycznych liczba genów biorących udział w syntezie rRNA znacznie wzrasta w wyniku ilościowych zmian w genomie komórek odżywczych. W wielu innych przypadkach (zarówno w jajnikach panoistycznych, jak i meroistycznych) zwiększoną produkcję rybosomów umożliwia zwielokrotnienie liczby genów rRNA w jądrze oocytu. Dochodzi do tego w drodze selektywnej replikacji (= amplifikacji) fragmentów genomu wchodzących w skład organizatora jąderkowego [6, 10, 13, 15]. Amplifikacja rDNA w jądrach oocytów ma charakter pozachromosomowy. Szczegółowa analiza ultrastrukturalna prowadzona techniką całkowitego rozproszenia chromatyny (ang. *spreading technique*) (technikę tę opisano w rozdziale: „Wybrane metody badania struktury i funkcji jądra komórkowego” w tym samym tomie PBK) pokazała, że powstałe w wyniku amplifikacji kopie genów rybosomalnych zawarte są w licznych, kolistych cząsteczkach rDNA, które pozostają poza strukturą chromosomów jąderkotwórczych. Produkcja wielokrotnych kopii kolistych cząsteczek rDNA przebiega zgodnie z mechanizmem replikacyjnym „toczącego się koła” (w podobny sposób ulegają replikacji niektóre wirusy). Mechanizm ten umożliwia szybkie namnożenie wybranego fragmentu genomu [53].

Zwielokrotnienie liczby genów rybosomalnych w drodze amplifikacji rDNA podczas oogenezy nie jest zjawiskiem powszechnym, chociaż opisane zostało u wielu gatunków zwierząt należących do różnych grup systematycznych, zarówno bezkręgowców, jak i kręgowców [6, 10, 15, 28, 37, 52]. Pomimo iż sens samego zjawiska polegający na zwiększonej produkcji rybosomów pozostaje wszędzie ten sam, to jednak nawet blisko spokrewnione gatunki mogą w istotny sposób różnić się stopniem zwielokrotnienia rDNA, dynamiką amplifikacji oraz aktywnością transkrypcyjną zamplifikowanych genów. Poziom zamplifikowania genów, wyrażony bezwzględnym przyrostem ilości rDNA (mierzonym w pg) czy też stopniem zwielokrotnienia tych genów w stosunku do właściwej dla danego gatunku ich liczby w genomie haploidalnym, może być różny. W oocytach żaby, *Xenopus laevis*, poziom ten jest wysoki; w 30-35 pg zamplifikowanego rDNA zawartych jest ok. 2.5×10^6 genów rybosomalnych, co stanowi 1400-krotny przyrost w porównaniu z liczbą

genów rybosomalnych występujących w genomie haploidalnym tego gatunku [15]. U pstrąga, *Salmo irideus*, ilość zgromadzonego w oocytach rDNA wynosi 20 pg, podczas gdy u niektórych ryb jesiotrowatych (Acipenseridae) przyrost rDNA w czasie oogenezy określono jako 30–50-krotny [37]. Podobnie znaczny wzrost liczby genów rybosomalnych wynikający z amplifikacji rDNA obserwować można w oocytach wielu gatunków owadów [13, 15, 28]. U chrząszcza *Dytiscus marginalis* ilość wytworzonego rDNA osiąga masę 67 pg (3×10^6 genów rybosomalnych) [14, 45]. Znane są jednak przykłady oocytów, w których stopień namnożenia rDNA nie jest tak wysoki. U niektórych mięczaków zwielokrotnienie liczby genów rybosomalnych jest bardzo niewielkie (np. 2–5-krotne u małży) [22]. Podobnie niski poziom amplifikacji wykazują oocyty niektórych gatunków ssaków, np. u naczelnych (pawian, człowiek) stwierdzono jedynie 4–5-krotny przyrost ilości rDNA [55, 56].

Tworzenie dodatkowych kopii rDNA u większości gatunków rozpoczyna się w okresie premejotycznym; niejednokrotnie jeszcze w czasie proliferacji oogoniów. Badania autoradiograficzne z zastosowaniem H^3 -tymidyny wykazały, że u wielu gatunków proces amplifikacji rDNA zachodzi najintensywniej we wczesnych etapach profazy I podziału mejotycznego (do stadium pachytenu) [13, 15]. Zwielokrotnieniu liczby genów rybosomalnych w jądrach komórek gonialnych oraz wczesnoprofazowych mejocytów towarzyszy często pojawianie się zwartych struktur wewnątrzjądrowych. Kopie nowo utworzonego, zamplifikowanego rDNA pozostają w bliskim sąsiedztwie organizatorów jąderkowych tworząc skondensowane, najczęściej nieaktywne transkrypcyjnie, skupienia materiału pozachromosomowego [13, 14, 15]. U niektórych owadów (np. u chrząszczy [13, 23, 24, 30] czy sieciarek [26]) struktury te występują w formie pojedynczych ciał o kształcie sferycznym (*DNA body*; *Giardina body*) [13], podczas gdy u ryb (Acipenseridae) czy płazów (*Xenopus*) tworzą położone biegunowo czapy (*DNA cap*) [4, 14, 37]. Wzmoczonej amplifikacji rDNA nie zawsze towarzyszy pojawianie się pojedynczych, skondensowanych struktur zawierających zwielokrotnione geny. Na przykład u ropuchy *Bufo bufo* zamplifikowane geny tworzą kilka drobnych skupień w obrębie jądra, podczas gdy u żaby torbacza, *Gastrotheca riobambae* ciała rDNA w ogóle nie występują [17]. Różnorodność zachowań struktur zawierających produkty amplifikacji jest przypuszczalnie wynikiem różnej dynamiki procesów związanych z selektywnym namnażaniem genów.

Inicjacja aktywności transkrypcyjnej na matrycach rDNA wymaga rozluźnienia struktur zawierających zamplifikowane geny [21, 23, 41, 49, 50]. Już w stadium pachytenu cząsteczki rDNA ulegają stopniowej dekondensacji i częściowemu rozproszeniu w kariolimfie jądra oocytu. Przekształcenia te inicjują początkowo powolną, a następnie coraz bardziej intensywną produkcję podjednostek rybosomalnych. Morfologicznym wyrazem syntezy rybosomów zachodzącej na zwielokrotnionych matrycach rDNA jest z reguły pojawienie się w jądrze oocytu tzw. jąderek wielokrotnych [6, 13, 15, 51] (rys. 3). Liczba tych struktur w obrębie



Rys. 3. Jąderka wielokrotne (strzałki) w jądrze oocyty (ON) pośnieszka, *Boreus hyemalis* (Insecta, Mecoptera): F – nabłonek foliularny, skrawek półcienki, preparat barwiony błękitem toluidyny, pH 4,8, pow. 700x (dzięki uprzejmości S.M. Bilińskiego);

Rys. 4, 5. Zmagnifikowany rDNA z jąder oocytów sieciarki, *Hemerobius* spp. (Insecta; Neuroptera), obraz ultrastrukturalny otrzymany techniką całkowitego rozproszenia chromatyny (*spreading technique*); 4 – duży fragment kołistej cząsteczki rDNA z licznymi choinkami transkrypcyjnymi przedzielonymi obszarami nietranskrybowanymi (pow. 24 000x); 5 – fragment rDNA zawierający jednostkę transkrypcyjną (choinka) (ograniczony dużymi strzałkami), odcinki nieaktywne transkrypcyjnie przyjmują konfigurację nukleosomalną – małe strzałki (pow. 56 000x)

jądra jest zwykle znaczna, np. w oocytach *Xenopus laevis* wynosi od 500 do 2500 [15]. W niektórych przypadkach amplifikacji rDNA oraz aktywacji zwielokrotnionych genów nie towarzyszy pojawianie się jąderek wielokrotnych, lecz w jądrze oocytu obserwować można jedynie pojedyncze olbrzymie jąderko [4, 14]. Warto zauważyć, że ze wzrostem aktywności transkrypcyjnej zamplifikowanych genów kodujących rRNA wiąże się całkowite zahamowanie transkrypcji genów rybosomalnych zawartych w chromosomach jąderkotwórczych [15], a w niektórych przypadkach (np. u owadów) również w pozostałych obszarach genomu. W tej ostatniej sytuacji materiał chromosomowy może ulec częściowej kondensacji tworząc wspólne ciało wewnątrzjądrowe tzw. kariosferę [45].

Strukturę zamplifikowanych genów rybosomalnych oraz dynamikę ich aktywności transkrypcyjnej badano u wielu gatunków kręgowców i bezkręgowców z zastosowaniem techniki rozproszenia chromatyny [10, 15, 27, 39, 46–49]. Na elektrownomikroskopowych obrazach uzyskanych tą techniką (rys. 4) zamplifikowany rDNA ma postać kolistych cząsteczek zawierających odcinki genowe poprzedzielane fragmentami nietranskrybowanymi [39]. Regiony nie ulegające transkrypcji przyjmują konfigurację nukleosomalną, podczas gdy oś chromatynowa aktywnych genów jest gęsto pokryta upakowanymi cząsteczkami polimerazy I RNA. Od cząsteczek tych, bocznie w stosunku do długiej osi odcinka rDNA, odchodzą włókienka nowo syntetyzowanych łańcuchów pre-rRNA. Włókienka te zwiększają swą długość zgodnie z kierunkiem zachodzącej transkrypcji przez co aktywne geny przyjmują charakterystyczny wygląd regularnych „choinek transkrypcyjnych” (rys. 5). Układ „choinek” w poszczególnych kolistych cząsteczkach rDNA ma charakter tandemowy; odwrotny kierunek transkrypcji w obrębie tej samej cząsteczki wykazano jedynie w zamplifikowanych genach muchówki, *Tipula* [10]. W badaniach ultrastrukturalnych wykazano również, że cząsteczki rDNA pochodzące z jednego jądra komórkowego mogą stanowić populację heterogenną. Poszczególne cząsteczki rDNA różnią się długością, liczbą genów rybosomalnych oraz ich aktywnością transkrypcyjną. Ponadto okazało się, że nawet w obrębie tej samej cząsteczki rDNA geny mogą ulegać transkrypcji niezależnie i niejednocześnie. Powstałe w wyniku aktywacji transkrypcyjnej zamplifikowanych genów jąderka wielokrotne różnić się więc mogą „wydajnością” w produkcji rybosomów [27, 39].

Pod koniec profazy I podziału mejotycznego aktywność transkrypcyjna aparatu jąderkowego (tj. wszystkich jąderek wielokrotnych) stopniowo ustaje. W większości przypadków losy zamplifikowanego rDNA oraz powstałych w wyniku jego aktywności transkrypcyjnej jąderek nie są znane. Wiadomo jedynie, że u *Xenopus laevis* w czasie rozpadu otoczki jądrowej (metafaza I podziału mejotycznego) jąderka wielokrotne wydostają się do cytoplazmy. Choć zawarty w nich rDNA nie ulega ani replikacji, ani transkrypcji, same struktury jąderkowe pozostają przez dłuższy czas nienaruszone i ulegają degradacji dopiero w okresie gastrulacji [11].

INNE STRATEGIE

Zarówno obecność poliploidalnych komórek odżywczych, jak i amplifikacja rDNA w jądrze oocyty wpływają na tempo akumulacji rybosomów w tworzącej się komórce jajowej przez znaczne zwiększenie liczby genów kodujących rRNA. Z badań porównawczych nad procesem oogenezy, zarówno u zwierząt bezkręgowych jak i u kręgowców, wynika, że przebieg rybosomogenezy w czasie tworzenia komórek jajowych zależy od konstrukcji jajnika oraz od wzajemnych relacji pomiędzy wzrastającymi oocytami a komórkami wspomagającymi. Różnorodne procesy prowadzące do zwielokrotnienia genów rybosomalnych ulegać mogą wzajemnej kompensacji i modulacji. Najwięcej danych dotyczących tego typu współzależności zebrano analizując sposoby akumulacji rybosomów podczas oogenezy u płazów bezogonowych, gadów i owadów [28]. Najwszechstronniej zbadanym pod tym względem gatunkiem płaza jest, wspomniana już wcześniej wielokrotnie, afrykańska żaba szponiasta, *Xenopus laevis*. W jądrach oogoniów i wczesnomejotycznych oocytów tego gatunku dochodzi do intensywnej amplifikacji rDNA. Transkrypcja zachodząca na namnożonych kopiach genów rybosomalnych prowadzi do wytworzenia olbrzymiej liczby rybosomów [15]. Podobną taktykę gromadzenia rybosomów obserwowano m.in u traszki, *Triturus* [40]. Nieco inny typ strategii rozwojowej przedstawia północnoamerykańska żaba, *Ascaphus truei* [28]. W czasie proliferacji oogoniów w jajnikach tej żaby, trzem ostatnim podziałom mitotycznym nie towarzyszy cytokineza. Powstające oocyty są więc ośmiojądrowe. W początkowych etapach profazy mejotycznej wszystkie jądra są morfologicznie identyczne. Dopiero pod koniec oogenezy siedem z nich degeneruje, a tylko jedno przekształca się we właściwe jądro komórki jajowej (tzw. pęcherzyk zarodkowy). We wszystkich wczesnomejotycznych jądrach oocyty *Ascaphus* dochodzi do amplifikacji rDNA i wytworzenia jąderek wielokrotnych, przy czym ilość zamplifikowanego rDNA w każdym z jąder jest kilkakrotnie mniejsza od ilości rDNA w jądrze oocyty *Xenopus*. Ze względu jednak na wielojądrowy charakter oocyty *Ascaphus* całkowity poziom amplifikacji porównywalny jest ze stopniem zwielokrotnienia genów rybosomalnych u *Xenopus*. Wielojądrowe oocyty opisano również we wczesnych etapach oogenezy u południowoamerykańskiej rzekotki torbacza, *Flectonotus pygmaeus* [28]. Wskutek wielokrotnych podziałów kariokinetycznych, do których dochodzi w oogoniach, powstają oocyty, z których każdy zawierać może do 2000 jąder. Podobnie jak w przypadku *Ascaphus*, w czasie profazy mejozy dochodzi do stopniowej degeneracji jąder, a oocyt przekształca się w normalną jednojądrową gametę. We wczesnych etapach oogenezy przynajmniej część z wielu jąder oocyty namnaża swe geny rybosomalne w procesie amplifikacji. Poziom amplifikacji w poszczególnych jądrach jest niski, jednakże całkowita zawartość zwielokrotnionego rDNA w oocycie *Flectonotus* przewyższa ilość zgromadzonego DNA rybosomalnego w oocytach *Xenopus*.

Szczególną formę gromadzenia rybosomów podczas oogenezy opisano u gadów [27, 34, 35, 43]. W czasie rozwoju jajnika u niektórych gatunków dochodzi do wytworzenia specjalnego rodzaju powiązań pomiędzy rozwijającymi się oocytami a otaczającym je somatycznym nabłonkiem folikularnym. Powstały system interakcji międzykomórkowych oraz sposób zaangażowania komórek somatycznych w proces gromadzenia rybosomów mają charakter unikalny i zasługują na specjalną uwagę. W jajnikach wielu gatunków jaszczurek oocyty pokrywa początkowo jednowarstwowy i nieodróżnicowany, a następnie wielowarstwowy nabłonek folikularny. We wczesnych etapach wzrostu oocytów pewne komórki w obrębie tego nabłonka ulegają fuzji z oocytami, jednocześnie wzrastając przyjmują charakterystyczny gruszkowaty kształt. Efektem tej niezwyklej, heterocelularnej fuzji jest utworzenie kanałów cytoplazmatycznych pomiędzy oocytami a komórkami somatycznymi [25, 36, 44]. W badaniach autoradiograficznych i ultrastrukturalnych wykazano, że komórki gruszkowate są aktywne transkrypcyjnie; obecność w tych komórkach dużego jądra z rozbudowanym jąderkiem pozwala sądzić, że biorą one czynny udział w produkcji rybosomów [7, 35, 36]. Utworzone rybosomy transportowane są do cytoplazmy oocytów przez międzykomórkowe kanały cytoplazmatyczne. W końcowych etapach oogenezy cytoplazma komórek gruszkowatych zostaje w całości „wpompowana” do cytoplazmy jaja. Pomimo że genom tych komórek w czasie różnicowania nabłonka nie ulega poliploidyzacji, to jednak ich liczebność w jajnikach niektórych gatunków (np. u jaszczurki zielonej, *Lacerta viridis*, każdemu oocytowi towarzyszy ich ok. 10 000) powoduje, że udział komórek gruszkowatych w produkcji rybosomów podczas oogenezy może być znaczny. Obecność komórek gruszkowatych oraz ich zaangażowanie w procesach transkrypcyjnych nie wyklucza udziału jądra oocyta w syntezie rybosomów. Nawet u gatunków, u których liczba komórek gruszkowatych jest duża, w jądrze oocyta stwierdzono amplifikację rDNA [35]. Wydaje się jednakże, że sam poziom amplifikacji może zależeć od stopnia udziału (= liczby) komórek gruszkowatych w produkcji rybosomów. I tak u *Lacerta* stwierdzono, że poziom amplifikacji jest niewielki (ok. 5-krotny), natomiast u żółwi, u których komórki gruszkowate w nabłonku folikularnym w ogóle nie występują, amplifikacja rDNA zachodzi z dużą intensywnością, a jądro oocyta zawierać może ok. 200 jąderek wielokrotnych [28]. Przedstawione powyżej obserwacje wskazują, że komórki gruszkowate w jajnikach gadów pełnią wobec oocyta funkcję odżywczą podobną do tej, jaką spełniają komórki odżywcze w jajnikach meroistycznych. Zasadnicza różnica pomiędzy tymi typami komórek wspomagających polega na tym, że w przeciwieństwie do komórek odżywczych, które są przekształconymi komórkami płciowymi, komórki gruszkowate mają pochodzenie somatyczne. Udział genomu komórek somatycznych w procesie syntezy i kumulowania podjednostek rybosomalnych w oocycie jest zjawiskiem niezwykle rzadkim. Do wyjątkowych przykładów tego typu strategii rozwojowej należy, opisany powyżej, system syntezy rybosomów podczas oogenezy u niektórych gatunków gadów. Poza gadami, zaangażowanie elementów

pochodzenia somatycznego w masową produkcję rybosomów w jajniku opisano jedynie u pewnych owadów [10, 31]. U muchówek z rodziny pryszczarkowatych (*Cecidomyidae*) jajniki mają charakter meroistyczny. W porównaniu jednak z jajnikami meroistycznymi innych grup owadów, ich rozwój przebiega z pewnymi modyfikacjami [29, 40]. Podział mitotyczny macierzystej komórki gonialnej zakończony jest niekompletną cytokinezą. Powstaje zespół dwu komórek płciowych połączonych mostkiem międzykomórkowym. Jedna z komórek przekształca się w oocyt, podczas gdy druga ulega fuzji z różną liczbą mezodermalnych komórek somatycznych, tworząc tym samym tzw. komorę odżywczą. Komora odżywcza ma więc charakter heterokarionu, w jej skład wchodzi bowiem zarówno jądra pochodzenia somatycznego, jak i pojedyncze jądro komórki płciowej. Jądra somatyczne przechodzą szereg cykli endomitotycznych i szybko stają się aktywne transkrypcyjnie. Podobnie więc jak u innych owadów mających jajnik meroistyczny komora odżywcza u *Cecidomyidae* jest miejscem masowej produkcji rybosomów. „Wspieranie” komórek płciowych w ich aktywności transkrypcyjnej (tworzeniu rybosomów) przez jądra pochodzenia somatycznego jest jedną ze szczególnych strategii stosowanych podczas oogenezy; ma ona jednak dla tych owadów specjalne znaczenie. Wydaje się bowiem, że ich organizatory jąderkowe zawierają najniższą liczbę cistronów rybosomalnych wśród wszystkich organizmów eukariotycznych, a szczególny system „zwielokrotnienia” genów umożliwia sprawny przebieg oogenezy [31].

Wszystkie przedstawione strategie gromadzenia rybosomów w komórce jajowej polegają w swej istocie na zwiększaniu wydajności syntezy rRNA przez zwielokrotnienie liczby dostępnych cistronów rybosomalnych. Znane są jednakże przykłady jajników, w których rozwój oocytów odbywa się bez współdziałania komórek wspomagających (jajniki panoistyczne), a w jądrze oocytu nie dochodzi do amplifikacji rDNA [12] lub poziom jej jest bardzo niski [22, 55, 56]. Okazuje się, że u niektórych zwierząt ogólna liczba genów kodujących rRNA zawartych w organizatorach jąderkowych jest wystarczająca, aby oogeneza przebiegała normalnie, bez konieczności tworzenia dodatkowych matryc transkrypcyjnych. Do zwierząt takich należy m.in. szarańcza wędrowna, *Locusta migratoria* [43]. W haploidalnym genomie tego gatunku organizatory jąderkowe zawierają aż 3300 kopii genów rybosomalnych, natomiast każdy z rozwijających się oocytów ma ich 13200, gdyż oocyty w profazie I podziału mejotycznego mają 4C DNA. Tak duża ilość aktywnego transkrypcyjnie rDNA umożliwia właściwą dynamikę syntezy i gromadzenia rybosomów podczas oogenezy. Brak jednak odpowiedzi na pytanie, jak zachowują się geny organizatora jąderkowego w komórkach somatycznych *Locusta*? Czy i w jaki sposób regulowana jest ich aktywność?

Ilość i tempo gromadzenia rRNA w komórce jajowej jest niewątpliwie jednym z najistotniejszych czynników wpływających na proces tworzenia komórek jajowych. Obserwacje przebiegu i dynamiki oogenezy u mutantów (np. *bobbed*), jak również badania porównawcze nad blisko spokrewnionymi gatunkami, które różnią się między

sobą taktyką gromadzenia rybosomów, wyraźnie wskazują, że zwielokrotnienie liczby cistronów rybosomalnych poprzez poliploidyzację genomów komórek odżywczych i/lub amplifikację rDNA, może w istotny sposób przyczyniać się do przyśpieszenia procesu oogenezy. Brak tego typu mechanizmów może być kompensowany wysoką zawartością kopii genów rybosomalnych w natywnych organizatorach jąderkowych (np. u *Locusta*) lub przejawia się wolniejszym przebiegiem oogenezy. Spowolnienie procesu tworzenia komórki jajowej, wynikające z wolnego tempa akumulacji rybosomów, obserwowano u wspomnianych już mutantów *bobbed*. Podobnie, wolniejszy przebieg oogenezy obserwowano u pluskwiaków z rodzaju *Oncopeltus* (brak amplifikacji rDNA) w porównaniu z bliskospokrewnionym rodzajem *Dysdercus* (nadreplikacja organizatorów jąderkowych w komórkach odżywczych) [23].

Wyniki badań porównawczych nad dynamiką oogenezy i embriogenezy niektórych gatunków płazów i owadów [15, 16, 23] sugerują, że liczba zgromadzonych w komórce jajowej rybosomów może również wpływać na tempo rozwoju zarodkowego. Pogląd ten wydaje się logicznie uzasadniony gdyż większa liczba zmagazynowanych w jajach rybosomów to możliwość opóźnienia ekspresji genów zgotycznych, a tym samym możliwość zwiększenia tempa podziałów mitotycznych komórek zarodkowych. Nasza wiedza w tym zakresie wydaje się jednak bardzo fragmentaryczna. Poza sugestiami i hipotezami wciąż brak pełnych i konkretnych danych eksperymentalnych i opisowych, które pozwoliłyby określić znaczenie różnych strategii gromadzenia rRNA podczas oogenezy w ogólnej taktyce rozwojowej.

LITERATURA

- [1] ADIYODI RG, SUBRAMONIAM MT. Arthropoda-Crustacea. [w] Adiyodi KG, Adiyodi RG [red.] Reproductive biology of invertebrates. Vol. 1. New York: Wiley and Son 1983: 443–493.
- [2] ANDERSON E, HUEBNER E. Development of the oocyte and its accessory cells of the polychaete *Diopatra cuprea* (Bosc). *J Morph* 1968; **126**: 163–172.
- [3] ANDREUCETTI P. An ultrastructural study of differentiation of pyriform cells and their contribution to oocyte growth in representative squamata. *J Morph* 1992; **212**: 1–11.
- [4] AZEVEDO C, COIMBRA A. Evolution of nucleoli in the course of oogenesis in a viviparous teleost (*Xiphophorus helleri*). *Biol Cell* 1980; **38**: 43–48.
- [5] BERTOLANI R. Tardigrada. [w] Adiyodi KG, Adiyodi RG [red.] Reproductive biology of invertebrates. Vol. 1. New York: Wiley and Sons 1983: 431–441.
- [6] BILIŃSKI SM, BÜNING J. The ovary structure, oogenesis and extrachromosomal rDNA amplification in the snow flea, *Boreus hyemalis* (Insecta, Mecoptera). Materiały Symposium Naukowego: „Środowisko Przyrodnicze Parku Narodowego Gór Stołowych”. Kudowa Zdrój 1996: 197–201.
- [7] BOU-RESLI MN. Ultrastructural studies on the nucleoli of the follicle cells in the lizards *Acanthodactylus scutellatus* Hardyi and *Eremias brevisrostris*. *Cell Tiss Res* 1981; **214**: 169–180.
- [8] BRANDT A. Über die Eirohren der *Blatta orientalis* (*Periplaneta*). *Mem Acad Imp Sci* 1874; VIIme Ser **21**: 1–30.

- [9] BROWDER LW, ERICKSON CA, JEFFERY WR. *Developmental Biology*. Philadelphia, Ft. Worth, Chicago, San Francisco, Montreal, Toronto, London, Sydney, Tokyo: Saunders College Publishing 1991.
- [10] BÜNING J. *The Insect Ovary. Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution*. London: Chapman & Hall 1994.
- [11] BUSBY SJ, REEDER RH. Fate of amplified nucleoli in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* 1982; **91**: 458–467.
- [12] CAVE MD. Absence of rDNA amplification in the uninucleolate oocyte of the cockroach *Blattella germanica* (Orthoptera: Blattidae). *J Cell Biol* 1976; **71**: 49–58.
- [13] CAVE MD. Morphological manifestations of ribosomal DNA amplification during insect oogenesis. [w] King RC, Akai H [red.] *Insect ultrastructure*. New York: FolioGen Plenum 1982: 86–117.
- [14] COIMBRA A, AZEVEDO C. Structure and evolution of the nucleolus during oogenesis. [w] Van Blerkom j, Motta PH [red.] *Ultrastructure of reproduction*. Boston, The Hague, Dordrecht, Lancaster: Martinus Nijhoff Publishers 1984: 127–139.
- [15] DAVIDSON EH. *Gene activity in early development*. New York: Academic Press 1986.
- [16] DEL PINO E. Modifications of oogenesis and development in marsupial frogs. *Development* 1989; **107**: 169–187.
- [17] DEL PINO EM, STEINBEISSER H, HOFMANN A, DREYER C, CAMPOS M, TRENDELENBURG MF. Oogenesis in the egg-brooding frog *Gastrotheca riobambae* produces large oocytes with fewer nucleoli and low RNA content in comparison to *Xenopus laevis*. *Differentiation* 1986; **32**: 24–33.
- [18] DITTMANN F, STEINBRÜCK G, MÜNZ A. Amplification of tropharium rDNA in the telotrophic ovariole of the bug, *Dysdercus intermedius*. *Invertebr Reprod Dev* 1990; **17**: 9–18.
- [19] ECKELBARGER KJ. Evolutionary radiation in polychaete ovaries and vitellogenic mechanisms: their role in life history patterns. *Can J Zool* 1983; **61**: 487–504.
- [20] EMANUELSSON H. Autoradiographic analysis of RNA synthesis in the oocyte-nurse cell complex of the polychaete *Ophryotrocha labronica*. *J Embryol exp Morph* 1985; **88**: 249–263.
- [21] FRANKE W, SCHEER U, TRENDELENBURG MF, ZENTGRAF H, SPRING H. Morphology of the transcriptionally active chromatin. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1978; **42**: 755–772.
- [22] KIDDER GM. The ribosomal RNA cistrons in clam gametes. *Dev Biol* 1976; **49**: 132–142.
- [23] KLOC M. Extrachromosomal DNA and its activity in RNA synthesis in oögonia and oocytes in the pupal ovary of *Creophilus maxillosus* (Staphylinidae, Coleoptera-Polyphaga). *Eur J Cell Biol* 1980; **21**: 328–334.
- [24] KLOC M, MATUSZEWSKI B, NURKOWSKA J. Ribosomal gene amplification in the oocytes of *Creophilus maxillosus* (Staphylinidae, Coleoptera-Polyphaga) – an insect with telotrophic ovaries. *Folia Histochem Cytobiol* 1995; **33**: 267–276.
- [25] KLOSTERMAN LL. Ultrastructural and quantitative dynamics of the granulosa of ovarian follicles of the lizard *Gerrhonotus coeruleus* (family Anguidae). *J Morph* 1987; **192**: 125–144.
- [26] KUBRAKIEWICZ J. Oogeneza stawonogów. [w] Biliński S, Bielańska-Oszechowska Z, Kawiak J, Przełęcka A [red.] *Ultrastruktura i funkcja komórki t. 6 Oogeneza*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 1994: 87–101.
- [27] KUBRAKIEWICZ J, BILIŃSKI SM. Extrachromosomal amplification of rDNA in oocytes of *Hemerobius* spp. (Insecta, Neuroptera). *Chromosoma* 1995; **103**: 606–612.
- [28] MACGREGOR HC. Ways of amplifying ribosomal genes. [w] Jordan EG, Cullis GA [red.] *The nucleolus*. Cambridge: Cambridge University Press 1982: 129–151.
- [29] MATUSZEWSKI B. Diptera I: Cecidomyiidae. [w] John B, Bauer H, Kayano H, Levan A, White M [red.] *Animal Cytogenetics vol. 3: Insecta 3*. Berlin-Stuttgart: Borntraeger 1982: 1–140.

- [30] MATUSZEWSKI B, HOSER P. Gene amplification and its effect on the structure and function of the oocyte nucleus in the whirligig beetle *Gyrinus natator* (Gyrinidae, Coleoptera-Adephaga). *Experientia* 1975; **31**: 431–432.
- [31] MATUSZEWSKI B, JAZDOWSKA-ZAGRODZIŃSKA B. Variation of nuclear number in nurse chambers of egg follicles in gall midges (Cecidomyiidae, Diptera). *Invertebr Reprod Dev* 1994; **25**: 33–41.
- [32] MERMOD JJ, JACOBS-LORENA M, CRIPPA M. Changes in rates of RNA synthesis and ribosomal gene number during oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1977; **57**: 393–402.
- [33] MOHAN J. Influence of the RNA content on oogenesis in the bobbed mutants of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol exp Morph* 1971; **25**: 237–246.
- [34] MOHAN J, RITOSSA FM. Regulation of ribosomal RNA synthesis and its bearing on the bobbed phenotype in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1970; **22**: 495–512.
- [35] MOTTA CM, ANDREUC CETTI P, FILOSA S. Ribosomal gene amplification in oocytes of the lizard *Podarcis sicula*. *Mol Reprod Dev* 1991; **29**: 95–102.
- [36] MOTTA CM, SCANDERBEG MC, FILOSA S, ANDREUC CETTI P. Role of pyriform cells during the growth of oocytes in the lizard *Podarcis sicula*. *J Exp Zool* 1995; **273**: 247–256.
- [37] RAIKOVA EV, STEINERT G, THOMAS CHR. Amplified ribosomal DNA in meiotic prophase oocyte of acipenserid fishes. *Roux Arch Dev Biol* 1979; **186**: 81–85.
- [38] RENKAWITZ R, KUNZ W. Independent replication of the ribosomal RNA genes in the polytrophic-merostic ovaries of *Calliphora erythrocephala*, *Drosophila hydei* and *Sarcophaga barbata*. *Chromosoma* (Berl.) 1975; **53**: 131–140.
- [39] SCHEER U. Contributions of electron microscopy spreading preparations (Miller spreads) to the analysis of chromosome structure. [w] Hennig W [red.] Results and problems in cell differentiation, vol. 14. Structure and function of eukaryotic chromosomes. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1987: 147–171.
- [40] SCHEER U, TRENDELENBURG MF, FRANKE WW. Regulation of transcription of genes of ribosomal RNA during amphibian oogenesis. A biochemical and morphological study. *J Cell Biol* 1976; **69**: 465–489.
- [41] SCHEER U, ZENTGRAF H. Nucleosomal and supranucleosomal organization of transcriptionally inactive rDNA circles in *Dytiscus* oocytes. *Chromosoma* 1978; **69**: 243–254.
- [42] SCHÜPBACH PM, WENT DF. Cell fusions during formation of the oocyte-nurse chamber complex in the ovary of the dipteran insect *Mycophila speyeri*. *Roux Arch Dev Biol* 1983; **192**: 228–233.
- [43] SHÄFER M, KUNZ W. Ribosomal gene amplification does not occur in the oocytes of *Locusta migratoria*. *Dev Biol* 1987; **120**: 418–424.
- [44] TADDEI C, ANDREUC CETTI P. Structural modifications of the nuclear components during lizard oogenesis in relation to the differentiation of the follicular epithelium. *Cell Diff Dev* 1990; **29**: 205–215.
- [45] TELFER WH. Development and physiology of the oocyte-nurse cell syncytium. *Adv Insect Physiol* 1975; **11**: 223–319.
- [46] TRENDELENBURG MF. Morphology of ribosomal RNA cistrons in oocytes of the water beetle, *Dytiscus marginalis* L. *Chromosoma* 1974; **48**: 119–135
- [47] TRENDELENBURG MF, SCHEER U, FRANKE WW. Structural organization of ribosomal DNA in oocytes of the house cricket. *Nature New Biol* 1973; **245**: 167–170.
- [48] TRENDELENBURG MF, SCHEER U, ZENTGRAF H, FRANKE WW. Heterogeneity of spacer lengths in circles of amplified ribosomal DNA of two insect species, *Dytiscus marginalis* and *Acheta domesticus*. *J Mol Biol* 1976; **108**: 453–470.
- [49] TRENDELENBURG MF, FRANKE WW, SCHEER U. Frequencies of circular units of nucleolar DNA in oocytes of two insects, *Acheta domesticus* and *Dytiscus marginalis*, and changes of nucleolar morphology during oogenesis. *Differentiation* 1977; **7**: 133–158.

- [50] TRENDELENBURG MF, MCKINNELL RC. Transcriptionally active and inactive regions of nucleolar chromatin in amplified nucleoli of fully grown oocytes of hibernating frogs, *Rana pipiens* (Amphibia, Anura). *Differentiation* 1979; **15**: 73–95.
- [51] TRENDELENBURG MF, ZATSEPINA OV, WASCHEK T, SCHLEGEL W, TROSTER H, RUDOLPH D, SCHMAHL G, SPRING H. Multiparameter microscopic analysis of nucleolar structure and ribosomal gene transcription. *Histochem Cell Biol* 1996; **106**: 167–192.
- [52] VLAD M. Nucleolar DNA in oocyte of *Salmo irideus* (Gibbons). *Cell Tiss Res* 1976; **167**: 407–424.
- [53] WILCZYŃSKI G. Ultrastrukturalne i molekularne aspekty ekspresji jąderkowych genów rRNA. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 73–100.
- [54] WINTERSBERGER E. DNA amplification: New insights into its mechanism. *Chromosoma* 1994; **103**: 73–81.
- [55] WOLGEMUTH DJ, JAGIELLO GM, HENDERSON AS. Quantitation of ribosomal RNA genes in fetal human oocyte nuclei using rRNA:DNA hybridization *in situ*. *Exp Cell Res* 1979; **118**: 181–190.
- [56] WOLGEMUTH DJ, JAGIELLO GM, HENDERSON AS. Baboon late diplotene oocytes contain micronucleoli and a low level of extra rDNA templates. *Dev Biol* 1980; **78**: 598–604.

Adres autora: ul. Sienkiewicza 21, 50-335 Wrocław

SEKWENCJE MIKROSATELITARNE W GENOMACH ROŚLIN

MICROSATELLITE SEQUENCES IN PLANT GENOMES

TOMASZ SAKOWICZ

Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Streszczenie: Sekwencje mikrosatelitarne (nazywane także mikrosatelitami, STR-ami, tj. krótkimi powtórzeniami tandemowymi lub SSR-ami, tj. prostymi powtórzeniami sekwencji) należą do grupy powtarzających się sekwencji DNA. Opisywane są one jako powtórzenia krótkich jednostek o długości od 1 do 6 par zasad (pz) i tworzą tandemowe szeregi sekwencji powszechnie występujące w DNA wszystkich genomów eukariotycznych. Wykazano istotne różnice pomiędzy mikrosatelitami roślinnymi i zwierzęcymi. Mikrosatelity mogą służyć jako wysoce informatywne markery genetyczne, które w połączeniu z użyciem technologii PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy ang. *Polymerase Chain Reaction*) umożliwiają wykrywanie polimorfizmu sekwencji DNA. Sugeruje się, że jednym z głównych jego źródeł może być poślizg (ang. *slippage*) DNA podczas replikacji przynoszący w rezultacie zmianę długości elementów sekwencji powtarzających się. Większość loci mikrosatelitarnych u roślin wykazuje wyższy poziom polimorfizmu niż inne systemy markerowe, takie jak: RAPD (ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*); RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) czy SSCP (ang. *Single-Strand Conformation Polymorphism*) i stąd są uznane za wygodne sondy molekularne w mapowaniach genetycznych, analizie sprzężeń oraz są przydatne w genetyce populacyjnej, badaniach filogenetycznych i ewolucyjnych, a także w diagnostyce molekularnej chorób genetycznych człowieka.

Słowa kluczowe: Mikrosatelity, STR-y, polimorfizm, analiza genomów roślin, markery genetyczne.

Summary: Microsatellite sequences (also called microsatellites, STRs-short tandem repeats or SSRs-simple sequence repeats) are a group of repetitive DNA sequences. They are characterized by a short repeat unit of 1 to 6 bp and occur in tandem arrays widely distributed in the DNA of all eukariotic genomes. Essential differences between plant and animal systems were demonstrated. Microsatellites can serve as highly informative genetic markers, and in conjunction with the use of polymerase chain reaction (PCR) technology enable the detection of length polymorphism. It is suggested that the major source of them can be replication slippage resulting in length variation. Most of microsatellite loci in plants exhibit a higher level of polymorphism than other marker systems (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*, SSCP – *Single-Strand Conformation Polymorphism*). Besides being excellent molecular probes for genetic mapping and linkage analysis, they

are found to be very useful for population genetic, phylogenetic and evolutionary studies and useful in molecular diagnostics of human diseases.

Key words: Microsatellites, STRs, polymorphism, plant genome analysis, genetic markers.

WSTĘP

Sekwencje mikrosatelitarne należą do szerokiej i bardzo różnorodnej grupy powtarzających się sekwencji DNA. Stanowią one istotny element genomu wszystkich organizmów eukariotycznych. Kryteria uwzględniające organizację genomową sekwencji powtarzalnych pozwalają na rozróżnienie sekwencji rozproszonych oraz tandemowych, tj. takich, w których jednostki powtarzające się leżą bezpośrednio obok siebie. Te ostatnie były początkowo izolowane jako niezależne pasmo satelitarne powstałe po wirowaniu DNA w gradiencie gęstości chlorku cezu (CsCl). Obecnie termin „satelitarny DNA” używany jest jako synonim terminu sekwencje tandemowe, nawet jeśli nie tworzą one odrębnej frakcji DNA w wymienionym wyżej gradiencie.

Sekwencje tandemowe mogą być identyfikowane kilkoma sposobami, m.in. za pomocą enzymów restrykcyjnych. Naturę tych sekwencji ujawnia się wówczas m.in. przez zastosowanie niekompletnej hydrolizy DNA wybranymi enzymami restrykcyjnymi. Wśród produktów trawień rozdzielanych w żelach agarozowych pojawia się „drabinka” oligomerów będących wielokrotnościami długości podstawowego elementu powtarzającego się. Wizualizacji dokonuje się przy pomocy autoradiografii po hybrydyzacji typu *Southern*.

Do omawianej grupy sekwencji zalicza się również sekwencje mikrosatelitarne, określane też terminami: SSR (ang. *Simple Sequence Repeats*), STR (ang. *Short Tandem Repeats*), SSM (ang. *Simple Sequence Motif*) lub jako mono-, dwu-, trój-, czteronukleotydowe powtórzenia. W ostatnich latach stały się one powszechnie stosowanymi markerami genetycznymi stworzonymi na podstawie selektywnej amplifikacji sekwencji DNA. Analizy prowadzone z ich użyciem zrewolucjonizowały badania prowadzone na genomach ssaków (głównie człowieka), ponieważ wysoki polimorfizm tych sekwencji znalazł szerokie zastosowanie m.in. w diagnostyce molekularnej chorób genetycznych (dystrofia miotoniczna, zespół łamliwego chromosomu X, płasawica Hantingtona, ataksja rdzeniowa) [23]. Również u roślin badania z zastosowaniem mikrosatelitów mają coraz istotniejsze znaczenie w analizach genomów [37].

Istnienie dwunukleotydowych powtórzeń poli CA*poli GT udokumentował po raz pierwszy Hamada [14]. Systematyczne wzbogacanie baz danych sekwencji nukleotydowych pozwala na bardziej precyzyjną ich analizę, m.in. pod kątem identyfikacji w nich STR-ów. Istotne znaczenie miały tu badania Webera [52] nad

STR-ami genomu ludzkiego. Autor ten zaproponował podstawowe metody wykrywania polimorfizmu (tj. różnic długości) mikrosatelitów. Obecnie polimorfizm ujawniany jest najczęściej przy użyciu reakcji PCR z zastosowaniem unikalnych krótkich starterów, które oflankowują i definiują locus mikrosatelitarny. Produkty amplifikacji uzyskane z różnych osobników są rozdzielane w żelach wysokiej rozdzielczości celem wykazania polimorfizmu ich długości. Izolację i klonowanie roślinnych sekwencji mikrosatelitarnych po raz pierwszy wykonano na materiale z drzew tropikalnych [7]. Cytowani wyżej autorzy wykryli i określili częstość, z jaką występowały w tych genomach bloki dwunukleotydowych powtórzeń $(AC)_n$ i $(AG)_n$.

Pomimo że sekwencyjne bazy danych są wciąż wyraźnie uboższe w sekwencje roślinne niż zwierzęce, już obecnie można wskazać na istotne różnice zarówno ilościowe, jak i jakościowe między mikrosatelitami roślinnymi i zwierzęcymi. Różnice ilościowe polegają na wyraźnie mniejszej liczbie STR (zwłaszcza dwunukleotydowych) u roślin w porównaniu z genomami ssaków; wśród różnic jakościowych należy wymienić zdecydowaną przewagę powtórzeń o motywie AT/TA u roślin, a CA/GT u ssaków [36].

Sekwencje mikrosatelitarne są identyfikowane i charakteryzowane dwoma podstawowymi metodami: albo za pomocą komputerowej analizy sekwencyjnych baz danych albo przez *screening* bibliotek genomowych DNA z użyciem oligonukleotydowych sond o określonym motywie sekwencyjnym. Wyniki uzyskane przy pomocy obu wymienionych technik obarczone są pewnymi błędami (omówionymi w dalszej części artykułu), ale jednoznacznie wskazują na obfitość omawianych sekwencji we wszystkich analizowanych genomach eukariotycznych oraz na ich wysoki polimorfizm. Informacje o rzeczywistej organizacji genomowej i fizycznej lokalizacji mikrosatelitów w genomach roślinnych są wciąż stosunkowo nieliczne [4]. Wydaje się jednak, że każdy motyw mikrosatelitarny ma charakterystyczny i unikalny wzór zarówno w hybrydyzacji żelowej (*Southern*), jak i *in situ*, co może wskazywać na ich niezależną amplifikację i rozmieszczenie. Na przykład powtórzenia typu $(CA)_n$ u buraka (*Beta vulgaris*) zlokalizowano w regionach centromerów [42]; podobne obserwacje pochodzą z analiz genomu pomidora *Lycopersicon esculentum* [6]. Na powtórzenia o motywie $(AT)_n$ natrafiono w interkalarnych pozycjach ramion chromosomów zawierających geny kodujące rRNA [42]. Prace, w których podjęto próbę lokalizacji STR w odniesieniu do regionów sekwencji kodujących wskazują, że bloki mono-, dwu- i czteronukleotydowych powtórzeń położone są niemal wyłącznie w obszarach niekodujących, w przeciwieństwie do mikrosatelitów o motywach trójnukleotydowych, których znaczna część leży w regionach kodujących [28,51].

Wyniki eksperymentów prowadzonych *in vitro* wyraźnie wskazują, że zachodzący głównie podczas replikacji tzw. „poślizg” (ang. *slippage*) komplementarnych nici DNA (szczególnie w obszarze długich polimerów) może być podstawowym me-

chanizmem odpowiedzialnym za powstawanie i rozprzestrzenianie się w genomie sekwencji mikrosatelitarnych [41]. Ważnych dowodów na występowanie wspomnianego zjawiska dostarczają prace nad niestabilnością powtórzeń trójnukleotydomowych, które wykazują „skłonność” do delecji lub ekspansji [16,17,38]. Procesy te są wynikiem przesunięć ramki odczytu, które zachodzą właśnie w efekcie „poślizgu” komplementarnych nici DNA [34]. Wykazano w badaniach modelowych *in vivo*, że w przypadku masowych ekspansji sekwencji trójnukleotydomowych, mających miejsce m.in. w dystrofii miotonicznej, obok mechanizmu „poślizgu” DNA, dodatkowo zaangażowane są inne, jak np. skokowe ekspansje replikacyjne. Mogą one w następstwie prowadzić do tworzenia nietypowych struktur DNA, jak lewoskrętny Z-DNA, trójniciowy H-DNA, struktura pętli czy struktura krzyżowa. Każda z wymienionych struktur może powodować zaburzenia w typowym przebiegu replikacji [18,19,53].

Wspominana wcześniej duża częstość, z jaką sekwencje mikrosatelitarne występują w genomach oraz ich wysoki polimorfizm czynią je przydatnymi markerami w analizach genomu. Sekwencje te są używane do mapowań genetycznych, analizy sprzężeń, określania stopnia czystości nasion i jakości hybrydów. Współczesna diagnostyka molekularna, wykorzystywana w roślinnych programach hodowlanych, posługuje się w głównej mierze właśnie technikami amplifikacji DNA [9] z wykorzystaniem m.in. omawianych sekwencji mikrosatelitarnych.

CHARAKTERYSTYKA MIKROSATELITÓW ROŚLINNYCH

Analizy mikrosatelitów prowadzone są z wykorzystaniem sekwencji nukleotydowych zgromadzonych głównie w bazach danych GenBank i EMBL oraz w oparciu o tzw. biblioteki genomowych DNA tworzonych w wektorach fagowych [31,13] czy plazmidowych [48]. Obiektem badań były przede wszystkim genomy roślin uprawnych o dużym znaczeniu gospodarczym. W tabeli 1 wymieniono gatunki roślin, których genomy analizowano pod kątem obecności mikrosatelitów, podano ich częściową charakterystykę (motywy jednostek repetytywnych) oraz wskazano metody identyfikacji tych sekwencji. Najbardziej kompleksowe wyniki badań prezentowane są w pracach Wang i wsp., Lagercrantz i wsp. oraz Morgante i Olivieri [odpowiednio 51,24,28]. Badaniami objęto ponad 5000 tysięcy par zasad (kpz), w tym ponad 3000 kpz sekwencji jądrowych DNA i ok.1500 kpz organellowych DNA z ponad 50 gatunków. Znalazły się wśród nich zarówno rośliny jednoliścienne, takie jak: jęczmień (*Hordeum vulgare*), ryż (*Oryza sativa*), kukurydza (*Zea mays*), jak i dwuliścienne: groch (*Pisum sativum*), rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*), tytoń (*Nicotiana tabacum*), pomidor (*Lycopersicon esculentum*). Wnioski sfor-

TABELA 1. Roślinne sekwencje mikrosatelitarne

Gatunek	Rodzaj motywu	Metoda identyfikacji	Literatura
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT, AG, TC, CA	b.d.	5, 10
<i>Beta vulgaris</i>	CA, CT, ATT, GTG, AT	s.b.	29, 42
<i>Brassica napus</i>	GA, CA, GATA, GATA, GACA, GGAT, CA, CT, GTG	s.b. s.b.	22, 34
<i>Glycine max</i>	AT, ATT, AAT, TAA	s.b.	2, 27, 40
<i>Hordeum vulgare</i>	AT, TCT, CT, TG, CTT, TGC, ATTT, GA, CA	s.b. s.b.	3, 4, 32
<i>Lycopersicon esculentum</i>	GA, GT, ATT, TGT, AGTG, AT,CAA, TAA	s.b.; b.d.	6, 45
<i>Lycopersicon pennelli</i>			
<i>Nicotiana tabacum</i>	AT, GA, CCA, CAA	b.d.	45
<i>Oryza sativa</i>	GA, GT, CGG, TTG, ATT, TCT, CAG, TGG, GATA, ATC, CTTT	s.b.	31
<i>Oryza sativa</i>	CGG, GAG, GA, CTT, CTG, ACG, TGG, AT	b.d.	1
<i>Phaseolus vulgaris</i>	GATA, GACA, CAC, CA	S.h.	15
<i>Phaseolus lunatus</i>			
<i>Phaseolus acutifolius</i>			
<i>Pinus strobus</i>	AC, AG, AAT, ATC, AAG, AT, GT, CT	s.b.	13, 21
<i>P. taeda, P. silvestris</i>			
<i>Quercus macrocarpa</i>	GA, GT, CA	s.b.	12,46
<i>Solanum phureja</i>	TA, TC, CTT, AAG, AGA, AT, GAA	s.b.	45, 50
<i>S. tuberosum</i>			
<i>Triticum aestivum</i>	AC, AG, TCT, TTG, GT	s.b.	11,26,39
<i>Vitis vinifera</i>	GT, GA, CAC, GACA, GATA, CT	s.b.	48
<i>Zea mays</i>	CT, AG, AC, GA	b.d.; s.b.	43,47

b.d. – baza danych EMBL i GenBank; s.b. – *screening* bibliotek genomowych; S.h. – hybrydyzacja Southerna

mułowane w wymienionych publikacjach są zbieżne i definiują istotne cechy mikrosatelitów roślinnych. Należą do nich:

- duża częstość występowania;
- ogromna różnorodność dotycząca zarówno liczby kopii w genomach (od 5×10^3 do 3×10^5), długości elementów powtarzających (od kilku pz do ok. 50 pz), jak i lokalizacji w chromosomach;
- bardzo wysoki poziom polimorfizmu proporcjonalny do długości jednostki elementarnej i liczby powtórzeń [54];
- niezwykle niska częstość STR organellowych w porównaniu z jądrowymi [36,51];
- wyraźna dominacja STR chloroplastowych nad mitochondrialnymi;
- dominacja motywów sekwencyjnych:

AT>A>AG>ATA>AAC>AGC>AC>TAT (dane dla bloków powtórzeń co najmniej 30-nukleotydowych);

- wyraźna przewaga (>80%) bloków o długości 20–40 pz;
- dominacja STR dwunukleotydowych (0,477 wszystkich zidentyfikowanych), nad trój- (0,23), mono- (0,162) i czternukleotydowymi (0,138) [51];
- uderzający deficyt (np. w porównaniu z genomem ludzkim) sekwencji o motywie GT, średnio co 300, 110, 180 i 150 kpz odpowiednio w genomach: rzepaku, pszenicy, świerka i tytoniu [51] (u człowieka jeden blok średnio co 30 kpz).

Wydaje się, że różnice w rodzaju dominujących motywów sekwencyjnych mogą mieć związek z bardzo istotnymi różnicami w poziomie i rodzaju metylacji genomów zwierzęcych i roślinnych [24]. Levison i Gutman [25] sugerują, że przewagę motywu GT u zwierząt można wyjaśnić wysokim tempem tranzycji metylowanych C (występujących w dwunukleotydzie CG) do T i w rezultacie zwiększeniem liczby motywów TG. U roślin metylacja C zachodzi nie tylko w specyficznym dla zwierząt układzie CG, ale dodatkowo także w CXG (X – dowolny nukleotyd). Brak jednego specyficznego układu u roślin może ograniczać obecność liczniejszych powtórzeń o motywie GT.

Do kolejnych cech charakteryzujących STR roślinne należą:

- wysoka średnia częstość STR: u gatunków dwuliściennych (ok. trzykrotnie większa niż u jednoliściennych) – odpowiednio jeden STR co 21 kpz i 65 kpz [51];
- lokalizacja STR o motywach mono-, dwu- i czternukleotydowych niemal wyłącznie w regionach niekodujących;
- częsta lokalizacja STR o powtórzeniach trójnukleotydowych w obszarach sekwencji kodujących (ok. 30%); reguła ta dotyczy niemal wyłącznie trójnukleotydów zawierających nukleotydy C i G (np. u pszenicy w genach m.in. α -amylazy, α , β , χ -gliadyny, MLV-gluteiny zlokalizowano powtórzenia GCT, CAA, CAG [11] czy TGC w genie dehydrogenazy alkoholowej [3]);
- lokalizacja ok. 30% STR trójnukleotydowych w obszarach sekwencji transkrybowanych, ale nie ulegających translacji;
- brak wyraźnej zależności między rozmiarami genomów a ilością w nich mikrosatelitów; np. u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) jeden STR co 42 kpz (genom 145 Mpz/C), u kukurydzy (*Zea mays*) co 59 kpz (genom 2504 Mpz/C), u pszenicy (*Triticum aestivum*) co 20 kpz (genom 15966 Mpz/C) [51];
- pozytywna korelacja między % par GC w genomowym DNA a wielkością frakcji STR zawierających nukleotydy GC;
- lokalizacja znaczącej części STR w zmetylowanych regionach genomu „wyciszonych” transkrypcyjnie [44].

W genomach *Eukaryota* stwierdzono kilka kategorii sekwencji mikrosatelitarnych, w których powtórzenia tworzą jeden z czterech bloków [28]:

- proste dokładne (ang. *perfect*) – z jednym motywem powtarzającym się;
- proste niedokładne (ang. *imperfect*) – jeden motyw sekwencyjny przerywany inną (przypadkową) sekwencją;

- złożone dokładne (ang. *compound perfect*) – wewnątrz bloku powtórzeń o określonym motywie pojawia się dokładny blok o innym motywie;
- złożone niedokładne (ang. *compound imperfect*) – jw., lecz poprzedzielane sekwencjami nie mającymi charakteru sekwencji mikrosatelitarnych.

Obecnie wiadomo, że pewne motywy nukleotydowe (np. AT) przejawiają większe tendencje do tworzenia powtórzeń dokładnych [10,28]. Przykładem genomu szczególnie bogatego w bloki STR o strukturze złożonej i niedokładnej jest DNA pszenicy (*Triticum aestivum*) [26].

Szczególą uwagę zwracają także istotne różnice między mikrosatelitami roślinnymi a zwierzęcymi (ludzkimi). Podstawowe z nich to: kilkakrotnie większa częstość występowania STR u zwierząt oraz fakt, że dominującym motywem powtórzeń u roślin jest AT/TA, podczas gdy u człowieka AC/TG i GT/CA [36].

IDENTYFIKACJA SEKWENCJI MIKROSATELITARNYCH

Identyfikacji sekwencji mikrosatelitarnych i ich późniejszej charakterystyki dokonuje się na podstawie: komputerowych analiz sekwencji nukleotydowych zgromadzonych w bazach danych (GenBank, EMBL) [24,51] lub tzw. *screeningu* bibliotek genomowych DNA [31,34]. Wyniki uzyskane z obu wymienionych źródeł obarczone są istotnymi błędami, a w wielu przypadkach ich porównanie jest utrudnione. Wynika to z kilku podstawowych powodów. Do banków sekwencji trafiają głównie sekwencje pochodzące z klonów cDNA (sekwencje kodujące), a jak to wcześniej zaznaczono, istotna część wszystkich sekwencji repetytywnych zlokalizowana jest w nieaktywnych transkrypcyjnie obszarach chromatyny. Ponadto, mimo znaczącego postępu w technikach sekwencjonowania kwasów nukleinowych, procent znanych sekwencji jądrowego DNA roślin jest wciąż niski. Różnice w danych wynikają również z faktu, że badacze stosują jako kryteria poszukiwań mikrosatelitów niejednakowe wielkości n (tj. liczby powtórzeń w bloku), co w zasadniczy sposób wpływa na ilość wykrytych STR w analizowanym genomie. Dodatkowym utrudnieniem jest tworzenie przez powtórzenia mono- i dwunukleotydowe złożonych układów bloków mikrosatelitarnych. Często do identyfikacji STR stosowany jest hybrydyzacyjny *screening* bibliotek genomowych z zastosowaniem sond oligonukleotydowych o konkretnym motywie sekwencyjnym i określonej długości. W jednej z licznych prac tego typu analizowano trzynaście STR o różnych motywach sekwencyjnych w genomie ryżu [31]. Na podstawie znajomości rozmiarów genomu, długości klonowanych w fagu fragmentów DNA (15 kpz) i liczby pozytywnych sygnałów hybrydyzacyjnych wyznaczono parametry charakteryzujące poszczególne mikrosatelity. Informują one o średniej odległości między mikrosatelitami oraz ich liczbie w genomie. Dane uzyskiwane w opisany powyżej sposób często wyraźnie

odbiegają od tych pochodzących z banków sekwencji. Powodów należy upatrywać m.in. w stosowaniu sond o różnych motywach sekwencyjnych i różnej ilości powtórzeń w blokach; odmiennych warunkach hybrydyzacji i tzw. „kąpieli” posthybrydyzacyjnych, co w dramatyczny sposób rzutuje na końcowy wynik. Ponadto dwunukleotydy ($(AT)_n$) uznawany za najpowszechniejszy z STR roślin (na podstawie analiz baz danych) jest stosunkowo trudny do izolacji z bibliotek genomowych ze względu na swój palindromowy charakter. Efektywność *screeningu* jest podnoszona przez stosowanie licznych technik wzbogacania bibliotek (przed lub po ich konstrukcji) w sekwencje mikrosatelitarne [20,30].

Standardowa metoda izolacji STR obejmuje kilka etapów, z których pierwszym jest tworzenie tzw. biblioteki fagowej lub plazmidowej (zwykle o małych wstawkach długości 200–500 pz, celem uniknięcia późniejszych reklonowań). Fragmenty DNA o wspomnianej długości generowane są przez sonikację bądź hydrolizę wybranymi restryktazami (najczęściej *Sau3A*, *RsaI*, *HaeIII*). Następnie wykonuje się hybrydacyjny *screening* sondami oligonukleotydowymi, izolację i sekwencjonowanie DNA z klonów dających pozytywne sygnały hybrydacyjne oraz projektuje się sekwencje starterowe (ang. *primers*) na podstawie znajomości unikalnych sekwencji flankujących i przeprowadza analizę PCR. Kończącym etapem jest identyfikacja produktów amplifikacji w żelach wysokiej rozdzielczości.

ROZMIESZCZENIE STR W ODNIESIENIU DO SEKWENCJI KODUJĄCYCH

Sekwencje mikrosatelitarne występują nie tylko w intronach i sekwencjach 5' i 3' flankujących, ale również w obszarach egzonów [3,51]. Informacje na ten temat w zdecydowanej większości pochodzą z genomów zwierzęcych [8,49,52]. W tabeli 2 przedstawione jest porównanie danych pochodzących z analiz wybranych genomów roślinnych i genomu królika [49] dotyczących rozmieszczenia powtórzeń dwu- i trójnukleotydowych. Porównanie poszczególnych wartości sugeruje podobieństwa między analogicznymi parametrami w analizowanych genomach. Szczególną uwagę zwraca wysoki procent powtórzeń trójnukleotydowych w obszarze egzonów i deficyt w tych samych regionach powtórzeń dwunukleotydowych. W obszarze intronów jest przeciwnie. Prezentowane wyniki mogą sugerować podobieństwa co do ewolucyjnych tendencji w lokalizacji STR w obszarach sekwencji kodujących w genomach roślin i zwierząt.

CHLOROPLASTOWE SEKWENCJE MIKROSATELITARNE

DNA licznych genomów chloroplastowych zostały całkowicie zsekwencjonowane, stąd dane pochodzące z ich analizy są bardzo precyzyjne [37]. Wiadomo,

TABELA 2. Porównanie rozmieszczenia mikrosatelitów roślinnych i zwierzęcych (na przykładzie genomu królika) w obszarach sekwencji kodujących (wg [28,49])

Lokalizacja	Powtórzenia			
	dwunukleotydomowe		trójnukleotydomowe	
	rośliny	zwierzęta	rośliny	zwierzęta
5' flanka	23	11	7	0
3' flanka	8	4	2	0
Intron	22	23	6	3
Egzon	0	4	12	23
5' NT mRNA	2	1	8	7
3' NT mRNA	13	11	3	6
Liczba sekw.	68	54	38	39

NT – sekwencje transkrybowane nie ulegające translacji

że są to genomy wysoce konserwatywne i charakteryzują się znacznie mniejszym tempem mutacji niż genomy jądrowe. Ogólną prawidłowością wszystkich genomów chloroplastowych jest ich wyraźne ubóstwo w sekwencje mikrosatelitarne w porównaniu z DNA jądrowym. Analiza sekwencji z GenBanku ujawnia od 12 powtórzeń $(A)_n$ u ryżu (*Oryza sativa*) do 82 u porostnicy (*Marchantia polymorpha*) w całkowicie zsekwencjonowanych genomach chloroplastowych (średnio jeden blok mikrosatelitarny co 32 kpz). Bardzo nieliczne powtórzenia motywu $(AT)_n$ kontrastują wyraźnie z ich liczbą w jądrowym DNA. Poza wymienionymi wyżej motywami sekwencyjnymi w chloroplastowym DNA zidentyfikowano także powtórzenia ATC, AAG i AATT [52].

Mikrosatelity stanowią obecnie, obok wcześniej scharakteryzowanych metod RFLP i RAPD [9], jeden z głównych sposobów wykrywania polimorfizmów sekwencji DNA, i jako systemy markerowe odgrywają coraz większą rolę w badaniach z zakresu genetyki i hodowli roślin oraz w diagnostyce molekularnej chorób ludzkich, gdzie stały się podstawowym narzędziem badawczym. Wysoka czułość i szybkość wymienionych technik czynią je coraz bardziej powszechnymi, a prace wyspecjalizowanych firmy komercyjnych (obok tworzenia nowych, oryginalnych propozycji) idą m.in. w kierunku ich maksymalnego uproszczenia.

LITERATURA

- [1] AKAGI H, YOKOZEKI Y, INAGAKI A, FUJIMURA T. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor Appl Genet* 1996; **93**: 1071–1077.
- [2] AKKAYA MS, BHAGWAT AA, CREGAN PB. Length Polymorphisms of Simple Sequence Repeat DNA in Soybean. *Genetics* 1992; **132**: 1131–1139.

- [3] BECKER J, HEUN M. Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Mol Biol* 1995; **27**: 835–845.
- [4] BECKER J, HEUN M. Mapping of digested and undigested random amplified microsatellite polymorphism in barley. *Genome* 1995; **38**: 991–998.
- [5] BELL C, ECKER JR. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 1994; **19**: 137–144.
- [6] BROUN P, TANKSLEY SD. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome. *Mol Gen Genet* 1996; **250**: 39–49.
- [7] CONDIT R, HUBBELL SP. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 1991; **34**: 66–71.
- [8] COOTE T, BRUFORD MW. Humann microsatellites applicable for analysis of genetic variation in Apes and Old World Monkeys. *J Heredity* 1996; **87**: 406–410.
- [9] DENIZIAK M, BARCISZEWSKI J. Diagnostyka molekularna roślin. *Post Biol Kom* 1995; **22/sup.6**: 1–12.
- [10] DEPEIGES A, GOUBELY C, LENOIR A, COCHEREL S, PICARD G, RAYNAL M, GRELLET F, DELSENY M. Identification of the most represented repeated motifs in *Arabidopsis thaliana* loci. *Theor Appl Genet* 1995; **91**: 160–168.
- [11] DEVOS KM, BRYAN GJ, COLLINS AJ, STEPHENSON P. Application of two microsatellites sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theor Appl Genet* 1995; **90**: 247–252.
- [12] DOW BD, ASHLEY MV, HOWE HF. Characterization of highly variable (GA/CT)_n microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theor Appl Genet* 1995; **91**: 137–141.
- [13] ECHT CS, MAY-MARQUARDT P. Survey of microsatellite DNA in pine. *Genome* 1997; **40**: 9–17.
- [14] HAMADA SR. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 6465–6469.
- [15] HAMANN A, ZINK D, NAGL W. Microsatellite fingerprinting in the genus *Phaseolus*. *Genome* 1995; **38**: 507–515.
- [16] HANCOCK JM. Simple sequences and the expanding genome. *BioEssays* 1996; **18**: 421–425.
- [17] HARVEY SC. Slipped structures in DNA triplet repeat sequences: entropic contributions to genetic instabilities. *Biochemistry* 1997; **36**: 3047–3049.
- [18] KANG S, JAWORSKI A, OHSHIMA K, WELLS RD. Expansion and deletion of CTG repeats from human disease genes are determined by the direction of replication in *E. coli*. *Nature genetics* 1995; **10**: 213–218.
- [19] KANG S, OHSHIMA K, JAWORSKI A, WELLS RD. CTG triplet repeats from the myotonic dystrophy gene expanded in *Escherichia coli* distal to the replication origin as a single large event. *J Mol Biol* 1996; **258**: 543–547.
- [20] KARAGYOZOV L, KALCHEVA ID, CHAPMAN VM. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucl Acids Res* 1993; **21**: 3911–3912.
- [21] KOSTIA S, VARVIO SL, VAKKARI P, PULKKINEN P. Microsatellites sequences in a conifer *Pinus sylvestris*. *Genome* 1995; **38**: 1244–1248.
- [22] KRESOVICH S, SZEWC-MCFADDEN AK, BLIEK SM, MCFERSON JR. Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated library of *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet* 1995; **91**: 206–211.
- [23] KWIATKOWSKA J, SŁOMSKI R. Powtórzenia sekwencji mikrosatelitarnych w genomie człowieka. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 19–29.
- [24] LAGERCRANTZ U, ELLEGREN H, ANDERSON L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucl Acids Res* 1993; **21**: 1111–1115.

- [26] LEVINSON G, GUTMAN GA. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucl Acids Res* 1987; **15**: 5323–5338.
- [27] MA ZQ, RODER M, SORRELLS ME. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome* 1996; **39**: 123–130.
- [28] MAUGHAN PJ, SAGHAI MAROOF MA, BUSS GR. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome* 1995; **38**: 715–723.
- [29] MORGANTE M, OLIVIERI AM. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* 1993; **3**: 175–182.
- [30] MORCHEN M, CUGUEN J, MICHAELIS G, HANNI C, SAUMITOU-LAPRADE P. Abundance and length polymorphism of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. *Theor Appl Genet* 1996; **92**: 326–333.
- [31] NISHIKAWA N, OISHI M, KIYAMA R. Construction of a human genomic library of clones containing poly(dG-dA)·poly(dT-dC) tracts by Mg²⁺-dependent triplex affinity capture. *J Biol Chem* 1995; **270**: 9258–9264.
- [32] PANAUD O, CHEN X, MCCOUCH S. Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome* 1995; **38**: 1170–1176.
- [33] PLASCHKE J, GANAL MW, RODER MS. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 1995; **91**: 1001–1007.
- [34] PŁUCIENNIK A. Molekularne mechanizmy niestabilności ludzkich sekwencji powtórzonych [CTG/CAG]_n. *Rozprawa doktorska UŁ* 1997.
- [35] POULSEN GB, KAHL G, WEISING K. Abundance and polymorphism of simple repetitive DNA sequence in *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet* 1993; **85**: 994–1000.
- [36] POWELL W, MORGANTE M, MCDEVITT R, VENDRAMIN GG, RAFALSKI JA. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7759–7763.
- [37] POWELL W, MACHRAY GC, PROVAN J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1996; **1**: 215–222.
- [38] RAFALSKI JA, TINGEY SV. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet* 1993; **9**: 275–279.
- [39] RICHARDS RR, SUTHERLAND GR. Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nature Genet* 1994; **6**: 114–116.
- [40] RODER MS, PLASCHKE J, KONIG SU, BORNER A, SORRELLS ME, TANKSLEY SD, GANAL MW. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol Gen Genet* 1995; **246**: 327–333.
- [41] RONGWEN J, AKKAYA MS, BHAGWAT AA, LAVI U, CREGAN PB. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor Appl Genet* 1995; **90**: 43–48.
- [42] SCHLOTTERER C, TAUTZ D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucl Acids Res* 1992; **20**: 211–215.
- [43] SCHMIDT T, HESLOP-HARRISON JS. The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8761–8765.
- [44] SENIOR ML, HEUN M. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* 1993; **36**: 884–889.
- [45] SHARMA PC, WINTER P, BUNGER T, HUTTEL B, WEIGAND F, WEISING K, KAHL G. Abundance and polymorphism of di-, tri- and tetra-nucleotide tandem repeats in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theor Appl Genet* 1995; **90**: 90–96.
- [46] SMULDERS MJM, BREDEMEIJER G, RUS-KORTEKAAS W, ARENS P, VOSMAN B. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor Appl Genet* 1997; **97**: 264–272.

- [47] STEINKELLNER H, FLUCH S, TURETSCHKE E, LEXER C, STREIFF R, KREMER A, BURG K, GLOSSL J. Identification and characterization of (GA/CT)_n – microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Mol Biol* 1997; **33**: 1093–1096.
- [48] TARAMINO G, TINGEY S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 1996; **39**: 277–287.
- [49] THOMAS MR, SCOTT NS. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged (STSs). *Theor Appl Genet* 1993; **86**: 985–990.
- [50] VAN LITH HA, VAN ZUTPHEN LFM. Characterization of rabbit DNA microsatellites extracted from the EMBL nucleotide sequence database. *Animal Genet* 1996; **27**: 387–395.
- [51] VEILLEUX RE, YIN SHEN L, PAZ MM. Analysis of the genetic composition of anther-derived potato by randomly amplified polymorphic DNA and simple sequence repeats. *Genome* 1995; **38**: 1153–1162.
- [52] WANG Z, WEBER JL, ZHONG G, TANKSLEY SD. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor Appl Genet* 1994; **88**: 1–6.
- [53] WEBER JL, MAY PE. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; **44**: 388–396.
- [54] WELLS RD. Molecular basis of genetic instability of triplet repeats. *J Biol Chem* 1996; **271**: 2875–2878.
- [55] WU KS, TANKSLEY SD. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet* 1993; **241**: 225–235.

Adres autora: (2-503 Łódź, ul. Smetany 7 m. 32

DOMENY JĄDROWE ZAWIERAJĄCE snRNP – STRUKTURA I AKTUALNE POGLĄDY NA FUNKCJE

NUCLEAR DOMAINS CONTAINING snRNPs – STRUCTURE AND RECENT HYPOTHESES ON FUNCTION

MAJA ADAMSKA, SZCZEPAN M. BILIŃSKI

Zakład Zoologii Systematycznej, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński,
Kraków

Streszczenie: Jądra komórek somatycznych i oocytów zawierają liczne, morfologicznie różnorodne struktury (ciałka), w których występują małe jądrowe rybonukleoproteidy (snRNP) i inne czynniki związane z obróbką („dojrzwaniem”) RNA. Struktury te w literaturze znane są jako *coiled bodies*, *speckles*, *spheres*, *snurposomes* lub *Binnenkörper*. Pomimo stosunkowo dobrze poznanego składu, ich funkcje pozostają wciąż niejasne. Niniejszy artykuł jest próbą podsumowania i usystematyzowania wiadomości o wymienionych strukturach i ich roli w obróbce RNA. W tym świetle przedyskutowana zostanie funkcja tzw. jąder dodatkowych (*accessory nuclei*) – organelli charakterystycznych dla oocytów i młodych zarodków niektórych owadów.

Słowa kluczowe: *coiled bodies*, sfery, *snurposomes*, *Binnenkörper*, *speckles*, *splicing*, snRNP, jądra dodatkowe

Summary: In the nuclei of somatic cells and developing oocytes numerous, morphologically varied structures containing small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) and other factors involved in RNA-processing occur. They are often referred to as: *coiled bodies*, *speckles*, *spheres*, *snurposomes* or *Binnenkörper*. The composition of these structures is relatively well known, however, their function still remains obscure. In this article we summarize the knowledge about these structures and their role in RNA-processing. In the light of this the function of accessory nuclei, organelles specific for the oocytes and embryos of some insects, will also be discussed.

Key words: *coiled bodies*, *spheres*, *snurposomes*, *Binnenkörper*, *speckles*, *splicing*, snRNP, accessory nuclei

WSTĘP

W jądrze interfazowym wyróżnić można szereg strukturalnie i funkcjonalnie odmiennych domen, wśród których stosunkowo najlepiej poznano osłonkę jądrową,

chromatynę oraz jąderko (porównaj artykuły: „Wybrane metody badania ultrastruktury i funkcji jądra komórkowego” oraz „Funkcjonalna organizacja ostonki jądrowej”, w tym samym numerze PBK). Znacznie mniej wiemy o innych domenach jądra – włóknach okołochromatynowych (ang. *perichromatin fibrils*), ziarnistościach okołochromatynowych (ang. *perichromatin granules*), ziarnistościach międzychromatynowych (ang. *interchromatin granules*) i ciałach jądrowych (ang. *nuclear bodies*) [14]. Te ostatnie tradycyjnie dzielone są na dwie klasy: ciała jądrowe proste (ang. *simple nuclear bodies*) i zwinięte (CB, ang. *coiled nuclear bodies*).

W ostatnich latach do badań nad składem domen jądrowych użyto przeciwciał występujących w surowicach pacjentów chorych na choroby autoimmunizacyjne, np. toczeń rumieniowaty uogólniony (choroby te oraz mechanizmy ich powstawania omówiono w PBK [22]). Badania te pozwoliły na wyróżnienie specyficznej klasy struktur jądrowych, której cechą charakterystyczną jest podwyższone stężenie czynników odpowiedzialnych za obróbkę („dojrzwianie”) RNA. Klasa ta obejmuje występujące w komórkach somatycznych *coiled bodies* i *speckles* oraz znajdujące w rozwijających się oocytach *sfery*, *snurposomy* i *Binnenkörper*. Niniejszy artykuł jest próbą podsumowania i usystematyzowania wiedzy na temat wymienionych struktur i ich roli w procesie obróbki RNA.

1. CIAŁA JĄDROWE ZWINIĘTE (CB)

CB po raz pierwszy zostały zaobserwowane przez hiszpańskiego cytologa, Ramona Cajala, w 1903 roku [16], a ich obecną nazwę zaproponował Bernhard [39]. Średnica tych struktur wynosi 0,1–1 μm , a liczba (w komórkach somatycznych ssaków) od 1 do 10. Ultrastrukturalnie CB przypominają część włóknistą jąderka i zbudowane są ze zwiniętych 50 nm włókienek [43, 48]. Podobnie jak jąderko, zawierają one fibrylarynę i barwią się metodą srebrową (ang. *AgNOR technique*, porównaj artykuł Wybrane metody badania struktury i funkcji jądra komórkowego w tym samym numerze PBK) [42]. Białkiem charakterystycznym i specyficznym dla CB jest p80-koilina [4]. W omawianych strukturach wykazano również obecność czynników odpowiedzialnych za:

- *splicing* (U1, U2, U4/U6, U5 snRNP i pomocniczy czynnik białkowy U2AF),
- obróbkę rRNA (U3 snRNP) i
- formowanie końca 3' mRNA histonów (U7 snRNP)(tab. 1).

Nie wykryto w nich natomiast: DNA, 5S rRNA, białek jąderkowych: nukleoliny (C23) i B23, polimerazy I RNA, poly (A⁺)RNA oraz niezbędnego do *splicingu* czynnika SC35 [5,19,20,21,25,40,42,47]. Innym, niedawno odkrytym białkiem występującym w CB jest pigpen [2,3].

Tabela 1. Skład CB, *speckles*, sfer, snurposomów B i *Binnenkörper*, struktury homologiczne wg [29] oznaczono * lub **: 1 – wstępne badania [29,44] wskazują na obecność snRNP w BK

	CB*	BK*	sfer (snurposomy B+C)*	<i>speckles</i> **	snurposomy B **
U1	+	1	+	+	+
U2	+	1	+	+	+
U4/U6	+	1	+	+	+
U5	+	1	+	+	+
U2AF	+				
SC35			+	+	+
Fibrylaryna	+	+			
U3	+	1			
U7	+	1	+		
Koilina/SPH-1	+	+	+		
Literatura	2,3,5,19,20, 21,25,29,42	29,44	29,46,49,50	19,20, 21,40	29,50

2. SPECKLES

Barwienie jąder komórek somatycznych ssaków przy pomocy przeciwciał przeciw składnikom spliceosomów (np. SC35 [26]) wykazuje obecność licznych jasno świecących struktur (tzw. *speckles*) na tle słabo wybarwionej nukleoplazmy. Poza SC35 w *speckles* występują także U1, U2, U4/U6 i U5 snRNP, natomiast stężenie U2AF jest niskie [19,20] (por. tab. 1). Przy pomocy mikroskopu elektronowego wykazano, że *speckles* to skupienia ziarnistości międzychromatynowych [21,40].

3. SFERY I SNURPOSOMY

Jądra oocytów (= pęcherzyki zarodkowe) płazów stanowią dogodny materiał do badań nad transkrypcją i obróbką RNA, ponieważ zawierają duże i łatwe do izolowania chromosomy szczoteczkowe. Już pod koniec ubiegłego wieku w ściśle określonych miejscach (loci) tych chromosomów obserwowano charakterystyczne, kuliste struktury, tzw. sfery (ang. *sphere organelles*). Równocześnie, w nukleoplazmie znajdowano zarówno wolne (nie kontaktujące się z chromosomami) sfery, jak i mniejsze od nich, kuliste ziarnistości. W ostatnich latach próba klasyfikacji wszystkich tych struktur została podjęta przez Galla i wsp. [27,50]. Wyróżniono trzy typy granul i nazwano je snurposomami A, B i C (od angielskiej wymowy akronimu snRNP).

1. Snurposomy A – średnica od 1 do 4 μm , na preparatach mikroskopowych mają wygląd czerwonych ciałek krwi, co jest związane z mniejszą gęstością ich części centralnych; zawierają U1 snRNA i związane z nimi białka. Do chwili obecnej snurposomy A stwierdzono jedynie w oocytach traszki *Notophthalmus*.

2. Snurposomy B – średnica od 1 do 4 μm , strukturalnie jednorodne (homogenne), zbudowane z ziaren o średnicy 20–30 nm, zawierają odpowiedzialne za *splicing* snRNP (U1, U2, U4/U6 i U5), białka specyficzne dla U1 i U2, czynnik *splicingu* SC35 oraz białka związane z pre-mRNA (tab. 1). Wszystkie składniki snurposomów B znaleziono również na pętlach chromosomów szczoteczkowych płazów.

3. Snurposomy C – średnica od 1 do 20 μm ; zawierają U7 snRNP [49]. Wewnątrz snurposomów C i/lub na ich powierzchni zazwyczaj obserwowane są snurposomy B [50]. Takie właśnie złożone, heterogenne i stosunkowo duże struktury opisywane były w klasycznej literaturze jako sfery. Miejsca przylegania sfer do chromosomów szczoteczkowych (tzw. *sphere organizers*) zidentyfikowano ostatnio jako loci genów kodujących histony [17,28]. U *Xenopus laevis* w sferach występuje również białko wykazujące pewną homologię z p80-koiliną – SPH-1 [46]. Podstawową różnicą pomiędzy sferami a CB jest brak w sferach składników charakterystycznych dla jąderka, takich jak fibrylaryna i związane z nią U3 snRNA [29].

4. BINNENKÖRPER (BK)

W pęcherzykach zarodkowych owadów często obserwowane są duże, sferyczne organelle, tzw. *Binnenkörper* (BK) lub *endobodies* [15,29,31]. Zazwyczaj struktury te są jednorodne, rzadziej zawierają morfologicznie odmienną część centralną. Systematyczne badania nad BK w oocytach świerszcza *Acheta domesticus*, przeprowadzone przez Galla i wsp., pozwoliły stwierdzić, że struktury te barwią się przeciwciałami przeciw fibrylarynie, ludzkiej p80-koilinie, i antygenowi Sm (co świadczy o obecności snRNP [44]), nie zawierają natomiast czynników *splicingu* z grupy SR (do których należy np. białko SC35). Tak więc skład BK, sfer z oocytów płazów i CB komórek somatycznych (patrz wyżej) wydaje się być niemal identyczny (por. tab. 1)[29].

5. FUNKCJE DOMEN ZAWIERAJĄCYCH snRNP

Pomimo stosunkowo dobrze poznanego składu, funkcje wyżej opisanych struktur pozostają wciąż niejasne. W ostatnich latach sugerowano ich udział w:

1) nukleogenezie, produkcji i transporcie składników jąderka – (CB - [14,40], BK – [31]),

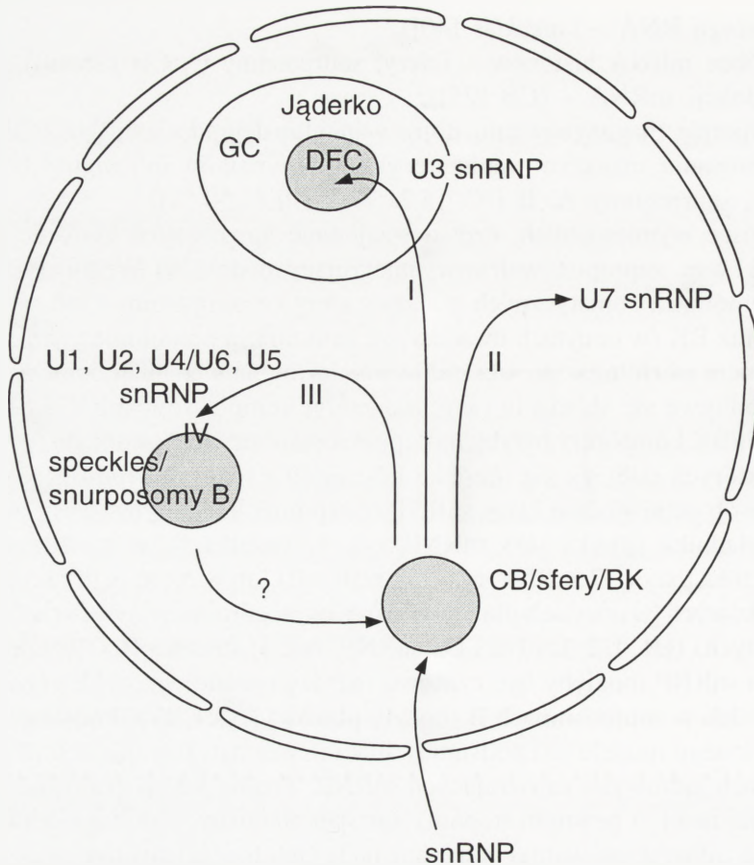
2) dojrzewaniu rRNA - (CB, BK [29]),

- 3) *splicing* RNA – (*speckles* [40]),
- 4) obróbce mRNA histonów – (sfery, snurposomy C, CB [25,49]),
- 5) produkcji snRNA – (CB [25]),
- 6) transporcie, magazynowaniu, dojrzewaniu lub degradacji snRNA (CB [25,42]),
- 7) montowaniu, magazynowaniu i recyklingu czynników *splicing* (CB, *speckles*, BK, sfery, snurposomy A, B i C, [5,21,27,29,40,47,50,51]).

W miejsce wymienionych, często wzajemnie sprzecznych koncepcji, w roku 1995, Gall i wsp. zaproponowali nowy integrujący model [29]. Według tych autorów CB (w komórkach somatycznych ssaków), sfery (=snurposomy C+B, w oocytach płazów) oraz BK (w oocytach owadów) są strukturami homologicznymi. Stanowią one rozmaicie morfologicznie ukształtowane formy uniwersalnej domeny jądrowej, w której odbywa się składanie (ang. *assembly*) kompleksów snRNP. Składane w CB/sferach/BK kompleksy byłyby następnie sortowane i kierowane do tych rejonów jądra, w których odbywa się obróbka lub *splicing* różnych typów RNA (rys. 1). W ten sposób odpowiednie klasy snRNP transportowane byłyby: do gęstego włóknistego składnika jąderka (U3 snRNP, rys. 1, strzałka I), w sąsiedztwo genów kodujących histony (U7 snRNP, rys. 1, strzałka II) lub w rejon pętli chromosomów szczoteczkowych (w oocytach płazów) i ziaren okołochromatynowych (w komórkach somatycznych) (U1, U2, U4/U6 i U5 snRNP, rys. 1, strzałka III). W tym ostatnim przypadku snRNP mogłyby być czasowo magazynowane w *speckles* (komórki somatyczne) lub w snurposomach B (oocyty płazów) (rys.1, IV). Podstawową zaletą przedstawionego modelu jest podsumowanie i usystematyzowanie aktualnej wiedzy o strukturach jądrowych zawierających snRNP. Trzeba jednak pamiętać, że model ten (przynajmniej w pewnym stopniu) jest spekulatywny, a do jego potwierdzenia (względnie zakwestionowania) potrzebne będą żmudne badania hybrydocytochemiczne i ultrastrukturalne.

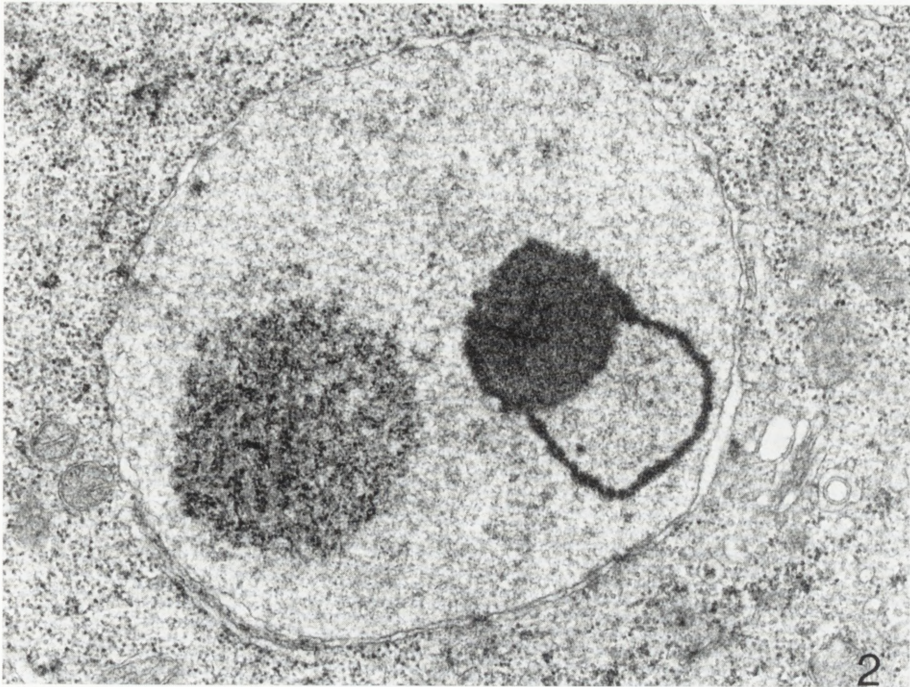
6. CZY JĄDRA DODATKOWE ZAWIERAJĄ STRUKTURY HOMOLOGICZNE Z BK?

Jądra dodatkowe (AN, ang. *accessory nuclei*, niem. *akzessorische Kerne*) po raz pierwszy zostały opisane przez Blochmana w ooplazmie (cytoplazmie oocytów) owadów [13]. Do chwili obecnej organelle te, poza oocytami rozmaitych stawonogów [np. 9,12,15,18,36,37,38,41], znaleziono w młodych zarodkach owadów [53] i nicieni [30], a także w specyficznych, towarzyszących oocytom komórkach odżywczych [35]. Współczesne badania ultrastrukturalne pozwoliły stwierdzić, że AN otoczone są podwójną, poprzebijaną porami osłonką, która budową przypomina osłonkę jądrową [6,7,32,33,53]. Wewnątrz AN występują w przybliżeniu kuliste (średnica około 1–2 μm), elektronowo gęste ciała, tzw. pseudojąderka (ang. *pseudonucleoli*), zatopione w przejrzystej substancji podstawowej [6,18,32,37,45] (rys. 2). Pseu-



Rys. 1. Model funkcjonowania CB/sfer/BK (wg [29], objaśnienia w tekście)

dojąderka zazwyczaj zbudowane są z jednorodnego materiału ziarnistego, rzadziej składają się z 2 lub 3 morfologicznie odrębnych substancji lub zawierają bardziej zbitą część rdzeniową. Dość liczne w latach 60 i 70 analizy histochemiczne wykazały, iż w pseudojąderkach zgromadzone są białka i RNA, nie stwierdzono w nich natomiast DNA [18,23,32,33]. Jak wynika z badań mikroskopowo-elektronowych AN powstają drogą fałdowania lub pączkowania osłonki jądrowej [6,7,33]. Najprawdopodobniej w procesie tym biorą udział mikrotubule i laminy jądrowe [6,7]. Sporo uwagi poświęcono w ostatnich latach rozmieszczeniu AN w obrębie ooplazmy. W oocytach wesołów [6,9] i muchówek [38] struktury te zlokalizowane są wokół pęcherzyka zarodkowego (=jądra oocyty) natomiast u błonkówek [7,11,52] leżą prawie wyłącznie w cienkiej, powierzchniowej warstwie ooplazmy, tzw. periplazmie. Badania ultrastrukturalne, immunocytochemiczne oraz eksperymentalne [1,11] su-



Rys. 2. Jądro dodatkowe w periplazmie oocyty błonkówki *Chrysis ignita*. Widoczna podwójna otoczka oraz pseudojąderka (pow. 30 000)

gerują, że za charakterystyczne, peryferyczne rozmieszczenie AN błonkówek odpowiedzialne są mikrotubule.

Funkcja AN nie została dotychczas wyjaśniona, w kolejnych opracowaniach sugerowano ich udział w akumulacji materiałów zapasowych (żółtka) [32], syntezie prekursorów osłon jajowych [32], magazynowaniu błon cytoplazmatycznych [38] lub w determinacji osi przód-tył zarodka [7,10]. Żadna z powyższych koncepcji nie uzyskała ostatecznego potwierdzenia i nie została powszechnie zaakceptowana.

Ostatnie, niepublikowane badania naszego zespołu pozwoliły wykazać w obrębie pseudojąderek obecność białek srebrochłonnych organizatora jąderkowego (ang. *AgNOR proteins*) oraz p80-koiliny. Tak więc pseudojąderka i BK, opisywane w jądrach oocytów innych owadów, wydają się być strukturami homologicznymi. Równocześnie, analiza ultrastrukturalna sugeruje, iż pod koniec oogenezy pseudojąderka ulegają rozproszeniu, a zawarty w nich materiał transportowany jest do otaczającej periplazmy [10].

W świetle powyższych obserwacji można zaproponować następujący scenariusz wyjaśniający funkcję AN w oocytach (i młodych zarodkach) błonkówek:

1. Powstające przez fałdowanie otoczki jądrowej pęcherzyka zarodkowego AN zawierają BK (opisywane w klasycznych pracach jako pseudojąderka).

2. AN lokują się поблиżu błony cytoplazmatycznej oocyty; pod koniec oogenezy materiał zawarty w BK przedostaje się do otaczającej cytoplazmy (periplazmy).

3. W rezultacie, zasiedlające periplazmę jądra rozwijającego się zarodka (tzw. blastomery) znajdują się w środowisku bogatym w czynniki związane z obróbką RNA (przebieg wczesnych etapów rozwoju zarodkowego owadów przedstawiono m.in. w publikowanych w PBK artykułach [8,34]).

Za sugerowanym scenariuszem przemawiają również następujące obserwacje:

(1) z badań nad oogenezą płazów wiadomo, że czynniki związane z obróbką RNA są syntetyzowane i magazynowane w ooplazmie [24];

(2) jądra rozwijających się zarodków owadów stają się aktywne transkrypcyjnie dopiero po wędrowaniu do periplazmy (w czasie tworzenia tzw. blastodermi syncytialnej) i w tym właśnie rejonie zarodka syntezy RNA są niewątpliwie znacznie bardziej intensywne niż w centralnie zlokalizowanej masie żółtka.

Dalsze badania powinny odpowiedzieć na następujące, intrygujące pytania: czy funkcje AN innych owadów (a także skorupiaków i wijów) jest podobna? oraz w jaki sposób czynniki związane z obróbką RNA transportowane są do periplazmy tych gatunków owadów, których oocyty pozbawione są AN?

LITERATURA

- [1] ADAMSKA M, BILIŃSKI SM. Microtubules are responsible for the asymmetrical distribution of organelles in the oocytes of the hymenopteran, *Chrysis ignita*. *Folia Histochem Cytobiol* 1997; **35**: 221–225.
- [2] ALLIEGRO MC, ALLIEGRO MA. A nuclear protein regulated during the transition from active to quiescent phenotype in cultured endothelial cells. *Dev Biol* 1996; **174**: 288–297
- [3] ALLIEGRO MC, ALLIEGRO MA. Identification of a new coiled body component. *Exp Cell Res* 1996; **227**: 386–390
- [4] ANDRADE LEC, CHAN EKL, RAŠKA I, PEEBLES CL, ROOS G, TAN EM. Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *J Exp Med* 1991; **173**: 1407–1419
- [5] ANDRADE LEC, TAN EM, CHAN EKL. Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 1947–1951
- [6] BILIŃSKI SM. Formation and function of accessory nuclei in the oocytes of the bird louse, *Eomenacanthus stramineus* (Insecta, Mallophaga). I. Ultrastructural and histochemical studies. *Chromosoma* 1989; **97**: 321–326
- [7] BILIŃSKI SM. Are accessory nuclei involved in the establishment of developmental gradients in hymenopteran oocytes? Ultrastructural studies. *Roux Arch Dev Biol* 1991; **199**: 423–426
- [8] BILIŃSKI SM. Powstawanie i depozycja matczynych czynników rozwojowych w oocytach bezkręgowców. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 23–34
- [9] BILIŃSKI SM, JANKOWSKA W. Oogenesis in the bird louse *Eomenacanthus stramineus* (Insecta, Mallophaga). I. General description and structure of the egg capsule. *Zool Jahrb Abt Anat Ontog Tiere* 1987; **116**: 1–12
- [10] BILIŃSKI SM, KLAG J, KUBRAKIEWICZ J. Morphogenesis of accessory nuclei during final stages of oogenesis in *Cosmoconus meridionator* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Roux Arch Dev Biol* 1993; **203**: 100–103

- [11] BILIŃSKI SM, KLAG J, KUBRAKIEWICZ J. Subcortical microtubule network separates the periplasm from the endoplasm and is responsible for maintaining the position of accessory nuclei in hymenopteran oocytes. *Roux Arch Dev Biol* 1995; **205**: 54–61
- [12] BILLEN J. Ultrastructure of the worker ovarioles in *Formica* ants (*Hymenoptera: Formicidae*). *Int J Insect Morphol Embryol* 1985; **14**: 21–32
- [13] BLOCHMANN F. Über die Reifung der Eier bei Ameisen und Wespen. *Festschrift. Naturh. Med. Verein Heilderberg* 1886
- [14] BRASCH K, OCHS RL (1992) Nuclear bodies (Nbs): a newly rediscovered organelle. *Exp Cell Res* 1992; **202**: 211–223
- [15] BÜNING J. The Insect Ovary. Ultrastructure, Previtellogenic Growth and Evolution. Chapman & Hall, London 1994
- [16] CAJAL SR. Un sencillo metodo de coloracion seletiva del reticulo protoplasmico y sus efectos en los diversos organos nervisos de vertebrados e invertebrados. *Trab Lab Invest Biol (Madrid)* 1903; **2**: 129–221
- [17] CALLAN HG, GALL JG, MURPHY C. Histone genes are located at the sphere loci of *Xenopus* lampbrush chromosomes. *Chromosoma* 1991; **101**: 245–251
- [18] CASSIDY JD, KING RC. Ovarian development in *Habrobracon juglandis* (Ashmead) (*Hymenoptera: Braconidae*): I. The origin and differentiation of the oocyte-nurse cell complex. *Biol Bull* 1972; **143**: 483–505
- [19] CARMO-FONSECA M, TOLLERVEY D, PEPPERKOK R, BARABINO S, MERDES A, BRUNNER C, ZAMORE PD, GREEN MR, HURT E, LAMOND AI. Mammalian nuclei contain foci which are highly enriched in components of the pre-mRNA splicing machinery. *EMBO J* 1991; **10**: 195–206
- [20] CARMO-FONSECA M, PEPPERKOK R, SPROAT BS, ANSORGE W, SWANSON MS, LAMOND AI. *In vivo* detection of snRNP-organelles in the nuclei of mammalian cells. *EMBO J* 1991; **10**: 1863–1873
- [21] CARMO-FONSECA M, PEPPERKOK R, CARVALHO MT, LAMOND AI. Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6 and U5 snRNPs in coiled bodies. *J Cell Biol* 1992; **117**: 1–14
- [22] CZYŻYK J, Podłoże zjawisk autoimmunologicznych. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 55–71
- [23] DEMINA NI. Development of accessory nuclei in oocytes of some Hymenoptera (in Russian). *Dokl Akad Nauk SSSR* 1989; **304**: 1237–124
- [24] FORBES DJ, KORNBERG TB, KIRSCHNER MW. Small nuclear RNA transcription and ribonucleoprotein assembly in early *Xenopus* development. *J Cell Biol* 1983; **97**: 62–72
- [25] FREY MR, MATERA AG. Coiled bodies contain U7 small nuclear RNA and associate with specific DNA sequences in interphase human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 5915–5919
- [26] FU XD, MANIATIS T. Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature* 1990; **343**: 437–441
- [27] GALL JG. Spliceosomes and snurposomes. *Science* 1991; **252**: 1499–1500
- [28] GALL JG, STEPHENSON EC, ERBA HP, DIAZ MO, BARSACCHI-PILONE G. Histone genes are located at the sphere loci of newt lampbrush chromosomes. *Chromosoma* 1981; **84**: 159–171
- [29] GALL JG, TSVETKOV A, WU Z, MURPHY C. Is the sphere organelle/coiled body a universal nuclear component? *Dev Gen* 1995; **16**: 25–35
- [30] GOLDSTEIN P. Accessory nuclei in female *Ascaris suum*. *J Parasitol* 1981; **67**: 697–701
- [31] HALKKA L. Ultrastructural changes and kinetic relationship of the secondary nucleolus and nuclear bodies in previtellogenic oocytes of the dragonfly *Cordulia aenea*. *Hereditas* 1981; **95**: 259–268
- [32] HOPKINS CR. The histochemistry and fine structure of the accessory nuclei in the oocyte of *Bombus terrestris*. *Q J Microsc Sci* 1964; **105**: 475–480

- [33] KING PE, FORDY MR. The formation of accessory nuclei in the developing oocytes of the parasitoid hymenopterans *Ophion luteus* (L.) and *Apantheles glomeratus* (L.). *Z Zellforsch* 1970; **109**: 158–170
- [34] KLAG J. Komórki linii płciowej – nośniki nieśmiertelności. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 87–96
- [35] KLAG J, BILIŃSKI SM. Germ cell cluster formation and oogenesis in the hymenopteran *Coleocentrus soldanskii*. *Tissue & Cell* 1994; **26**: 699–706
- [36] KUBRAKIEWICZ J. Ovary structure and oogenesis of *Polyxenus lagurus* (L.) (*Diplopoda*, *Pselaphognatha*). An ultrastructural study. *Zool Jb Anat* 1991; **121**: 81–93
- [37] KUBRAKIEWICZ J, ADAMSKI RT, BILIŃSKI SM. Ultrastructural studies on accessory nuclei in developing oocytes of the crustacean *Siphonophanes grubei*. *Tissue & Cell* 1991; **23**: 903–907
- [38] MEYER GF, SOKOLOFF S, WOLF BE, BRAND B. Accessory nuclei (nuclear membrane balloons) in the oocytes of the dipteran *Phryne*. *Chromosoma* 1979; **75**: 89–99
- [39] MONNERON A, BERNHARD W. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastruct Res* 1969; **27**: 266–288
- [40] NICKERSON JA, BLENCOWE BJ, PENMAN S. The architectural organisation of nuclear metabolism. In: International review of cytology, Vol 162A, Academic Press 1995, str. 67–123
- [41] PALEVODY C. Presence de noyaux accessoires dans l'ovocyte du Collembole *Folsomia candida* Willem (Insecte Apterygote). *CR Acad Sci* 1972; **274**: 3258–3261
- [42] RAŠKA I, ANDRADE LEC, OCHS RL, CHAN EKL, ROOS G, TAN EM. Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp Cell Res* 1991; **195**: 27–37
- [43] ROTH MB. Spheres, coiled bodies and nuclear bodies. *Curr Op Cell Biol* 1995; **7**: 325–328
- [44] SPECTOR DL. Higher order nuclear organization: Three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 1990; **87**: 147–151
- [45] SZKLARZEWICZ T, BILIŃSKI SM, KLAG J, JABŁOŃSKA A. Accessory nuclei in the oocytes of the cockoo wasp, *Chrysis ignita* (Hymenoptera: Aculeata). *Folia Histochem Cytopbiol* 1993; **31**: 227–231
- [46] TUMA R, STOLK JA, ROTH MB. Identification and characterization of a sphere organelle protein. *J Cell Biol* 1993; **122**: 767–773
- [47] VAN DRIEL R, WANSIK DG, VAN STEENSEL B, GRANDE MA, SCHUL W, DE JONG L. Nuclear domains and the nuclear matrix. In: International review of cytology, Vol 162A, Academic Press 1995, str. 151–189
- [48] WILCZYŃSKI G, ROWIŃSKI J, SULIKOWSKA-ROWIŃSKA A. Ultrastructural components of the nuclei of undifferentiated crypt base cells in the human small intestine – stereological estimation of volumes. *Folia Histochem Cytopbiol* 1996; **34**: 37–38
- [49] WU C-HH, GALL JG. U7 small nuclear RNA in C snurposomes of the *Xenopus* germinal vesicle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 6257–6259
- [50] WU Z, MURPHY C, CALLAN HG, GALL JG. Small nuclear ribonucleoproteins and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in the amphibian germinal vesicle: loops, spheres and snurposomes. *J Cell Biol* 1991; **113**: 465–483
- [51] WU Z, MURPHY C, GALL JG. Human p-80 coilin is targeted to sphere organelles in the amphibian germinal vesicle. *Mol Biol Cell* 1994; **5**: 1119–1127
- [52] ZAWADZKA M. Distribution of accessory nuclei in the oocytes of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Folia biol* (Kraków) 1996; **44**: 61–66
- [53] ZISSLER D, SANDER K. The cytoplasmic architecture of the insect egg cell. In: Insect Ultrastructure. Vol. 1. King RC, Akai H [Eds], Plenum Press, New York 1982; str. 189–221.

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 pracą z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w ostatnich dwóch latach w czasopiśmie figurującym w Current Content bądź Medline.

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

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 (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszcza:

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

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

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

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. 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. 591) przyspieszy publikację. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji 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, informacje o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić 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 doby. 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 wysłana do innej redakcji.	tak	nie	tak	nie
Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	tak	nie	tak	nie
Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn.	tak	nie	tak	nie

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postępie Biologii Komórki" przechodzi na własność redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

podpis

TREŚĆ

ORKISZ S.: Wybrane metody badania struktury i funkcji jądra komórkowego	1
GODULA J.: Funkcjonalna organizacja osłonki jądrowej	29
PŁYTYCZ B. : Modelowanie DNA w jądrach limfocytów	49
KUBRAKIEWICZ J.: Strategie gromadzenia rRNA w komórkach jajowych zwierząt	65
SAKOWICZ T.: Sekwencje mikrosatelitarne w genomach roślin	81
ADAMSKA M., BILIŃSKI S. M.: Domeny jądrowe zawierające sn RNP – struktura i aktualne poglądy na funkcje	93
Komunikaty	103
Wskazówki przygotowania rysunków	104

Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1998

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1998 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka
99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 1998:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 60 zł,
a dla odbiorców indywidualnych 20 zł.

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 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705