

36

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 25 NR-3'98
(313–484)

Postępy Biologii Komórki

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

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

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

Wincenty KILARSKI (mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

JACEK KUŹNICKI (biologia molekularna, biochemia – *Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*),

Jan MICHEJDA (szlaki informacyjne, błony komórek, energetyka komórki – *Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

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

Rada Redakcyjna – 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.

© 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. 13,25. Ark. druk. 10,75. Podpisano do druku w kwietniu 1998 r. Druk ukończono w maju 1998 r.

W tym Zeszycie

- W „Postęпах Biologii Komórki” ukazało się kilka artykułów na temat apoptozy: t. 22, 247, 1995; t. 23, 299, 1996; t.24, 561, 1997. Kolejny artykuł znajdzie Czytelnik na stronie 315 obecnego zeszytu.
- Septyny stanowią rodzinę białek występujących w komórkach wszystkich dotychczas przebadanych eukariontów. Białka te zdają się być zaangażowane w cytokinezę, ale także w inne procesy, takie jak np. gojenie rany czy przywieranie komórek do podłoża w punktach adhezji (artykuł na str. 335).
- Wirusy *Papilloma* (PV), szczególnie ludzkie wirusy PV, są badane w wielu ośrodkach na świecie. Wiąże się to z udziałem tych wirusów w patogenezie schorzeń skóry, błon śluzowych jamy ustnej i gardła oraz narządów płciowych. W genomie wirusów można wyróżnić region wczesny (E) kodujący białka niezbędne w transformacji nowotworowej komórek gospodarza. Bliższe szczegóły znajdzie Czytelnik na str. 379.
- W artykule na str. 403 Autor dyskutuje mechanizm rozdzielania par chromatyd w mitozie albo par chromosomów homologicznych w mejozie. Mechanizm ten wyklucza możliwość, że dwaj partnerzy jednej pary przejdą do tego samego bieguna wrzeciona mitotycznego. Proste schematy w tekście ułatwiają zrozumienie doświadczeń cytowanych autorów.
- W badaniach nad adaptacją do stresu oksydacyjnego u drożdży wykazano ogromną różnorodność możliwych dróg odpowiedzi komórkowej (przegląd na str. 429). Są one w wielu miejscach zbieżne z reakcjami na inne toksyczne czynniki i niekorzystne warunki.
- Na stronie 449 Czytelnik znajdzie kolejny artykuł o Rysbazach – rybonukleazach o specjalnym działaniu biologicznym u zwierząt i ludzi (poprzedni artykuł był w PBK t. 25, 51, 1998). Przez chemiczne sprzężenie RN-az z przeciwciałami otrzymuje się immunotoksyny o wybiórczej cytotoksyczności w stosunku do komórek. Angiogenina jest homologiem trzustkowej RN-azy i pobudza proliferację naczyń krwionośnych.



APOPTOZA – ŚMIERĆ WARUNKUJĄCA ŻYCIE

APOPTOSIS – DEATH AS CONDITION OF LIFE

Tomasz MOTYL

Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Weterynaryjny SGGW, Warszawa

Streszczenie: Pomimo licznych badań, molekularny mechanizm apoptozy wciąż nie jest dobrze poznany. Proces apoptozy może być podzielony na trzy następujące po sobie fazy: wzbudzenia, wykonawczą i zniszczenia. O ile faza wzbudzenia zależy od czynnika wywołującego apoptozę, to fazy: wykonawcza i zniszczenia wydają się być wspólne dla wszystkich procesów apoptotycznych. W niniejszym artykule skupiono uwagę przede wszystkim na mechanizmie i regulacji apoptozy na podstawie danych literaturowych i częściowo własnych obserwacji. Te ostatnie dotyczyły głównie roli białek z rodziny Bcl-2 w regulacji apoptozy oraz wpływu hormonów, czynników wzrostowych, reaktywnych form tlenu oraz głodzenia na ekspresję *bcl-2* i *bax* w różnych typach komórek, np. mysiej białaczce limfatycznej linii L1210, nabłonku gruczołu mlekowego myszy linii HC11, mioblastach szczurzych linii L6.

Słowa kluczowe: apoptoza, programowana śmierć komórki, czynna śmierć komórki, Bcl-2

Summary: In spite of many studies, the molecular mechanism of apoptosis still remains obscure. The process of apoptosis can be subdivided into three different phases: initiation, effector and degradation. Whereas the initiation stage depends on the type of apoptosis-inducing factor, the effector and degradation stages are common to all apoptotic processes. In this article the attention was focused on the mechanism and regulation of apoptosis basing on literature data and partially on own observations. The latter concerned mainly the role of Bcl-2 family proteins in the regulation of apoptosis and the influence of hormones, growth factors, reactive oxygen species and starvation on *bcl-2* and *bax* expression in various cell types i.e. mouse lymphocytic leukaemic cell line L1210, mouse mammary epithelial cell line HC11, rat skeletal myoblast L6.

Key words: Apoptosis, programmed cell death, active cell death, Bcl-2

Apoptoza jest fizjologiczną, programowaną, czynną, samobójczą bądź altruistyczną śmiercią komórki. Te synonimy bywają stosowane zamiennie w literaturze naukowej i popularnonaukowej. Nazwa wywodzi się z greckiego źródłosłowa *apo-*

*Niniejsza praca została sfinansowana z grantu KBN nr 50102020030

ptosis, co oznacza spadanie lub opadanie, tak jak opadanie płatków kwiatowych lub też liści z drzew jesienią. Termin ten został zaproponowany przez australijsko-szkocką grupę badaczy: Kerra, Wyllie i Currie w 1972 r. dla podkreślenia naturalnego, fizjologicznego charakteru tego zjawiska. Po tym odkryciu nastąpiła dziesięcioletnia, względna cisza w literaturze naukowej. Renesans badań nad apoptozą nastąpił w latach osiemdziesiątych, lecz prawdziwa eksplozja prac w tym zakresie to lata dziewięćdziesiąte, a zwłaszcza 1995 i 1996 r., w których zanotowano po kilka tysięcy publikacji związanych tematycznie z tym fenomenem. Jest to w tej chwili chyba najmodniejszy i najlepiej finansowany temat w naukach przyrodniczych. Odkrycie apoptozy pozwoliło na osiągnięcie nowej jakości w poznaniu biologii komórki, otwierając nowe możliwości dla interpretacji starych badań i dynamicznego rozwoju nowych. Ogromna liczba prac z zakresu apoptozy i uznanie wielu danych za ogólnie przyjęte stanowią przyczynę skąpego cytowania w niniejszym opracowaniu, ograniczającego się wyłącznie do kluczowych bądź najnowszych pozycji.

WYSTĘPOWANIE I FIZJOLOGICZNE ZNACZENIE APOPTOZY

Apoptoza jest procesem przeciwstawnym w stosunku do mitozy i wspólnie z nią decyduje o liczbie komórek w każdej populacji. Wynika stąd ogromne znaczenie apoptozy w embriogenezie, wzroście i rozwoju narządów oraz ich inwolucji. Klasycznym przykładem programowanej śmierci komórki u zwierząt niższych jest apoptoza 131 komórek spośród 1090 początkowych, podczas rozwoju nicienia *Caenorhabditis elegans*. U tego jednomilimetrowego organizmu poznano wszystkie kluczowe geny, których białkowe produkty uczestniczą w regulacji apoptozy (patrz Mechanizm i regulacja apoptozy). Innym typowym przykładem apoptozy w rozwoju kręgowców niższych jest śmierć komórek ogona kijanki w procesie metamorfozy. Istnieje wiele przykładów apoptozy w rozwoju osobniczym ssaków, w tym także człowieka, m.in.: śmierć blisko połowy neuronów powstających w trakcie embriogenezy w rozwoju układu nerwowego, apoptotyczna śmierć komórek soczewki oka w czasie jej kształtowania czy zanik błony pławnej między palcami u zarodka ludzkiego. W życiu postnatalnym występuje: apoptoza keratynocytów skóry, komórek krypt jelitowych, komórek endometrium macicy w czasie menstruacji, komórek nabłonka wydzielniczego gruczołu mlekowego w trakcie inwolucji, spermatogonii podczas różnicowania oraz uszkodzonych plemników, limfocytów T nie wytwarzających funkcjonalnego receptora lub atakujących własne tkanki, a także pobudzonych limfocytów T z chwilą zaniku infekcji.

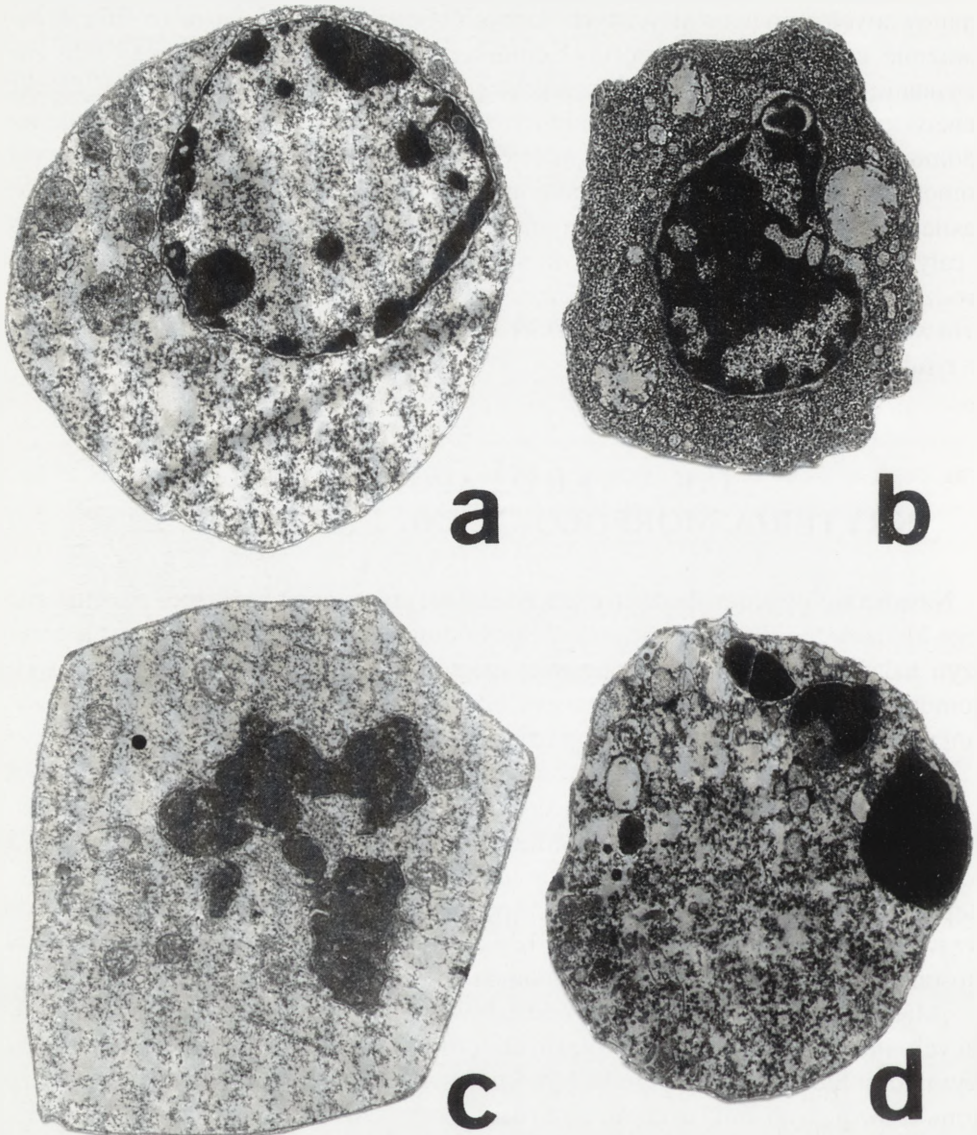
Należy podkreślić kluczową rolę apoptozy w eliminacji komórek uszkodzonych, zmutowanych i preneoplastycznych, których tysiące powstają każdego dnia w organizmie człowieka i zwierzęcia. Komórki z uszkodzonym DNA podlegają zatrzymaniu w fazie G₁ cyklu komórkowego i o ile nie zostanie usunięty defekt genetyczny, włączają program samounicestwienia. Wraz ze starzeniem się organizmu zdolność wywoływania apoptozy maleje i komórki zmutowane wchodzi w cykl komórkowy dając nieprawidłowe potomstwo. Wyjaśnia to przynajmniej częściowo nasilenie nowotworzenia w starszym wieku. Na podstawie poniższych danych można z całym przekonaniem stwierdzić, iż apoptoza jako śmierć jednostkowa jest dobrodziejstwem dla organizmu wielokomórkowego, pozwalającym na jego przeżycie i rozwój. Nie jest więc przesadne stwierdzenie: „śmierć warunkująca życie” użyte w tytule niniejszego opracowania.

JAK WYKRYĆ APOPTOZĘ? KRYTERIA MORFOLOGICZNE I MOLEKULARNE

Nasuwa się pytanie: dlaczego przez tyle lat nie potrafiono rozpoznać i zdefiniować tego kluczowego dla życia zjawiska? Spośród najbardziej prawdopodobnych przyczyn należy wymienić: występowanie apoptozy w pojedynczych, rozproszonych komórkach, duża szybkość tego procesu, brak reakcji zapalnych oraz skrętne uprzętanie komórek podlegających apoptozie przez makrofagi.

Dotychczas nie osiągnięto porozumienia co do definicji apoptozy, co wynika z bardzo dużej liczby czynników i dróg prowadzących do tej formy śmierci komórkowej. Zgodnie z klasyczną definicją zaproponowaną jeszcze przez Kerr'a i wsp. [17] apoptoza stanowi zespół zmian biochemicznych i morfologicznych występujących w umierającej komórce. Apoptoza, jako śmierć czynna wymagająca w swym przebiegu syntezy RNA i białka, jest alternatywną formą śmierci w stosunku do martwicy, która jest śmiercią przypadkową – bierną.

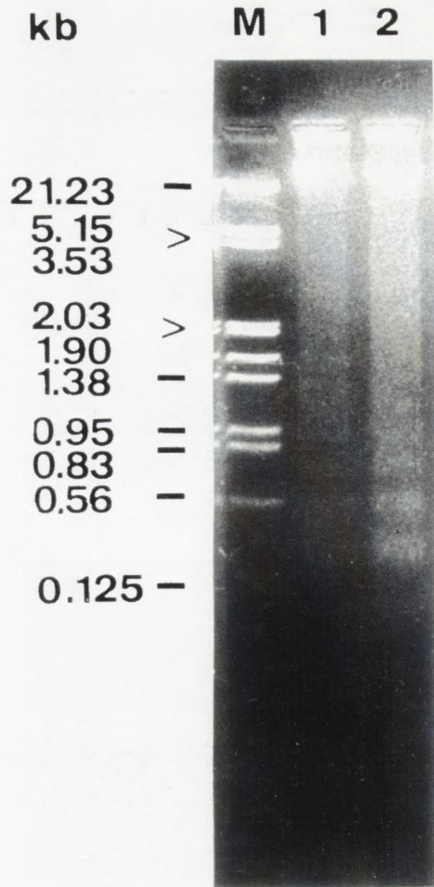
Martwica powstaje w wyniku oddziaływania na komórkę bodźców uszkadzających, np. chemicznych czy fizycznych, prowadzących zawsze do zniesienia integralności błony komórkowej. W wyniku tego dochodzi do zaburzenia homeostazy komórkowej (izoosmii, izojonii, izohydrii), pęcznienia komórki i organelli, w następstwie ich destrukcji i wydostawania się zawartości poza komórkę, co w konsekwencji prowadzi do reakcji zapalnych. Apoptoza w porównaniu z martwicą jest śmiercią cichą, która w organizmie wielokomórkowym nie pozostawia śladu po sobie. Przede wszystkim komórka, która spontanicznie włączy program śmierci bądź została zmuszona do tego, oddziela się od pozostałych komórek i obkurcza się tracąc pewną ilość wody. Stąd pochodzi pierwotna nazwa apoptozy – *shrinkage necrosis*. Na powierzchni komórki pojawiają się liczne pofałdowania, które pod



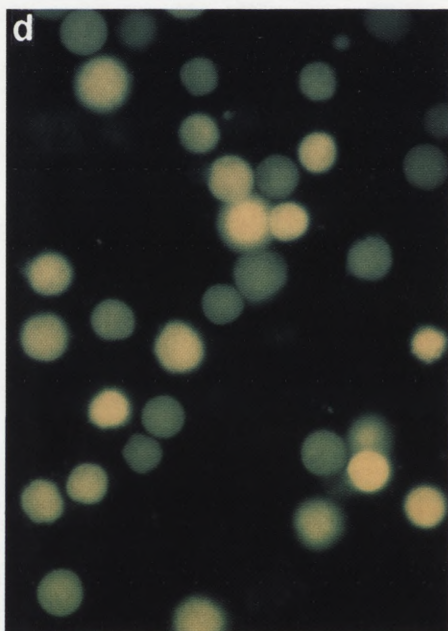
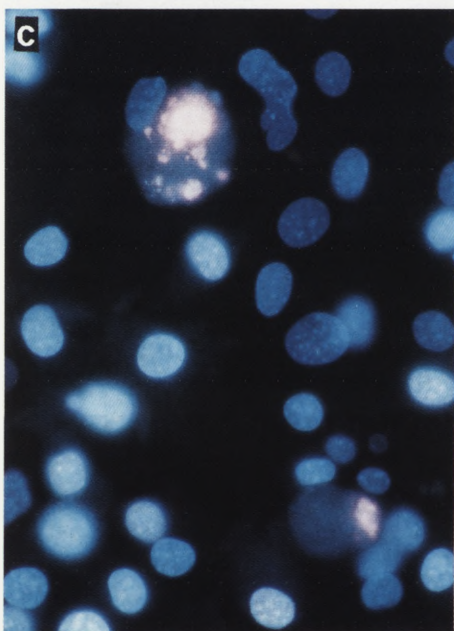
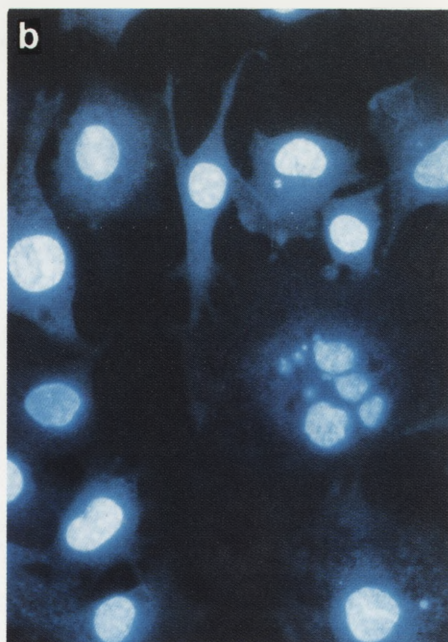
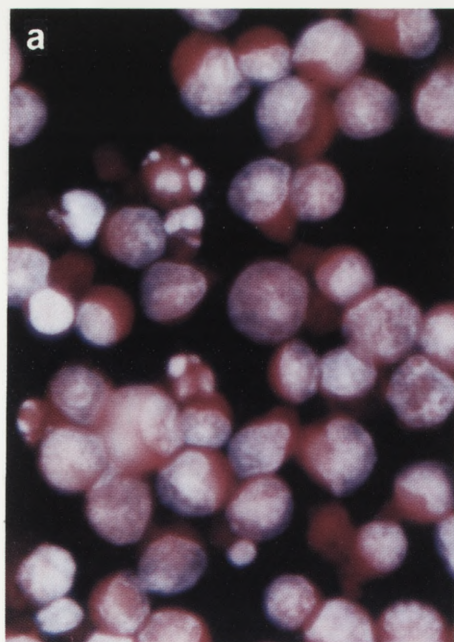
RYSUNEK 1. Zmiany morfologiczne komórek mysiej białaczki limfatycznej linii L1210 poddanych 48-godzinnej inkubacji z TGF- β_1 (1 ng/ml): a – kondensacja chromatyny i jej marginacja w pobliżu błony jądrowej; b – obkurczenie komórki, zagęszczenie cytoplazmy i pyknoza jądra; c, d – fragmentacja jądra komórkowego i wtórne zmiany w cytoplazmie i organellach (mikroskop elektronowy transmisyjny; powiększenie 5000 \times)

mikroskopem skaningowym wyglądają jak bąbelki w czasie gotowania. Jednocześnie dochodzi do zmian w chromatynie jądrowej polegającej na jej zagęszczeniu oraz dalszego zmniejszania objętości komórki. Zagęszczona chromatyna gromadzi się początkowo w pobliżu błony jądrowej (rys. 1a), po czym zaczyna wypełniać całe jądro, które staje się pyknotyczne (rys. 1b). Cytoplazma jest zbita, z gęsto upakowanymi organellami. W dalszym etapie destrukcji apoptotycznej dochodzi do fragmentacji jądra komórkowego (rys. 1c) oraz powstawania tzw. ciał apoptotycznych, zbudowanych z fragmentów zagęszczonej chromatyny i cytozolu, otoczonych szczelnie błoną komórkową. Dzięki dodatkowym wiązaniom pomiędzy białkami błonowymi tworzy się nierozpuszczalna osłona stabilizująca integralność najpierw całej komórki apoptotycznej, a później ciał apoptotycznych, nie pozwalająca na wydośtawianie się zawartości komórki na zewnątrz i powstawanie odczynów zapalnych. W warunkach fizjologicznych komórki podlegające apoptozie są fagocytowane nie pozostawiając po sobie żadnego śladu. W warunkach sztucznych, jakimi są hodowle komórkowe, wobec braku komórek fagocytujących komórki apoptotyczne ulegają wtórnej martwicy (rys. 1d).

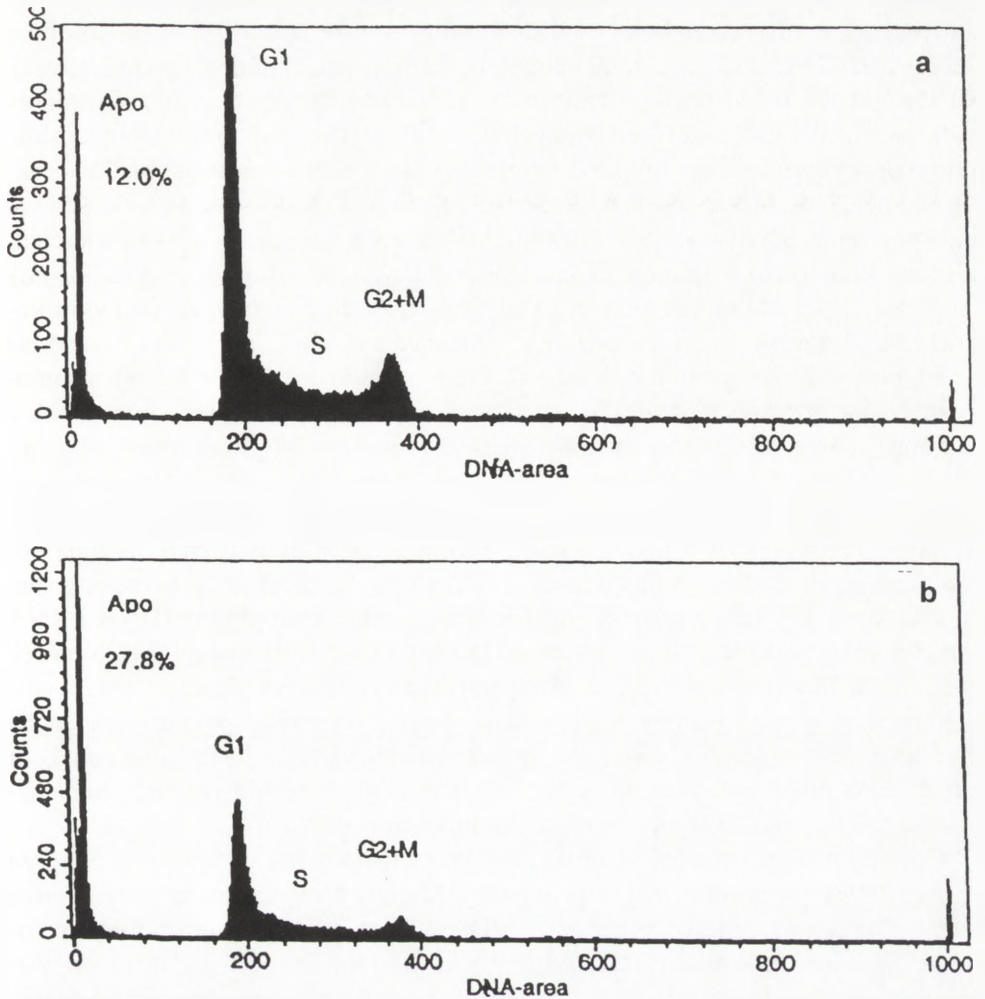
Do molekularnych kryteriów pozwalających na odróżnienie apoptozy od nekrozy jest fragmentacja DNA, którą można wykryć w postaci charakterystycznej „drabinki” fragmentów DNA zawierających 180–200 par zasad i wielokrotność tej liczby, stosując elektroforezę DNA na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. Na rysunku 2 przedstawiono fragmenty DNA izolowanego z komórek białaczki mysiej linii L1210 poddanych oddziaływaniu TGF- β_1 – transformującego czynnika wzrostowego β_1 . Martwica w odróżnieniu od apoptozy przejawia się przypadkową frag-



RYSUNEK 2. Fragmentacja DNA komórek mysiej białaczki limfatycznej linii L1210 poddanych 48-godzinnej inkubacji z TGF- β_1 : M – λ DNA *EcoRI Hind III* (marker wielkości); 1 – pożywka kontrolna (2% FCS/RPMI-1640); 2 – pożywka kontrolna + TGF- β_1 (1 ng/ml)



RYSUNEK 3. a – nasilona apoptoza komórek mysiej białaczki limfatycznej linii L1210, utrzymywanych przez 48 h w pożywce RPMI-1640 pozbawionej FCS (komórki barwiono DAPI i sulforodaminą); b,c – apoptoza i wtórna martwica komórek nabłonka gruczołu mlekowego myszy linii HC11 poddanej oddziaływaniu DFMO – inhibitora ODC przez 24 h w pożywce 10% FCS/DMEM (DNA komórek żywych i apoptotycznych zachowujących integralność błony komórkowej wybarwiony został fluorochromem Hoechst 33342, dającym w świetle UV niebieską fluorescencję, natomiast DNA komórek wykazujących cechy późnej apoptozy i martwicy wybarwiony został jodkiem propydydny dającym czerwoną fluorescencję w świetle UV); d – reaktywne formy tlenu w komórkach mysiej białaczki limfatycznej linii L1210 poddanych działaniu AAPH (2mM) – inicjatora wolnego rodnika nadtlenkowego przez 1h (zielonożółta fluorescencja powstała w wyniku utleniania dioctanu 6-karboksy- 2'7'-dichlorodihydro-fluoresceiny)



RYSUNEK 4. Histogramy DNA kultury komórek mysiej białaczki limfatycznej linii L1210 utrzymywanych przez 48 h w pożywce RPMI-1640 bez FCS (komórki prezentowane na rys. 3a): a – komórki niepłukane, b – komórki płukane buforem fosforanowo-cytrynianowym (pH = 7,8, 30 min)

mentacją DNA, co daje na elektroforogramie smugę równomiernie rozsmarowanych fragmentów DNA. Jednakże nie we wszystkich przypadkach apoptozy można zaobserwować międzynukleosomalną fragmentację DNA (180–200 par zasad). Często z niewiadomych przyczyn komórka poprzestaje na pocięciu DNA na duże odcinki: 300 i 50 tys. par zasad. Tego typu fragmentacji nie można wykryć elektroforezą tradycyjną, tylko pulsacyjną [30, 40].

Fragmentacja DNA w procesie apoptozy jest przyczyną zmniejszonej jego zawartości w komórce, co wykorzystano do ilościowej oceny apoptozy, stosując pomiar fluorescencji DNA związanego z fluorochromami metodą cytometrii przepływowej. Na rysunku 3a przedstawiono zdjęcie z mikroskopu fluorescencyjnego komórek białaczki mysiej linii L1210 głodzonych przez 48 godzin, w których DNA zostało następnie wybarwione diamidino-2-fenylindolem (DAPI), natomiast białko – sulforodaminą. Nasiloną apoptozą widoczna na zdjęciu została przedstawiona ilościowo na histogramie DNA w postaci hipodiploidalnego szczytu „sub- G_1 ”, odzwierciedlającego komórki o najmniejszej koncentracji DNA (rys. 4a). W przypadku gdy apoptoza dotyczy komórek znajdujących się w fazie S, a zwłaszcza G_2 cyklu komórkowego, szczyt „sub- G_1 ” może nie oddzielać się od G_1 , lecz wręcz nakładać się na niego. Aby tego uniknąć i uzyskać odpowiedni rozdział komórek apoptotycznych od komórek w fazie G_1 , stosuje się wyplukiwanie fragmentów DNA z komórek podlegających apoptozie buforem fosforanowo-cytrynianowym (rys. 4b). Zgodnie z Darzynkiewiczem i wsp. [7] metoda ta pozwala na równoczesną ocenę ilościową apoptozy i cyklu komórkowego z zastosowaniem cytometrii przepływowej oraz fragmentacji DNA z zastosowaniem technik elektroforetycznych. Metodą pozwalającą na ilościową ocenę komórek żywych oraz komórek o cechach wczesnej i późnej apoptozy oraz martwicy jest barwienie jodkiem propidyny (DNA i RNA komórek martwych) oraz fluorochromem Hoechst 33342, barwiącym DNA komórek żywych i apoptotycznych, lecz z różną intensywnością (rys. 3b,c).

Metodą cytometrii przepływowej można również wykrywać pęknięcia łańcucha DNA charakterystyczne dla apoptozy przez wbudowywanie dUTP sprzężonego z fluoresceiną lub digoksygeniną w łańcuch DNA w miejscach pęknięć, przy zastosowaniu terminalnej transferazy lub polimerazy DNA [9].

Opisane powyżej zmiany w strukturze DNA i metody ich wykrywania odnoszą się do ostatniej – destrukcyjnej fazy apoptozy. Metodą pozwalającą na wcześniejszą diagnostykę apoptozy jest wykrywanie fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórki. W zdrowej komórce fosfatydyloseryna wbudowana jest wyłącznie w wewnętrzną warstwę błony komórkowej. Sygnał apoptotyczny powoduje przeniesienie tego fosfolipidu na powierzchnię, przez co komórka może być rozpoznana przez makrofaga i sfagocytowana. Do wykrywania fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej wykorzystywana jest, zależna od Ca^{2+} , aneksyna V sprzęgnięta np. z fluoresceiną.

Bardzo charakterystycznym objawem efektorowej fazy apoptozy jest spadek mitochondrialnego potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi_m$), co prowadzi do uwolnienia czynnika indukującego apoptozę (AIF) z mitochondriów [18]. Zmiany $\Delta\Psi_m$ mogą być wykryte przez zastosowanie kolejnego fluorochromu – rodaminy 123, która gromadzi się w mitochondriach żywych komórek przy wysokim $\Delta\Psi_m$. Spadek $\Delta\Psi_m$ w czasie apoptozy prowadzi do zmniejszenia koncentracji rodaminy 123 w mitochondriach,

co przejawia się obniżeniem intensywności zielonej fluorescencji w odczycie cytometrycznym.

Wielu procesom apoptotycznym towarzyszy wzrost koncentracji reaktywnych form tlenu (ROS – *reactive oxygen species*) w komórce, co można wykryć badając utlenianie diocjanu 6-karboksy-2'7'-dichlorodihydrofluoresceiny przez zmiany intensywności jego fluorescencji (rys. 3d).

CZYNNIKI WYWOŁUJĄCE APOPTOZĘ

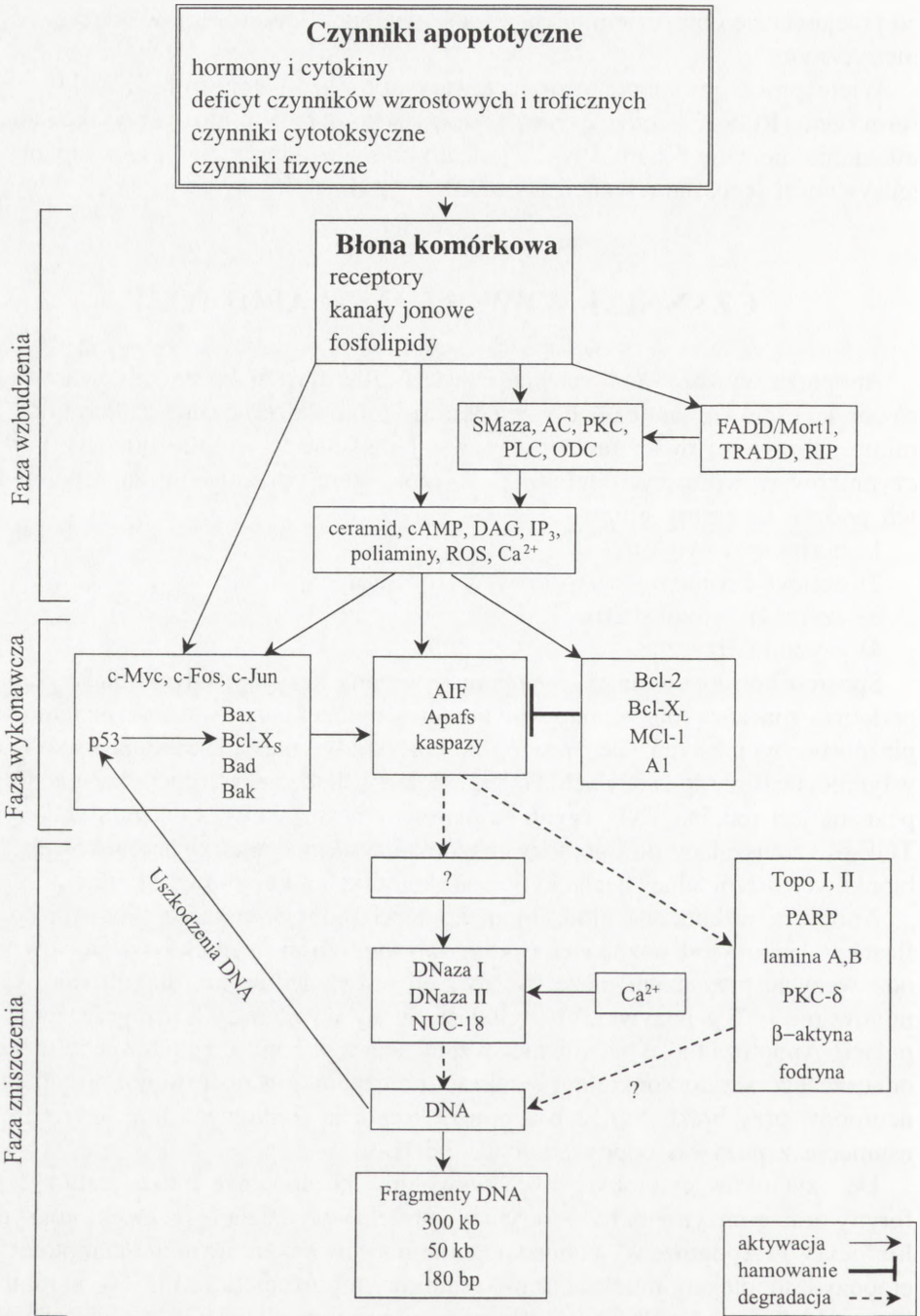
Apoptoza wywoływana jest przez dużą liczbę czynników zróżnicowanych zarówno jakościowo, jak też pod względem sposobu oddziaływania na komórkę. Pomimo olbrzymiej ilości prac, nie powstał dotychczas ogólnie przyjęty podział czynników wywołujących apoptozę. W niniejszym opracowaniu zaproponowano ich podział na cztery grupy:

- 1) hormony i cytokiny,
- 2) deficyt czynników wzrostowych i troficznych,
- 3) czynniki cytotoksyczne,
- 4) czynniki fizyczne.

Śpośród hormonów należy wymienić hormony tarczycy, odgrywające prawdopodobnie znaczącą rolę w apoptozie komórek ogona kijanki w czasie metamorfozy płazów bezogoniastych, jak również glikokortykoidy – klasyczne induktory apoptozy w tymocytach czy splenocytach. Wśród cytokin wzbudzających apoptozę najbardziej poznana jest rodzina TNF (czynnika martwicy nowotworu), a także wszędobylski TGF- β_1 , zmuszający do apoptozy przede wszystkim komórki nabłonkowe, śród-błonkowe, limfoidalne, hepatocyty oraz komórki prekursorowe krwinek.

Apoptoza wzbudzona głódeniem komórki może wynikać z głódu niespecyficznego, jakim jest pozbawienie komórki większości czynników wzrostowych i odżywczych, przy czym może być to głód bezwzględny, np. długotrwałe wyeliminowanie FCS z pożywki, oraz głód względny wynikający z przegęszczenia populacji. Apoptoza może być również wzbudzana w warunkach głódu specyficznego, odnoszącego się do konkretnej cytokiny lub czynnika wzrostowego, np. apoptoza neuronów przy braku NGF lub apoptoza komórek szpikowych linii 32D i M₁ po usunięciu z pożywki odpowiednio IL-3 i IL-6.

Do czynników cytotoksycznych wywołujących apoptozę można zaliczyć perforyny oraz granzymy A i B – serynowe proteazy wydzielane przez cytotoksyczne limfocyty T. Apoptozę wywołuje wiele inhibitorów enzymów m.in.: kamptotecyna, etopozyd, topotekan, mitoksantron – inhibitory topoizomerazy I i II, H-7 – inhibitor kinazy białkowej C (PKC), α -difluorometyloornityna (DFMO) – inhibitor dekarboksylazy ornitynowej (ODC). Wywoływanie apoptozy jest także celem stosowania



RYSUNEK 5. Schematyczne przedstawienie molekularnego mechanizmu apoptozy i podstaw jego regulacji (objaśnienia w tekście)

leków cytostatycznych w chemioterapii nowotworów, np. antracyklin (adriamycyny, daunomycyny, doxorubicyny). Do czynników cytotoksycznych należy zaliczyć także ROS, które *per se* mogą indukować apoptozę lub też mogą być mediatorami apoptozy wywołanej przez inne czynniki (promieniowanie jonizujące, hipertermię, TGF- β_1 , TNF α , antracykliny).

Do czynników fizycznych wzbudzających apoptozę można zaliczyć promieniowanie jonizujące, hipertermię, a także naprężenia hydrodynamiczne. Te ostatnie mogą mieć istotne znaczenie dla przeżywania komórek w bioreaktorach.

MOLEKULARNY MECHANIZM APOPTOZY I JEGO REGULACJA

W procesie apoptozy można wyróżnić trzy fazy: wzbudzenia, wykonawczą oraz zniszczenia [18]. Bardzo ogólny schemat przebiegu apoptozy z uwzględnieniem powyższych faz przedstawiono na rysunku 5.

Faza wzbudzenia

Duża liczba czynników wywołujących apoptozę oraz ich różnorodność jest przyczyną istnienia wielu indywidualnych dróg wzbudzenia tego procesu. Trudno je opisywać oddzielnie, stąd też w niniejszym opracowaniu posłużono się tylko niektórymi, najbardziej charakterystycznymi bądź poznanymi przykładami. Ciekawym przykładem obrazującym, jak wieloma drogami wzbudzenia apoptozy może posługiwać się pojedyncza komórka układu odpornościowego, jest naturalnie cytotoksyczny limfocyt T. Inicjuje on apoptozę przez:

1) związane z błoną komórkową ligandy: Fas/Apo-1L oraz niedawno odkryty Apo-2L [32],

2) uwalniany z komórki czynnik martwicy nowotworu występujący w dwóch formach: TNF α i TNF β [15],

3) granzymy A i B, będące serynowymi proteazami aktywującymi bezpośrednio inne kluczowe w procesie apoptozy cysteinowe proteazy z rodziny ICE [13] oraz

4) perforynę – białko dziurawiące błonę komórkową i umożliwiająca, przez powstałe pory, wnikanie granzymów oraz Ca²⁺ inicjujących proces apoptozy.

Uszkodzenia błony komórkowej przez perforynę mogą ponadto prowadzić do martwicy komórki. Oddziaływanie cytokin z rodziny TNF na komórki jest przykładem wykorzystania różnych dróg przekazywania sygnału, który może prowadzić zarówno do włączenia programu śmierci, jak też przeżycia [15]. TNF wywołuje apoptozę w komórkach nowotworowych lub zarażonych wirusami, lecz nie zabija komórek zdrowych. Okazuje się, że sygnał śmierci przekazywany jest za pośred-

nictwem tzw. „białek śmierci” wiążących się z cytoplazmatyczną „domeną śmierci” receptora TNF α i Fas/APO1. „Białkami śmierci” są: w przypadku receptora FAS/APO1 – FADD/Mort1 oraz RIP, natomiast dla receptora 1 (p55) TNF – TRADD [3]. Za pośrednictwem tych białek dochodzi do aktywacji sfingomielinazy katalizującej hydrolizę sfingomieliny i wytwarzanie ceramidu, który pełni w ścieżce przekazywania sygnału TNF rolę wtórnego przekaźnika [12]. Ceramid w nieznanym bliżej sposobie prowadzi do aktywacji proteaz cysteinowych z rodziny ICE (*interleukin-1 β converting enzyme*). Warto podkreślić, że ceramid jest także mediatorem apoptozy wywołanej przez promieniowanie jonizujące, glikokortykoidy, IL-1, chemioterapeutyki i prawdopodobnie także przez HIV [12] oraz białko RPR u *Drosophila melanogaster* [34]. Poza „ścieżką śmierci”, którą podąża sygnał wzbudzany przez TNF w komórkach nowotworowych, istnieje również „ścieżka przeżycia”, której wtórnym przekaźnikiem jest diacyloglicerol (DAG), a centralnym ogniwem PKC. Stwierdzono, iż prowadzi ona w komórkach śródbłonna do aktywacji genu A1, *bcl-2*, będącego silnym inhibitorem apoptozy [15].

Własne badania wykazały, że PKC oraz ODC – kluczowy enzym syntezy poliamin są ważnymi ogniwami w systemie przekazywania sygnału wzbudzanego przez TGF- β_1 w komórkach białaczki ludzkiej linii K562 oraz białaczki mysiej linii L1210 [11, 24, 25]. TGF- β_1 hamuje ekspresję i aktywność ODC w badanych liniach białczkowych, co prowadzi do zahamowania wzrostu i wywołania apoptozy. Antyproliferacyjny efekt TGF- β_1 związany jest z obniżeniem ekspresji *c-myc*, aktywności cyklin i kinaz zależnych od cyklin, a także hamowaniem fosforylacji białka Retinoblastoma (Rb) [1, 28, 41]. Ponieważ gen ODC jest pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego *c-Myc* [4], hamowanie ekspresji *c-myc* może być ważnym mechanizmem odpowiedzialnym za spadek ekspresji i aktywności ODC pod wpływem TGF- β_1 [30]. Stwierdzono, iż ester forbolu (TPA), będący silnym aktywatorem PKC i ODC, znosi hamujący wpływ TGF- β_1 na ekspresję i aktywność ODC w komórkach mysiej białaczki limfatycznej linii L1210. Co więcej, znosi on antyproliferacyjny i apoptotyczny efekt TGF- β_1 w tych komórkach. Podobny wpływ wywiera inny aktywator ODC – kwas orotowy (OA), który jest metabolitem pośrednim w biosyntezie nukleotydów pirymidynowych [11]. Z powyższych badań wynika, że PKC i ODC są ważnymi ogniwami w łańcuchu przekazywania sygnału wzbudzanego przez TGF- β_1 , a ich hamowanie prowadzi do zatrzymania komórek w fazie G₁ oraz apoptozy. PKC i ODC należą do antyapoptotycznych enzymów, co potwierdza fakt, że hormony, czynniki wzrostowe i promotory nowotworzenia (OA, TPA) aktywujące PKC i ODC znoszą mitoinhibicyjny i apoptotyczny efekt TGF- β_1 .

Na rolę poliamin jako wtórnych przekaźników sygnału przeżycia lub śmierci wskazują badania z zastosowaniem nieodwracalnego inhibitora ODC – α -difluorometyloornityny (DFMO), wywołującego fragmentację DNA charakterystyczną dla apoptozy w komórkach białaczki L1210 [25] oraz apoptozę komórek nabłonka

wydzielniczego gruczołu mlekowego myszy linii HC-11 (rys. 3b,c). Egzogenna putrescyna (produkt reakcji ODC) częściowo znosi apoptozę wywołaną przez DFMO w komórkach HC-11.

Mediatorami apoptozy są także ROS. Stwierdzono to m.in. w przypadkach apoptozy wywołanej przez: promieniowanie jonizujące, utleniacze, hipertermię, HIV-1, TNF α , NGF, TGF- β_1 . Są dowody wskazujące, iż ROS odgrywają istotną rolę w apoptozie neuronów w przebiegu choroby Parkinsona, Alzheimerera i Huntingtona [8, 31].

Faza wykonawcza

W tej fazie dochodzi do ostatecznego włączenia programu śmierci. Za tę decyzję odpowiedzialnych jest szereg genów, których białkowe produkty bądź stymulują, bądź hamują program apoptozy. Geny regulujące apoptozę zostały dobrze poznane u wspomnianego już nicienia *Caenorhabditis elegans*. Genami wyzwalającymi apoptozę są *ced-3* i *ced-4* natomiast głównym genem hamującym ten proces jest *ced-9*. Geny, których ekspresja wzrasta w czasie fagocytozy przez sąsiadujące komórki, tworzą dwa zestawy: *ced-1*, *ced-6*, *ced-7*, *ced-8* oraz *ced-2*, *ced-5* i *ced-10*. Genem odpowiedzialnym za rozpad komórki jest *nuc-1*. W komórkach zwierząt wyższych i człowieka odpowiednikiem *ced-3* i *ced-4* są geny kodujące odpowiednio ICE (*interleukin-1 β converting enzyme*) i Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*), natomiast odpowiednikiem *ced-9* jest protoonkogen *bcl-2* [39].

Faza wykonawcza wydaje się być wspólną drogą prowadzącą do śmierci komórki i skupiającą wiele indywidualnych ścieżek charakterystycznych dla fazy wzbudzenia. Centralnym punktem skupiającym różne sygnały apoptotyczne są cysteinowe proteazy z rodziny ICE [35] zwane także kaspazami („*caspases*” – *cysteine-dependent aspartate-directed proteases*). Niestety niewiele dotychczas wiadomo o ich substratach, które wykorzystywane są do wywołania apoptozy. Jednym z nich jest prawdopodobnie poli(ADP- rybozo) polimeraza (PARP) zaangażowana w procesy naprawcze DNA, z której pod wpływem Yama/ CPP32 β (kaspaza-3) powstaje fragment o masie 85 kDa, istotny w procesie apoptozy [22]. Potencjalnymi substratami dla proteaz z rodziny ICE są także lamina B1, topoiizomeraza I, II, fodryna i β -aktyna [16]. Ostatnie prace wskazują, że aktywacja kaspaz np. kaspazy-3 zachodzi w obecności tzw. czynników aktywujących apoptozę (*Apafs* – *apoptosis activating factors*), do których należą Apaf-1, będący odpowiednikiem CED-4 u *Caenorhabditis elegans*, Apaf-2 (cytochrom c) oraz Apaf-3 – niezidentyfikowane bliżej białko o masie 45 kDa [39]. W związku z rolą Ca²⁺ w przekaźnictwie sygnału apoptozy badano znaczenie aktywowanych przez Ca²⁺ proteaz cysteinowych – kalpain, spośród których najlepiej poznano μ -kalpainę i m-kalpainę. Aktywacja tych enzymów prowadzi do apoptozy w różnych typach komórek, aczkolwiek ani substraty, ani mechanizm ich działania w umierających komórkach nie został poznany.

Badania Kroemera [18] wskazują, że w fazie wykonawczej apoptozy dochodzi do zaburzenia $\Delta\Psi_m$ w mitochondriach i zwiększenia przepuszczalności błon mitochondrialnych. Prowadzi to do uwalniania z mitochondriów nieznanego bliżej czynnika wywołującego apoptozę (AIF – *apoptosis inducing factor*). Wiadomo, iż nie należy on do proteaz z rodziny ICE. Przypuszcza się aktualnie, że poza AIF, innym apoptogennym czynnikiem uwalnianym z mitochondriów jest cytochrom c (Apaf-2), który związany z czynnikiem lub czynnikami cytozolowymi (prawdopodobnie Apaf-1 i 3) indukuje apoptozę [23]. O dużym znaczeniu AIF przekonuje doświadczenie, w którym wywołano apoptotyczną fragmentację DNA w izolowanych jądrach komórkowych zawieszonych w jednej pożywce wraz z mitochondriami o obniżonym $\Delta\Psi_m$ [18].

Białkami, regulującymi przepuszczalność błon mitochondrialnych, a tym samym uwalnianie AIF z mitochondriów, są białka z rodziny Bcl-2 oraz ich homologi. Należą do niej zarówno białka stymulujące proces apoptozy (Bax, Bad, Bcl-X_S, Bak, Bid, Bik, Hrk), jak i go hamujące (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Brag-1, Mcl-1, A1, BHRF1, E1B 19 kDa). Występują one jako integralne składowe błon: siateczki śródplazmatycznej, okołojądrowej oraz mitochondrialnej. Tworzą one homo- i heterodimery, np.: Bcl-2-Bcl-2, Bax-Bcl-2, Bax-Bax. Stwierdzono, że przewaga homodimerów Bcl-2 decyduje o przeżyciu, podczas gdy przewaga Bax o śmierci komórki. Spośród wszystkich, znanych dotychczas białek komórkowych Bcl-2 jest najsilniejszym inhibitorem apoptozy wywoływanej przez bardzo różne czynniki, np.: promieniowanie jonizujące, hipertermię, deficyt czynników wzrostowych, glikokortykoidy oraz chemioterapeutyki [14].

Własne badania wykazały, iż hamowanie ekspresji *bcl-2* może mieć istotne znaczenie w mechanizmie apoptozy wywołanej przez TGF- β_1 w komórkach mysiej białaczki limfatycznej linii L1210. Podobny efekt TGF- β_1 obserwowano w komórkach śródbłonna żyły pępowinowej [38] oraz komórkach raka jajnika [20]. Stwierdzono ponadto, że nadekspresja *bcl-2* w komórkach białaczki szpikowej blokuje apoptozę wywołwaną przez TGF- β_1 , lecz nie hamuje jego antyproliferacyjnego efektu [37]. Rozpatrując mechanizm antyapoptotycznego działania Bcl-2 należy wziąć przede wszystkim pod uwagę hamowanie uwalniania AIF i cytochromu c z mitochondriów [18]. Przypuszcza się, że Bcl-2 poprzez hamowanie uwalniania cytochromu c (Apaf-2) oraz bezpośrednią interakcję z Apaf-1 (CED-4) blokuje aktywację kaspazy-3 [39]. Strukturalne podobieństwo białek rodziny Bcl-2 z tworzącą pory domeną błonową toksyny błoniczej sugeruje, że białka te tworzą kanały błonowe regulowane przez sygnały zależne od napięcia i pH [27]. Ostatnie badania Grossa i wsp. [10] wykazały, że zarówno Bcl-2, jak i Bax tworzą kanały jonowe w błonach komórkowych o odmiennej przepuszczalności dla poszczególnych jonów: Bcl-2 jest specyficzny dla K⁺, natomiast Bax dla Cl⁻. Nie wiadomo jednak, w jaki sposób zmiany przewodności dla tych jonów mogą zmieniać $\Delta\Psi_m$ oraz uwalnianie AIF i cytochromu c z mitochondriów. Ponadto uważa się, iż białko Bcl-2 blokuje jeden

z krytycznych stopni w przekaznictwie sygnału apoptozy, a mianowicie wpływ Ca^{2+} z mobilnej puli zlokalizowanej w świetle siateczki śródplazmatycznej [21]. Poza wspomnianą już aktywacją kalpain uwalniany z siateczki Ca^{2+} uczestniczy w aktywacji endonukleaz, odpowiedzialnych za fragmentację DNA, modyfikacji ukształtowania chromatyny i w ten sposób w zwiększeniu jej podatności na działanie endonukleaz, a także w bezpośredniej lub pośredniej aktywacji szeregu genów, które włączone są w program śmierci komórki (np. genu kalmoduliny, *c-fos*) lub hamowanie wzrostu (*gadd 153*) [29].

Panuje ogólne przekonanie, iż Bcl-2 jest także przeciwutleniaczem funkcjonującym jako zmiatacz wolnych rodników, zabezpieczający błonowe lipidy przed utlenianiem [14], a także jako białko regulujące aktywność enzymów - przeciwutleniaczy [2]. Uważa się, iż istnieje współzależność między stężeniem ROS a uwalnianiem Ca^{2+} w komórkach, gdyż stres utleniania zwiększa uwalnianie Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej i mitochondriów [21]. Kluczową rolę w tej złożonej współzależności odgrywa prawdopodobnie białko Bcl-2, które dzięki swym właściwościom antyutleniającym zmniejsza uszkodzenia błon mitochondrialnych i śródplazmatycznych powodowane przez ROS, a tym samym mobilizację Ca^{2+} . Potwierdza to fakt, że nadekspresja *bcl-2* chroni komórkę przed apoptozą wywołaną przez ROS [14].

Działanie Bcl-2 w tym względzie odnosi się nie tylko do ROS powstających w samej komórce, lecz także ROS pochodzenia egzogenego. Ostatnie własne prace wykazały, że inicjator wolnego rodnika nadtlenkowego – AAPH podany do kultury komórek mysiej białaczki limfatycznej linii L1210, zwiększa stężenie wolnych rodników w komórce (rys. 3d), wzbudza apoptozę, a także zwiększa koncentrację białka Bcl-2 w komórkach przeżywających [26, 42]. Zjawisko to może wynikać z naturalnej selekcji komórek i przeżywania tych o największych zdolnościach przeciwutleniających. Nie można wykluczyć też możliwości adaptacji komórki do zwiększonej podaży ROS przejawiającej się zwiększoną ekspresją *bcl-2*. Stwierdzono, że flawonoidowy przeciwutleniacz – kwercetyna częściowo zabezpiecza mioblasty szczurze linii L6 przed apoptozą wywołaną przez ROS, wykorzystując przy tym białko Bcl-2 [32]. Ostatnie dane literaturowe, jak też własne obserwacje wskazują, że proapoptotyczny efekt Bax i antyapoptotyczne oddziaływanie Bcl-2 nie wynikają z bezwzględnej ich zawartości w komórce, lecz z wzajemnych relacji. Zwiększeniu podatności komórek mysiej białaczki limfatycznej linii L1210 na spontaniczną i eksperymentalnie indukowaną apoptozę w warunkach obniżenia stężenia FCS w pożywce towarzyszy nie tylko spadek zawartości Bcl-2 w komórce, lecz również obniżenie ekspresji *bax*.

Innym kluczowym genem w regulacji apoptozy jest *p53*, tzw. „gen supresorowy nowotworu”. Gen ten nazywany jest popularnie „strażnikiem genomu”. Koduje on tetrameryczny czynnik transkrypcyjny, który ma zdolność regulacji cyklu komórkowego. W wyniku uszkodzenia lub mutacji DNA dochodzi do wzrostu ekspresji

p53, którego produkt blokuje komórki w fazie G_1 cyklu komórkowego do czasu naprawy DNA. Pośredniczą w tym m.in. takie białka, jak: p21 WAF1/Cip1 oraz GADD45. W przypadku gdy komórka nie zdoła naprawić DNA, *p53* włącza program śmierci za pośrednictwem białek z rodziny Bcl-2, z którymi pozostaje we wzajemnie zwrotnych zależnościach [5]. *p53* wzbudza apoptozę przede wszystkim w tych przypadkach, gdy czynnik apoptotyczny bezpośrednio uszkodza DNA. Stwierdzono to w przypadku tymocytów myszy, homozygot z brakiem *p53*. Tymocyty te były odporne na promieniowanie γ i etopozyd (uszkodzające DNA), natomiast reagowały apoptozą na glikokortykoidy i pobudzenie TCR (*T-cell receptor*) (czynniki nie uszkodzające bezpośrednio DNA) [6]. Należy jednak zauważyć, że *p53* jest „chorowitym strażnikiem” i bardzo często podlega mutacjom w przebiegu karcinogenezy, tracąc swe naturalne możliwości indukcji apoptozy. Warto w tym miejscu zaznaczyć, iż współczesna molekularna diagnostyka medyczna nowotworu wykorzystuje badanie ekspresji genów regulujących apoptozę (np. *p53*, geny z rodziny *bcl-2*) w ocenie złośliwości guza, wyborze terapii i monitorowaniu jej efektów.

Faza zniszczenia

W fazie tej dochodzi do fragmentacji DNA, rozbicia cytoszkieletu, formowania ciałek apoptotycznych oraz fagocytozy. Proteazy, które podlegały aktywacji (AIF, kaspazy, kalpajny), w fazie wykonawczej prowadzą do rozszczepienia szeregu białek jądrowych (PARP; Rb; laminy A, B; topoizomerazy I i II) oraz cytoplazmatycznych (PKC- δ , β -aktyna, fodryna) [16]. Proteoliza topoizomerazy stabilizujących strukturę chromatyny prawdopodobnie prowadzi do wstępnej fragmentacji DNA na odcinki zawierające 300 tys. par zasad [30]. W dalszym przebiegu degradacji DNA dochodzi do powstawania fragmentów zawierających 50 tys. par zasad, które są (bądź nie są) rozszczepiane na odcinki 180 par zasad i wielokrotność tej liczby. Reakcje te katalizowane są przez endonukleazy, którymi są u *Caenorhabditis elegans* NUC-1, natomiast u zwierząt wyższych NUC-18, DNazaI i DNazaII. Aktywacja tych enzymów zależy od obecności wolnego Ca^{2+} w komórce, co udowodniono stosując związki chelatujące Ca^{2+} , które hamowały fragmentację DNA w przebiegu apoptozy. Uważa się, iż proteoliza lamin – białek strukturalnych błon jądrowych jest istotnym procesem w powstawaniu ciałek apoptotycznych, gdyż pozwala na fragmentację jądra oraz upakowanie zagęszczonej chromatyny we fragmenty komórkowe. Już wcześniej wspomniano o transglutaminazie – enzymie, który wykorzystując poliaminę tworzy dodatkową sieć wiązań między białkami błonowymi, a przez to ochronny „płaszcz”, uniemożliwiający kontakt środowiska wewnętrznego umierającej komórki ze środowiskiem pozakomórkowym i zdrowymi komórkami.

Powstaje pytanie: w jaki sposób makrofagi rozpoznają komórki apoptotyczne? Jest to możliwe w wyniku określonych zmian na powierzchni błony komórkowej w czasie apoptozy [36]. Umierająca komórka traci normalną asymetrię w rozmie-

szczeniu fosfolipidów błonowych (na powierzchni dominują takie obojętne fosfolipidy, jak sfingomielina i fosfatydylocholina, natomiast w wewnętrznej warstwie anionowe fosfolipidy, takie jak fosfatydyloseryna), w związku z czym fosfatydyloseryna jest eksponowana w zewnętrznej blaszce błony komórkowej i może być rozpoznana za pośrednictwem receptora fosfatydyloserynowego makrofaga. Komórka apoptotyczna może być również wiązana za pośrednictwem trombospondyny wydzielanej przez makrofaga i jego receptora vitronektynowego ($\alpha_V \beta_3$). Nieznana jest natomiast bliżej struktura cząsteczki wiążącej trombospondynę na powierzchni komórki apoptotycznej. Jeszcze inny sposób demaskowania umierającej komórki polega na odsłonięciu reszt cukrowych w glikoproteinach błonowych, co pozwala na interakcję z domniemaną lektyną na powierzchni komórki fagocytującej.

APOPTOZA W STANACH PATOLOGICZNYCH

Pomimo że apoptoza jest fizjologiczną śmiercią komórki, to odgrywa ona dużą rolę w patogenezie wielu chorób. Generalnie, ograniczenie tego zjawiska prowadzi do powstawania złośliwych chorób proliferacyjnych oraz autoagresji komórek układu odpornościowego, natomiast nadmiar apoptozy jest charakterystyczny dla chorób zwyrodnieniowych. Rozwój nowotworu jest zależny od apoptozy na wszystkich etapach karcinogenezy:

- 1) efektywność transformacji nowotworowej przez czynniki rakotwórcze jest limitowana przez stopień apoptozy komórek stransformowanych;
- 2) rozplem komórek stransformowanych pod wpływem czynników promotorycznych nowotworzenia jest uwarunkowany hamowaniem apoptozy przez te czynniki;
- 3) tempo wzrostu guza jest określone przez różnicę szybkości proliferacji i apoptozy komórek nowotworowych.

Duża witalność komórek nowotworowych wynika z mutacji w ich genomie, a szczególnie uszkodzenia genu kodującego białko p53. Ponad połowa wszystkich nowotworów występujących u ludzi charakteryzuje się brakiem lub występowaniem jego niefunkcjonalnych form. Komórki nowotworowe charakteryzuje również wysoka ekspresja „genu nieśmiertelności” – *bcl-2*. Stwierdzono także, że szereg anty-apoptotycznych, wirusowych genów jest związanych z nowotworzeniem, np. BHRF1, który jest homologiem *bcl-2* wytwarzanym przez wirus Epsteina-Barr, 5E1B 19 kDa białko adenowirusa wykazujące czynnościową homologię z Bcl-2, białko E1B 55 kDa tego samego wirusa, hamujące p53 oraz CrmA – białko wirusa ospy krowiej, inaktywujące proteazy z rodziny ICE. Duża liczba leków stosowanych aktualnie w chemioterapii oraz radioterapia oparte są na mechanizmie apoptozy komórek nowotworowych. Przez uszkodzenie DNA w tychże komórkach dochodzi do akty-

wacji *p53* i uruchomienia programu śmierci. Brak *p53* lub utrata jego apoptotycznych właściwości, a także wysoki poziom białka Bcl-2 w komórce nowotworowej decydują często o jej niewrażliwości na stosowaną terapię.

Innym przykładem ograniczenia apoptozy są choroby autoimmunologiczne. W tym przypadku mamy do czynienia z ograniczoną apoptozą autoreaktywnych limfocytów T. W przypuszczalnym molekularnym mechanizmie zwiększonej przeżywalności tych komórek bierze się pod uwagę:

- wytwarzanie przez nie czynnika blokującego ligand Fas/APO-1,
- zmniejszoną ekspresję receptora Fas/APO-1 oraz
- zwiększoną ekspresję protoonkogenu *bcl-2*.

Przeżywające limfocyty T z cechami autoagresji wywołują apoptozę komórek zdrowych, prowadząc do występowania takich schorzeń, jak: toczeń rumieniowaty czy reumatoidalne zapalenie stawów.

Warunkiem zdrowia każdego organizmu jest zachowanie równowagi między replikacją komórek a ich apoptozą. Problemem jest nie tylko ograniczenie stopnia apoptozy, tak jak to opisano powyżej, lecz również jego nasilenie. Okazuje się, że apoptozie mogą podlegać nie tylko komórki młode, proliferujące, lecz również komórki w pełni zróżnicowane, które na ogół nie są „przygotowane” do apoptozy. Nie wiadomo jeszcze dokładnie, na czym to „przygotowanie” do włączenia programu śmierci polega. Sugeruje się, iż może być ono związane ze zwiększoną ekspresją takich genów, jak: *p53* i *c-myc*. Choroby zwyrodnieniowe ośrodkowego układu nerwowego (np. Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona) są przykładem, jak z nie wyjaśnionych jeszcze przyczyn dochodzi do wzbudzenia apoptozy neuronów. Rozpatruje się wiele przyczyn, takich jak: ROS, niedobór NGF – czynnika wzrostu neuronów czy też nadmiar neuroprzekaźników. Aktualnie uważa się, że apoptoza dopaminergicznych neuronów w chorobie Parkinsona związana jest z aktywacją ceramidowej ścieżki przekazywania sygnału, zwiększoną produkcją ROS oraz syntezą czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [8]. Na dużą rolę ROS w mechanizmie apoptozy neuronów w przebiegu choroby Parkinsona wskazują badania przeprowadzone na myszach z brakiem Bcl-2 (białko antyapoptotyczne o właściwościach przeciwutleniacza) w komórkach nerwowych, które reagowały apoptozą na dopaminę znacznie intensywniej aniżeli neurony myszy z normalną zawartością Bcl-2 [31]. Interakcje pomiędzy Bcl-2 i białkiem prionowym (PrP) mogą mieć istotne znaczenie w patogenezie neurozwyrodnieniowych chorób prionowych, takich jak: syndrom Gerstmana-Sträusslera czy choroba Creutzfelda-Jakoba. Bcl-2 jest rozpatrywane jako nieznane bliżej „białko X”, które uczestniczy w przekształcaniu PrP w jego patogenną izoformę PrP^{SC} [19].

Do indukcji apoptozy zróżnicowanych komórek: neuronów i kardiocytów dochodzi również podczas udaru mózgu i zawału mięśnia sercowego. Niedotlenione komórki ulegają przede wszystkim martwicy, jednakże komórki otaczające strefę martwiczą po kilku dniach umierają śmiercią apoptotyczną, co może być wynikiem

uwalniania ROS ze strefy odczynu zapalnego. Ciekawe, że reperfuzja niedokrwionych narządów (mózgu, serca czy nerek) prowadzi do zwiększonej koncentracji ROS i nasilonej apoptozy.

Innym przykładem choroby, w której patogenezie dochodzi do nasilenia apoptozy, jest AIDS. U osób zarażonych HIV dochodzi do wzbudzenia apoptozy w $CD4^+$ i $CD8^+$ limfocytach T. Ciekawe, że umiera znacznie więcej limfocytów T, aniżeli jest zarażone wirusem. Co więc skłania te komórki do apoptozy? Uważa się, że może być to białko gp120 uwalniane z otoczki wirusa i wiążące się z $CD4$, jak też nadekspresja kodowanego przez HIV transkrypcyjnego aktywatora Tat, prowadzącego do stresu oksydacyjnego w niezarażonych limfocytach T. Stwierdzono ponadto, że w zarażonych HIV limfocytach $CD4^+$ apoptoza poprzedzona jest ich zatrzymaniem w fazie G_2 cyklu komórkowego, co wiąże się z akumulacją cykliny B, będącej regulacyjną podjednostką p34 cyklino-zależnej kinazy 2. Okazało się, iż podobne zmiany polegające na gromadzeniu cykliny B występują w limfocytach T izolowanych z krwi obwodowej pacjentów HIV+, lecz nie wykazujących objawów AIDS. Uważa się, że mykoplazmoza występująca często u pacjentów HIV+ może potęgować apoptozę limfocytów T wywołaną przez wirus i wytwarzane przez niego białka.

CO DALEJ?

Czy można przewidzieć, w jakim kierunku potoczą się badania nad apoptozą w najbliższej przyszłości? Duża ranga zagadnienia oraz dynamiczny rozwój badań pozwalają oczekiwać wielu nowych wyników istotnych dla wyjaśnienia molekularnego mechanizmu apoptozy, jak też wartościowych z punktu widzenia praktyki klinicznej. Istnieje wciąż wiele niejasności co do systemu przekaznictwa sygnału śmierci wzbudzanego przez różnorodne czynniki apoptotyczne, jak też molekularnych uwarunkowań „przygotowania” komórki do włączenia programu śmierci, zmiennego na różnym etapie różnicowania. Frapujące i wciąż bez odpowiedzi są pytania: dlaczego niektóre komórki, np. mioblasty szkieletowe w procesie różnicowania w dojrzałe, wielojądrzaste miocyty tracą zdolność uruchamiania programu śmierci apoptotycznej? Czy dalece wyspecjalizowane, bezjądrzaste i bezmitochondrialne erytrocyty mogą podlegać apoptozie? Istotnym dla wyjaśnienia kontroli procesu apoptozy będzie wyjaśnienie mechanizmu działania białek z rodziny Bcl-2, a także ich interakcji z Apafs, mitochondrialnym AIF i proteazami z rodziny ICE (kaspazami). Wciąż mało poznane są ogniwa w łańcuchu wydarzeń pomiędzy aktywacją kaspaz a aktywacją endonukleaz uczestniczących we fragmentacji DNA*, a także znaczenie ROS jako mediatorów w wielu przypadkach apoptozy. Działania biotechnologów oraz klinicyстів będą zmierzały w kierunku wyprodukowania i

skutecznego stosowania preparatów zarówno wzbudzających, jak i hamujących apoptozę. Z badaniami tymi wiąże się duże nadzieje na stworzenie efektywnych metod terapii złośliwych chorób proliferacyjnych, chorób autoimmunologicznych oraz zwyrodnieniowych.

*Już w trakcie publikacji niniejszego opracowania ukazała się praca wskazująca na istnienie aktywowanej przez kaspazę DNazy (*caspase-activated DNase*) i jej inhibitora ICAD. Zgodnie z sugestią autorów indukcja apoptozy prowadzi do rozszczepienia kompleksu CAD/ICAD przy udziale kaspaz, wnikania aktywnej CAD do jądra komórkowego i fragmentacji DNA [7a].

Podziękowania

Dziękuję moim najbliższym współpracownikom: dr Katarzynie Grzelkowskiej i dr Arkadiuszowi Orzechowskiemu oraz doktorantom: mgr inż. Tomaszowi Płoszajowi i mgr inż. Wioletcie Zimowskiej za zaangażowanie i trud włożony w badania nad mechanizmami i regulacją apoptozy. Wyrażam swą wdzięczność dr Januszowi Skierskiemu z Instytutu Leków w Warszawie za współpracę i oznaczenia cytometryczne.

LITERATURA

- [1] ATTISANO L, WRANA JL, LÓPEZ-CASILLAS F, MASSAGUÉ J. TGF- β receptors and actions. *Biochem Bioph Acta* 1994; **1222**: 71–80.
- [2] BAKER AM, BRIEHL MM, DORR R, POWIS G. Decreased antioxidant defence and increased oxidant stress during dexamethasone-induced apoptosis: *bcl-2* prevents the loss of antioxidant enzyme activity. *Cell Death & Differ* 1996; **3**: 207–213.
- [3] BAKER SJ, REDDY EP. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 1996; **12**: 1–9.
- [4] BELLO-FERNANDEZ C, PACKHAM G, CLEVELAND JL. The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1993; **90**: 7804–7809.
- [5] CHIOU S-K, RAO L, WHITE E. Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 2556–2563.
- [6] CLARKE AR, PURDIE CA, HARRISON DJ, MORRIS RG, BIRD CC, HOOPER ML, WYLLIE AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; **362**: 849–852.
- [7] DARZYŃKIEWICZ Z, JUAN G, LI X, GORCZYCA W, MURAKAMI T, TRAGANOS F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997; **27**: 1–20.
- [7a] ENARI i wsp. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; **391**: 43–50.
- [8] FRANCE-LANORD V, NGUYEN TT, LAMBENG N, MICHEL PP, BRUGG B, HUNOT S, AGID Y, RUBERG M. Neuronal cell death and oxidative stress. (w) Oxidative stress and Apoptosis - 3rd Winter Research Conference, Les Arcs, 1997, Francja.

- [9] GOLD R, SCHMIED M, ROTHE G, ZISCHLER H, BREITSCOPF H, WEKERLE H, LASSMANN H. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of *in situ* nick translation to cell culture systems and tissue sections. *Histochem Cytochem* 1993; **41**: 1023–1030.
- [10] GROSS A, XIANG J, ZHA J, YIN X-M, SCHLESINGER PH, KORSMEYER SJ. Regulation of apoptosis by the Bcl-2 family members. (w) Oxidative stress and Apoptosis - 3rd Winter Research Conference, Les Arcs, 1997, Francja.
- [11] GRZELKOWSKA K, MOTYL T, MALICKA E, OSTROWSKI J, TRZECIAK L, FILIPECKI M. Effect of orotic acid on TGF- β ₁-induced growth inhibition of L1210 leukemic cells. *Int J Hematol* 1995; **61**: 23–33.
- [12] HANNUM YA, OBEID LM, DBAIBO GS. Ceramide / A novel second messenger and lipid mediator [w] Bell RM i wsp. [red.] Handbook of Lipid research, Vol.8: Lipid Second Messengers. New York: Plenum Press 1996: 177.
- [13] HENKART PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* 1994; **1**: 343–346.
- [14] HOCKENBERY DM, OLTAVAI ZN, YIN X-M, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; **75**: 241–251.
- [15] KARSAN A, YEE E, HARLAN JM. Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor- α is inhibited by the Bcl-2 family member. A1. *J Biol Chem* 1996; **271**: 27201–27204.
- [16] KAUFMANN SH. Proteolytic cleavage during chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Med Today* 1996; **July**: 298–303.
- [17] KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **26**: 239–257.
- [18] KROEMER G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med* 1997; **3**: 614–620.
- [19] KURSCHNER C, MORGAN JI. Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. *Molecular Brain Research* 1996; **37**: 249–258.
- [20] LAFON C, MATHIEU C, GUERRIN M, PIERRE O, VIDAL S, VALETTE A. Transforming growth factor β ₁-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells: protection by antioxidant N-acetylcysteine and *bcl-2*. *Cell Growth & Differ.* 1996; **7**: 1095–1104.
- [21] LAM M, DUBYAK G, CHEN L, NUNEZ G, MIESFELD RL, DISTELHORST CW. Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Med Sci* 1994; **91**: 6569–6573.
- [22] LAZEBNIK YA, KAUFMANN SH, DESNOYERS S, POIRIER GG, EARNSHAW WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994; **371**: 346–347.
- [23] LIU X, KIM CN, YANG J, JEMMERSON R, WANG X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; **12**: 147–157.
- [24] MOTYL T, KASTERKA M, GRZELKOWSKA K, BLACHOWSKI S, SYSA P. TGF- β ₁ inhibits polyamine biosynthesis in K562 leukemic cells. *Ann Hematol* 1993; **67**: 285–288.
- [25] MOTYL T, KASTERKA M, GRZELKOWSKA K, OSTROWSKI J, FILIPECKI M, MALICKA E, PIOSZAJ T. Phorbol ester (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) prevents ornithine decarboxylase inhibition and apoptosis in L1210 leukemic cells exposed to TGF- β ₁. *Int J Biochem Cell Biol* 1996; **28**: 1327–1335.
- [26] MOTYL T, ZIMOWSKA W, SKIERSKI J, WARESKI P, BAŁASIŃSKA B. Apoptosis and expression of *bcl-2* oncogene in L1210 leukemic cells exposed to peroxy radical initiator - 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH). (w) Oxidative stress and Apoptosis - 3rd Winter Research Conference, Les Arcs, 1997, Francja.
- [27] MUCHMORE SW, SATTER M, LIANG H, MEADOWS RP, HARLAN JE, YOON HS, NETTESHEIM D, CHANG BS, THOMPSON CB, WANG SL, NG S-CH, FESIK S. X-ray and

- NMR structure of human Bcl-xl, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996; **381**: 335–341.
- [28] NEWMAN MJ. Transforming growth factor beta and the cell surface in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 1993; **12**: 239–254.
- [29] NICOTERA P, ROSSI AD. Nuclear Ca^{2+} : physiological regulation and role in apoptosis. *Mol Cell Biochem* 1994; **135**: 89–98.
- [30] OBERHAMMER F, WILSON JW, DIVE C, MORRIS ID, HICKMAN JA, WAKELING AE, WALKER PR, SIKORSKA M. Apoptotic death in epithelial cells: Cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 1993; **12**: 3679–3684.
- [31] OFFEN D, STERNIN H, GORODIN S, KORSMEYER S, ZIV I, MELAMED E, HOCHMAN A. Dopamine toxicity and antioxidant status of Bcl-2 deficient mice. (w) Oxidative stress and Apoptosis - 3rd Winter Research Conference, Les Arcs, 1997, Francja.
- [32] ORZECZOWSKI A, SKIERSKI J, ZIMOWSKA W, BAŁASIŃSKA B, MOTYL T. The action of oxidants (H_2O_2 , AAPH, $CuSO_4$) and antioxidant quercetin on cell cycle performance, *bcl-2* expression and apoptosis in cultured L6 rat myoblasts. (w) Oxidative stress and Apoptosis - 3rd Winter Research Conference, Les Arcs, 1997, Francja.
- [33] PITTI RM, MASTERS SA, RUPPERT S, DONAHUE CH.J, MOORE A, ASHKENAZ A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996; **271**: 12687–12690.
- [34] PRONK GJ, RAMER K, AMIRI P, WILLIAMS LT. Requirement of an ICE-like protease for induction of apoptosis and ceramide generation by REAPER. *Science* 1996; **271**: 808–810.
- [35] RAO L, WHITE E. Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators: making a connection. *Current Opinion in Genetics & Development* 1997; **7**: 52–58.
- [36] SAVILL J, FADOK V, HENSON P, HASLETT CH. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology Today* 1993; **14**: 131–136.
- [37] SELVAKUMARAN M, LIN H-K, SIJN RTT, RUD JC, LIBERMANN DA, HOFFMAN B. The novel primary response gene *MyD118* and the protooncogenes *myb*, *myc*, and *bcl-2* modulate transforming growth factor β_1 -induced apoptosis of myeloid leukemia cells. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 2352–2360.
- [38] TSUKADA T, EGUCHI K, MIGITA K, KAWABE Y, KAWAKAMI A, MATSUOKA N, TAKASHIMA H, MIZOKAMI A, NAGATAKI S. Transforming growth factor β_1 -induces apoptotic cell death in cultured human umbilical vein endothelial cells with down-regulated expression of Bcl-2. *Biochem Biophys Res Com* 1995; **210**: 1076–1082.
- [39] VAUX DL. CED-4 – third horseman of apoptosis. *Cell* 1997, **90**: 389–390.
- [40] WALKER PR, KOKILEVA L, LE BLANC J, SIKORSKA M. Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *BioTechniques* 1993; **15**: 6.
- [41] WRIGHT JA, TURLEY EA, GREENBERG AH. Transforming growth factor beta and fibroblast growth factor as promoters of tumor progression to malignancy. *Crit Rev Oncogenesis* 1993; **4**: 473–492.
- [42] ZIMOWSKA W, MOTYL T, SKIERSKI J, BAŁASIŃSKA B, PLOSZAJ T, ORZECZOWSKI A, FILIPECKI M. Apoptosis and Bcl-2 protein changes in L1210 leukaemic cells exposed to oxidative stress. *Apoptosis* 1997, **2**: 529–539.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 10.10.1997 r.

Przyjęto: 03.02.1998 r.

Adres autora: ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

SEPTYNY – NOWA RODZINA BIAŁEK CYTOSZKIELETOWYCH – UDZIAŁ SEPTYN W CYTOKINEZIE*

SEPTINS – NEW FAMILY OF CYTOSKELETAL PROTEINS –
THE ROLE OF SEPTINS IN CYTOKINESIS

Izabela STRZYŻEWSKA, Urszula WOJSA-ŁUGOWSKA,
Maria JERKA-DZIADOSZ

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

Streszczenie: W artykule tym omówione są w skrócie ostatnie badania dotyczące genów, białek i filamentów septynowych oraz ich rola w funkcji cytoszkieletu. Septyny stanowią nową rodzinę białek występujących we wszystkich zbadanych eukariotach i zawierają od 275–539 aminokwasów. Sekwencje septyn wykazują około 26% identyczności, zawierają pętlę P dla wiązania nukleotydu GTP/GDP oraz domenę kodującą superhelisę, a białka septynowe wykazują aktywność GTPaz. Kompleks trzech septyn *Drosophila* tworzy *in vitro* filamenty o średnicy 7 nm. *In vivo* septyny zostały opisane w bruzdzie podziałowej komórek drożdży i owadów, a także komórkach mysich i ludzkich. Homologi septyn biorą udział również w innych procesach, w których także uczestniczy aktywnie wraz z białkami towarzyszącymi, jak np. gojenie rany czy przywieranie do podłoża w punktach adhezji.

Słowa kluczowe: septyny, cytokineza, filamenty szyjki, bruzda podziałowa.

Summary: We review here the new data concerning septin genes and proteins, and septin filaments as well as their role in functioning of the cytoskeleton. Septins constitute new family of proteins found in all studied eukariots, contain 275–539 amino acids. The septin sequences reveal 26% homology, contain the P-loop for nucleotide binding and sequences coding the coiled - coil domain; septin proteins show GTPase activity. The isolated complex of three septins of *Drosophila in vitro* form filaments with 7 nm diameter. *In vivo* septins were described in division furrow in yeast and insects as well as in mouse and

*Finansowanie pracy z grantu statutowego dla Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego z KBN.

human cells. Septin homologs participate also in other processes where actin with accompanying proteins was found, such as wound healing and adhesion at focal points.

Key words: septins, division furrow.

WSTĘP

Artykuł ten zawiera krótki przegląd informacji o rodzinie białek wchodzących w skład niedawno odkrytego układu filamentowego, który uczestniczy przede wszystkim w budowaniu bruzdy podziałowej badanych komórek drożdży, muszki owocowej (*Drosophila* sp.), myszy i komórek ludzkich [8, 11, 33, 34, 38, 50].

Odkrycie septyn stało się możliwe dzięki pionierskim badaniom genetycznym Hartwella i jego współpracowników [23] nad cyklem komórkowym pączkujących drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. W wyniku tych badań opisano mutanty podziału komórkowego (cdc). Mutacje któregośkolwiek z czterech genów: *Cdc3*, *Cdc10*, *Cdc11* i *Cdc12* uniemożliwiają w podwyższonej temperaturze oddzielanie pączków, prowadząc do nagromadzenia dużej liczby wielojądrowych, wielokrotnie pączkujących komórek. Obecność białek, kodowanych przez te cztery geny w szyjce połączenia komórka macierzysta – pączek, stwierdza się stosując specyficzne przeciwciała [11].

Badania ultrastrukturalne pączkujących *S. cerevisiae* wykazały występowanie w szyjce filamentów o średnicy około 10 nm [5]. Filamenty szyjki znajdują się bardzo blisko błony cytoplazmatycznej i są położone w płaszczyźnie prostopadłej do osi połączenia komórka macierzysta – pączek. Przypominają one filamenty aktywne obecne w pierścieniu kurczliwym, który tworzy się podczas cytokinezy. W przeciwieństwie jednak do pierścienia aktynowego [54] filamenty szyjki drożdży występują już w czasie wzrostu pączka, co potwierdza różnice między filamentami szyjki i aktyną.

Septyny towarzyszą filamentom szyjki tworzonym przez inne białka i mechanicznie pełnią funkcję „szkieletu”, który drogą powinowactwa wychwytuje z cytoplazmy czynniki potrzebne do cytokinezy [8], na co może wskazywać również częste współwystępowanie septyn z aktyną [34].

GENY I BIAŁKA SEPTYNOWE

Oprócz wspomnianych już powyżej czterech genów *Cdc*, w drożdżach (*S. cerevisiae*) opisano dwa dodatkowe geny kodujące septyny: *Spr3* i *Spr28*, biorące udział w sporulacji [13, 18, 47]. Wykryto również homologiczne białka w innych

grzybach [14, 38, 41], owadach [11, 19, 20, 44], płazach oraz ssakach zarówno myszach, jak i człowieku [33, 34, 38, 43].

W tabeli 1 podsumowano dane dotyczące septyn i innych białek uczestniczących w tworzeniu bruzdy podziałowej u bezkręgowców (oprócz białek motorycznych [35]). Jak widać, drożdże mają aż sześć genów kodujących septyny, natomiast w muszce owocowej (*Drosophila melanogaster*) dotychczas odkryto jedynie trzy. Wszystkie znane septyny zawierają sekwencje pętli P, tworzącej przewidywane miejsce wiązania nukleotydu, a ostatnie dane wskazują, że przynajmniej niektóre z septyn muszki, drożdży i myszy wiążą GTP i GDP, a także wykazują aktywność GTPaz [20, 34]. W dodatku wszystkie znane sekwencje septyn, z wyjątkiem *S. cerevisiae* Cdc10p, *C. albicans* CaCdc10p i *S. pombe* Spn2p (tab. 1), zawierają w pobliżu lub na końcu karboksylowym domenę kodującą superhelisę składającą się z 35–98 aminokwasów. Domeny te mogą uczestniczyć we współdziałaniu między septynami oraz interakcjach septyn z innymi białkami [38].

Poznane do tej pory septyny zawierają od 275 do 539 aminokwasów (31 990–60 200 kDa) i wykazują około 26% identyczności sekwencji aminokwasowych na całej długości. Podobieństwo pomiędzy tymi białkami jest największe w regionach środkowych, a końce aminowe i karboksylowe różnią się zarówno pod względem długości, jak i sekwencji [38]. Z wyjątkiem obecności sekwencji wspólnej dla pętli P tworzącej przewidywane miejsce wiązania nukleotydu, septyny nie wykazują podobieństwa do żadnego ze znanych białek. Jednym z ważniejszych wyników analiz podobieństwa sekwencji jest brak wysokiego stopnia homologii między poszczególnymi septynami ewolucyjnie odległych gatunków. Tak więc, septyny muszki (*Drosophila*): Pnut, Sep1 lub Sep2 nie są oczywistym ortologiem jakiegokolwiek septyny drożdży [11]. Okazało się, że septyny różnią się od tubulin, miozyny i rodziny białek aktynowych, gdzie ortologi w różnych organizmach, które dzielą duże odległości ewolucyjne, spełniają podobne funkcje [40, 42, 46, 52]. Dlatego też nieobecność ortologów w analizach sekwencji septyn sugeruje, że poszczególne białka z tej grupy mogą nie pełnić unikatowych stałych funkcji. Hipotezę tę potwierdzają obserwacje wskazujące, że septyny występują nie tylko w bruzdzie podziałowej (patrz niżej). Na uwagę zasługuje fakt, że produkty kilku genów septynowych współwystępują *in vivo* [19, 38, 44] i np. zanik funkcji Pnut jest przyczyną zaniku ekspresji fenotypowej Sep1 [19]. Cztery septyny drożdży (Cdc3, 10, 11 i 12) współwystępują w szyjce połączenia komórka macierzysta – pączek. Mutacja jednego z tych czterech genów uniemożliwia ekspresję wszystkich czterech septyn szyjki [11, 38].

Oczyszczone septyny mogą tworzyć filamenty *in vitro* [20]. Stosując chromatografię immunopowinowactwa z wykorzystaniem przeciwciał przygotowanych przeciw C-końcowym regionom peptydów trzech septyn Pnut, Sep1 i Sep2, w pracowni Mitchisona oczyszczono kompleks trzech białek septynowych z zarodków muszki (*Drosophila*) [20]. Kompleks zawiera dwie kopie każdego z trzech poli-

TABELA 1. Septyny i inne białka uczestniczące w tworzeniu bruzdy podziałowej u bezkręgowców

Organizm	Gen	Białko	Masa (blot) kD	Inne właściwości	Funkcja	Lit.
<i>S. cerevisiae</i>	CDC3*	Cdc3p	62	superhelisa	filamenty szyjki (?)	[8]
	CDC10	Cdc10p				[11]
	CDC11	Cdc11p	47,6 (55)	superhelisa		[11]
	CDC12	Cdc12p	46,7	superhelisa		[11]
	BUD1	Bud1p		GTP-aza		
	BUD3	Bud3p			znaczy	[10, 36]
	BUD4	Bud4p	170		miejsca	[51, 36]
	AIP3/BUD6	Aip3p	89 (97)	superhelisa	powstawania pączka	[1]
	SPR3	Spr3p	60 (59,8)			[18, 47]
	SPR28	Spr28p				[13]
BNI1	Bni1p		współdziała z CDC12		[38, 55]	
SPA2	Spa2p	180	współdziała z CDC10		[38]	
<i>S. pombe</i>	Spn1-6	Spn1-6p		Spn2 -brak sekwencji superhelisy	punkt w interfazie; pierścieni podziałowy	[38]
	cdc3	cdc3p		homolog profiliny		[2]
	cdc8	cdc8p		homolog tropomiozyny		
	cdc12	cdc12p	220	wiąże cdc3 profilinę		
	cdc15	cdc15p	130	wiąże aktynę; współ- występuje z pierś. akt.		[7]
cdc4	cdc4p	200-komp.	EF-hand		[17] [39]	
<i>Candida albicans</i>	CaCDC3	CaCdc3p	47,9			[14]
	CaCDC10	CaCdc10p	40,7			
<i>Aspergillus nidulans</i>	FigA					[38]
	aspA			homologi CDC10-12		[41]
	aspB aspC					
<i>Drosophila melanogaster</i>	PNUT	Pnut	60 (70)	współwystępują z	pseudo- bruzda i bruzda podz.	[19, 44]
	SEP1	Sep1	38 (37)	aktyną i miozyną		[20]
	SEP2	Sep2	46 (50)			[11, 44]
	dah	dahp	71	homolog dystrofiny i apodystrofiny		[16, 56]
	dial	dia	123	współdziała z CDC12		[38, 6]

*Septyny – tłusty druk; symbole genów i białek wg cytowanych autorów.

peptydów, możliwe że jako heterotrimer składający się z trzech homodimerów [20]. Tworzenie homodimerów może odbywać się za pośrednictwem krótkich odcinków C-końcowych każdej septyny o przewidywanej strukturze superhelisy. Tak oczyszczony kompleks septynowy muszki (*Drosophila*) wiąże jedną cząsteczkę nukleotydu GDP/GTP zgodnie z obecnością pętli P w sekwencji aminokwasowej. W nawiasie trzeba dodać, że wiązanie nukleotydu i jego hydroliza są ważną właściwością polimeryzacji aktyny i tubulin, natomiast nie zbadano dotąd roli wiązania nukleotydu i jego hydrolizy podczas polimeryzacji septyn.

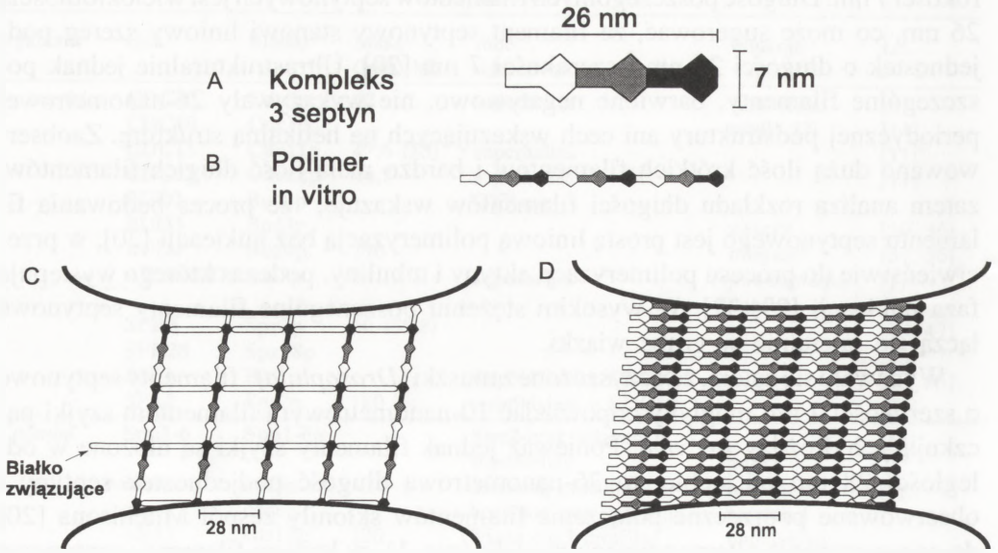
Oczyszczony kompleks septynowy muszki (*Drosophila*) tworzy filamenty o szerokości 7 nm. Długość poszczególnych filamentów septynowych jest wielokrotnością 26 nm, co może sugerować, że filament septynowy stanowi liniowy szereg podjednostek o długości 26 nm i szerokości 7 nm [20]. Ultrastrukturalnie jednak poszczególne filamenty, barwione negatywowo, nie wykazywały 26-nanometrowej periodycznej podstruktury ani cech wskazujących na helikalną strukturę. Zaobserwowano dużą ilość krótkich filamentów i bardzo małą ilość długich filamentów, zatem analiza rozkładu długości filamentów wskazuje, że proces budowania filamentu septynowego jest prostą liniową polimeryzacją bez nukleacji [20], w przeciwieństwie do procesu polimeryzacji aktyny i tubuliny, podczas którego występuje faza nukleacji [29, 37]. W wysokim stężeniu poszczególne filamenty septynowe łączą się lateralnie w grube wiązki.

Wydawało się zatem, że oczyszczone z muszki (*Drosophila*) filamenty septynowe o szerokości 7 nm mogłyby odpowiadać 10-nanometrowym filamentom szyjki pączkujących drożdży *in vivo*. Ponieważ jednak filamenty szyjki są ułożone w odległości 28 nm od siebie, to 26-nanometrowa długość podjednostek septyny i obserwowane poprzeczne połączenie filamentów skłoniły zespół Mitchisona [20] do zasugerowania alternatywnego modelu (rys. 1), w którym filamenty septynowe są ułożone prostopadle do filamentów szyjki i równoległe do osi połączenia komórka macierzysta – pączek. W modelu tym, obraz filamentu szyjki drożdży oglądany w mikroskopie elektronowym [5] odpowiada liniowemu szeregowi jednego silnie zabarwionego obszaru podjednostek septyny [20].

Na podstawie omawianego modelu można wnioskować, że odległość między filamentami powinna zależeć od długości kompleksu septyny. Jak sugerują Cooper i Kiehart [11] model ten można testować przez użycie rekombinowanych septyn o różnych długościach z zastosowaniem metody użytej przez Kilmartina i wsp. do badań nad białkiem Spc110p/Nuf1p drożdży [32].

FUNKCJE SEPTYN

Badania septyn zostały niedawno rozpoczęte, a ich rola nie jest do końca poznana. W pączkujących drożdżach mutacje genów septynowych prowadzą do zaniku filamentów szyjki, zaś lokalizacja immunocytochemiczna septyn, obserwowana za pomocą mikroskopu świetlnego, pokrywa się z filamentami szyjki obserwowanymi pod mikroskopem elektronowym. Współwystępowanie septyn i filamentów szyjki wymaga potwierdzenia na tym samym skrawku ultrastrukturalnym tym bardziej, że pierścień septynowy wykrywa się immunofluorescencyjnie w szyjce w czasie cyklu komórkowego także przed i po pojawieniu się filamentów szyjki identyfikowanych ultrastrukturalnie [38].



RYSUNEK 1. Modele tworzenia i uporządkowania filamentów septynowych (wg Field i wsp. [20]): **A** – Kompleks septyn o długości 26 nm przedstawiony jako liniowe uporządkowanie trzech podwójnie zwiniętych homodimerów (białe, szare, czarne). **B** – Kompleks **A** ulega liniowej polimeryzacji tworząc filament *in vitro*. **C** i **D** – Alternatywne modele uporządkowania filamentów na obwodzie szyjki połączenia komórka macierzysta-pączek u drożdży, widziane od strony powierzchni w płaszczyźnie horyzontalnej. W modelu **C** stała odległość między filamentami utrzymuje się dzięki białku związującemu, a filamety ułożone są helikalnie wzdłuż szyjki. W modelu **D** filamety kontaktują się ze sobą bocznie i ułożone są poprzecznie do osi pączkowania. Stała odległość (28 nm) wynika z powtarzalności podjednostek kompleksu

Filamentów septynowych na razie nie stwierdzono ultrastrukturalnie *in situ* w dzielących się komórkach zwierzęcych, chociaż same białka septynowe wykrywa się immunocytochemicznie w brzdach podziałowych wielu komórek, a ultrastrukturę zwierzęcych brzd podziałowych intensywnie badano. Być może septyny istnieją w tych komórkach w postaci filamentów, ale są trudne do identyfikacji ultrastrukturalnej wśród gęstej sieci filamentów aktynowych i filamentów pośrednich, zwłaszcza że aktyna i filamety pośrednie mają ok. 10 nm szerokości.

Dobrym modelem do dalszych badań mogą być orzęski, charakteryzujące się niezwykle rozbudowanym cytoszkieletem powierzchniowym [25]. Dzięki zastosowaniu przeciwciała monoklonalnego (12G9) udało się zidentyfikować struktury filamentowe w orzęskach: *Tetrahymena* [27], *Paraurostyla* oraz *Paramecium* [26], których funkcje w komórce odpowiadają funkcji filamentów septynowych w innych organizmach. Białka septynowopodobne dzielących się orzęsków biorą udział, między

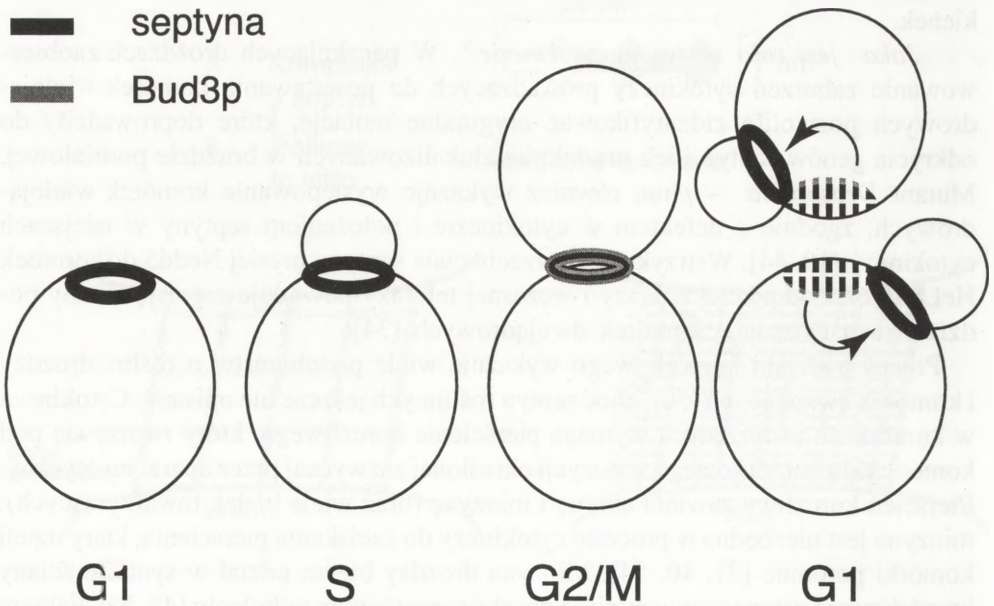
innymi w tworzeniu bruzdy podziałowej; w komórkach interfazalnych występują w strukturach wokół ciałek bazalnych wykazujących charakter delikatnych włókienek.

Jaka jest rola septyn w cytokinezie? W pączkujących drożdżach zaobserwowanie zaburzeń cytokinezy prowadzących do powstawania komórek wielojądrowych pozwoliło zidentyfikować oryginalne mutacje, które doprowadziły do odkrycia genów septyn i ich produktów zlokalizowanych w bruzdzie podziałowej. Mutant *Drosophila* – *pnut*, również wykazuje występowanie komórek wielojądrowych, zgodnie z defektem w cytokinezie i położeniem septyny w miejscach cytokinezy [19, 44]. Wstrzyknięcie przeciwciała septyny mysiej Nedd5 do komórek HeLa w okresie późnej anafazy i wczesnej telofazy powoduje regresję bruzdy podziałowej i tworzenie komórek dwujądrowych [34].

Proces podziału komórkowego wykazuje wiele podobieństw u roślin, drożdży i komórek zwierzęcych [50]; choć septyn roślinnych jeszcze nie opisano. Cytokineza w komórkach zwierzęcych wymaga pierścienia kurczliwego, który tworzy się pod koniec cyklu komórkowego w pozycji określonej zazwyczaj przez aparat mitotyczny. Pierścień kurczliwy zawiera aktynę i miozynę (oraz wiele białek towarzyszących); miozyna jest niezbędna w procesie cytokinezy do zaciskania pierścienia, który dzieli komórki potomne [31, 40, 54]. Miozyna drożdży bierze udział w syntezie ściany komórkowej i ustanawianiu miejsca pączka w następnym pokoleniu [48, 53]. Faktem jest, że septyny odgrywają zasadniczą rolę w mechanizmie podziału, ale nasuwają się pytania, czy septyny odgrywają tę samą czy różne role w cytokinezie drożdży i zwierząt. Wcześniejsze porównania tych dwóch typów podziału komórkowego skłaniały badaczy do uznania, iż podobieństwa polegają na niezbędnej obecności septyn, aktyny, miozyny II oraz syntezie nowej błony komórkowej w końcowych fazach cytokinezy. Różnice prawdopodobnie występują we wczesnej fazie cytokinezy, w której odbywa się wybór miejsca podziału, rekrutacja białek do przeprowadzenia cytokinezy, synteza nowej błony komórkowej i inicjacja cytokinezy [40, 45].

W pączkujących drożdżach położenie miejsca pączka, jak również zaciskanie przewężenia pomiędzy komórką macierzystą i potomną istnieje od początku cyklu. Zarówno septyny, jak i filamenty szyjki są obecne w szyjce połączenia komórka macierzysta – pączek, ale nie jest oczywiste, czy ulegają one kurczeniu w czasie cytokinezy. Raczej pierścień septynowy dzieli się w płaszczyźnie podziału, tak więc matka i pączek otrzymują nienaruszony pierścień o zredukowanej grubości, ale nie średnicy.

Septyny mogą spełniać rolę „wskazówki” dla miejsca przyszłego pączka, co przedstawia model Chanta [8] (rys. 2). Model ten został wyprowadzony z badań genetycznych oraz analizy współwystępowania septyn z innymi białkami [10, 51]. Produkty genów *Bud3*, *Bud4* i związane z nimi czynniki mogą dostarczać znaczników powierzchniowych dla jednobiegunowego pączkowania w komórkach haploidal-



RYSUNEK 2. Model Chanta [8] roli septyn w determinacji miejsca inicjowania nowego pączka w pączkowaniu jednobiegunowym drożdży: Podczas fazy G1 septyny tworzą pierścien na jednym biegunie w wyniku działania kaskady ustanawiającej polarność (strzałka). W fazie S pączek rośnie w obecności pierścienia septynowego, a następnie w fazie G2/M białko Bud3p dołącza do pierścienia septynowego; podczas cytokinezy ten podwójny pierścien rozdwaja się przechodząc do komórek potomnych, w których ulega degradacji, natomiast oddziaływanie białek Bud1p i Cdc42p GTPazy (strzałka) ustanawia miejsce nowego pierścienia septynowego

nych [10, 51]. Immunolokalizacja wykazała, że w późnej fazie cyklu komórkowego białko Bud3p otacza podwójnym pierścieniem obszar przewężenia między komórką macierzystą a pączkiem; jest to pozycja, gdzie komórki będą tworzyły osiowo pączki w następnym cyklu komórkowym. Podczas cytokinezy ma miejsce podział podwójnego pierścienia na dwa pojedyncze, z których każdy pozostaje w komórce potomnej do czasu zapoczątkowania nowego pączka, kiedy to pierścienie Bud3p rozpraszają się. Postuluje się, że Bud3p jest rekrutowane do obszaru szyjki przez uprzednio istniejący pierścien septynowy [8]. Tak więc podczas pączkowania komórek haploidalnych występuje swoisty cykl: pierścien septynowy działa jako matryca do gromadzenia Bud3p i białek towarzyszących, a czynniki te determinują położenie pierścieni septynowych w następnym pokoleniu. Bud3p wraz z septynami stanowi zatem swoistego rodzaju „pamięć strukturalną” uporządkowania przestrzen-

nego dziedziczną z jednego cyklu komórkowego do następnego. Mechanizm tego procesu jest prawdopodobnie bardzo skomplikowany; mieści się w nim cała sekwencja przemian odpowiedzialna za polaryzację miejsca tworzenia pączka na początku cyklu komórkowego, mianowicie kaskada GTPazowa białek Bud1p i Cdc42p [9, 12, 24, 30, 49].

Opisano również genetyczne oddziaływania między genami septynowymi i genami niezbędnymi do dwubiegunowego modelu pączkowania w komórkach diploidalnych [1, 21, 55]. Mechanizm możliwy dla tych oddziaływań jest trudniejszy do interpretacji, ponieważ silna korelacja pomiędzy lokalizacją septyn i determinacją miejsca przyszłego pączka nie pasuje do dwubiegunowego modelu pączkowania [8]. Obok czterech septyn koniecznych w podziale komórki wegetatywnej, drożdże mają dwie dodatkowe septyny: Spr3p i Spr28p, które biorą udział w kształtowaniu ściany zarodnika w czasie sporulacji [13, 18, 47] oraz w morfogenezie związanej z tworzeniem wyrostków w komórkach koniugujących [22, 30]. Tak więc, rola septyn może być zróżnicowana w zależności od warunków fizjologicznych wzrostu komórki [15, 22, 30, 36, 49].

Septyny innych organizmów mogą również pełnić dodatkowe funkcje poza cytokinezą. Podczas gastrulacji zarodków muszki owocowej septyny stwierdzono w miejscu, gdzie aktyna i miozyna współdziałają w czasie zaciskania bruzdy grzbietowej [19]. W neuroblastach ludzkich septynę znaleziono nie tylko w bruzdzie podziałowej, ale także w dystalnych częściach włókien naprężeniowych zawierających aktynę oraz w punktach adhezji do podłoża, a także w skupiskach degenerujących neuronów w chorobie Alzheimer'a [33].

Struktury septynopodobne znakowane monoklonalnym przeciwciałem 12G9 skierowanym przeciwko białkom cytoszkieletu orzęska *Tetrahymena* [27] stwierdzono także w punktach adhezji do podłoża fibroblastów kręgowców z zarodków kurzych oraz komórek 3T3 hodowanych *in vitro* [28], co potwierdza podobieństwo antygeny 12G9 do lepiej poznanych septyn zwierząt i drożdży. Jak wiadomo, w punktach adhezji występuje również wielocząsteczkowy kompleks białek towarzyszących aktynie [45], zaś same mikrofilamenty aktynowe uczestniczą w lokalizowaniu filamentów septynowych w interfazalnych komórkach HeLa [34]. W trakcie gojenia małych uszkodzeń warstwy komórek ssaków hodowanych *in vitro* i w operowanych zarodkach kurzych *in vivo* tworzą się na krawędzi zranionej wiązki filamentów aktynowych wraz z białkami towarzyszącymi (np. miozyna II, wilina, tropomiozyna) podobne do pierścieni zaciskających bruzdę podziałową, w której występują septyny [3, 4]. Białka septynopodobne, znakowane przeciwciałem 12G9 znaleziono w strukturze przyrannej operowanego orzęska *Paraurostyla* oraz wirka *Catenula* [28]. Zatem dalsze badania nad oddziaływaniem septyn z aktyną i innymi białkami pozwolą, być może, na bliższe poznanie mechanizmów nie tylko cytokinezy, ale i gojenia rany.

PODSUMOWANIE

Septyny stanowią nową rodzinę białek występującą we wszystkich dotychczas badanych pod tym kątem eukariontach. Po raz pierwszy wykryto je w pączkujących drożdżach, gdzie współwystępują z filamentami szyjki łączącej pączek z komórką matczyną. Ostatnie badania wykazały, że septyny występują także w innych grzybach, owadach i kręgowcach, a także pierwotniakach. Bez względu na oczywiste różnice w cytokinezie różnych gatunków (np. pączkowanie drożdży, niepełne rozdzielanie komórek w syncycjum wczesnego zarodka muszki (*Drosophila*), pełny podział komórek pierwotniaków czy komórek nabłonkowych kręgowców *in vitro*) septyny wydają się być niezbędne w tym procesie. Septyny zdają się być zaangażowane także w wielu innych procesach, w tym w przekazywaniu do komórek potomnych przestrzennego uporządkowania prowadzącego do organizacji cytoskieletu podpowierzchniowego.

LITERATURA

- [1] AMBERG DC, ZAHNER JE, MULHOLLAND JW, PRINGLE JR, BOTSTEIN D. Aip3p/Bud6p, a yeast actin-interacting protein that is involved in morphogenesis and the selection of bipolar budding sites. *Mol Biol Cell* 1997; **8**: 729–753.
- [2] BALASUBRAMANIAN MK, HIRANI BR, BURKE JD, GOULD KL. The *Schizosaccharomyces pombe* cdc3⁺ gene encodes a profilin essential for cytokinesis. *J Cell Biol* 1994; **125**: 1289–1301.
- [3] BEMENT WM, FORSCHER P, MOOSEKER M. Novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance. *J Cell Biol* 1993; **121**: 565–578.
- [4] BRÖCK J, MIDWINTER K, LEWIS J, MARTIN P. Healing of incisional wounds in the embryonic chick wing bud: characterization of the actin purse-string and demonstration of a requirement of Rho activation. *J Cell Biol* 1996; **135**: 1097–1107.
- [5] BYERS B, GOETSCHL L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J Cell Biol* 1976; **69**: 717–721.
- [6] CASTRILLON DH, WASSERMAN SA. *Diaphanous* is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Dev* 1994; **120**: 3367–3377.
- [7] CHANG F, DRUBIN D, NURSE P. cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol* 1997; **173**: 169–182.
- [8] CHANT J. Septin scaffold and cleavage planes in *Saccharomyces*. *Cell* 1996; **84**: 187–190.
- [9] CHANT J, STOWERS L. GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more. *Cell* 1995; **81**: 1–4.
- [10] CHANT J, MISCHKE M, MITCHELL E, HERSKOWITZ I, PRINGLE JR. Role of Bud3p in producing the axial pattern of yeast. *J Cell Biol* 1995; **129**: 767–778.
- [11] COOPER JA, KIEHART DP. Septins may form a ubiquitous family of cytoskeletal filaments. *J Cell Biol* 1996; **134**: 1345–1348.

- [12] CVRCKOWA F, DeVIRGILIO C, MANSER E, PRINGLE JR, NASMYTH K. Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev* 1995; **9**: 1817–1830.
- [13] DeVIRGILLIO C, DeMARINIDIJ, PRINGLE JR. *SPR28*, a sixth member of the septin family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. *Microbiology* 1996; **142**: 2897–2905.
- [14] DiDOMENICO BJ, BROWN NH, LUPISELLA J, GREENE JR, YANKO M, KOLTIN Y. Homologs of the yeast neck filament associated genes: isolation and sequence analysis of *Candida albicans* CDC3 and CDC10. *Mol Gen Genet* 1994; **242**: 689–698.
- [15] DRUBIN DG, NELSON WJ. Origins of cell polarity. *Cell* 1996; **86**: 335–344.
- [16] EMMONS S, PHAN H, CALLEY J, CHEN W, JAMES B, MANSEAU L. *Cappuccino*, a *Drosophila* maternal effect gene required for polarity of the egg and embryo, is related to the vertebrate limb deformity locos. *Genes Dev* 1995; **9**: 2482–2494.
- [17] FANKHAUSER C, REYMOND A, CERUTTI L, UTZIG S, HOFMANN K, SIMANIS V. The *Saccharomyces pombe* cdc15 gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis. *Cell* 1995; **82**: 435–444.
- [18] FARES H, GOETSCH L, PRINGLE JR. Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 1996; **132**: 399–411.
- [19] FARES H, PEIFER M, PRINGLE JR. Localization and possible functions of *Drosophila* septins. *Mol Biol Cell* 1995; **6**: 1843–1859.
- [20] FIELD CM, AL-AWAR O, ROSENBLATT J, WONG ML, ALBERTS B, MITCHISON TJ. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *J Cell Biol* 1996; **133**: 605–616.
- [21] FLESCHER EG, MADDEN K, SNYDER M. Components required for cytokinesis are important for bud site selection in yeast. *J Cell Biol* 1993; **122**: 373–386.
- [22] GIOT L, KONOPKA JB. Functional analysis of the interaction between Afr1p and the Cdc12p septin, two proteins involved in pheromone - induced morphogenesis. *Mol Biol Cell* 1997; **8**: 987–998.
- [23] HARTWELL LH. Genetic control of the cell division cycle in yeast. 4. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* 1971; **69**: 265–276.
- [24] HERSKOWITZ I. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 1995; **80**: 187–197.
- [25] JERKA-DZIADOSZ M. Cytoskielet i jego rola w organizacji przestrzennej komórki (na przykładzie pierwotniaków). Kuźnicki L [red] Komórka jej budowa i ruch. Zakład Narodowy im. Ossolińskich 1987: 29–68.
- [26] JERKA-DZIADOSZ M, CZUPRYN A. The filaments supporting ciliary primordia and fission furrow in the hypotrich ciliate *Paraurostyla weissei*, revealed by the monoclonal antibody 12G9: studies on wild-type and ciliary hypertrophy mutant. *Protoplasma* 1997; **197**: 241–257.
- [27] JERKA-DZIADOSZ M, JENKINS LM, NELSEN EM, WILLIAMS NE, FRANKEL J. Cellular polarity in ciliates: persistence of global polarity in a disorganized mutant of *Tetrahymena thermophila* that disrupts cytoskeletal organization. *Dev Biol* 1995; **169**: 544–661.
- [28] JERKA-DZIADOSZ M, MUSZYŃSKA K, KRAWCZYŃSKA W. Septin-like filaments in ciliate wound healing. In preparation.
- [29] JOHNSON KA, BORISY GG. Equilibrium Assembly of Microtubules. [w] Molecules and Cell Movement. Inoue S, Stephens RE. New York: Rawen Press 1975; 119–141.
- [30] KACZANOWSKA J, WŁOGA D, KACZANOWSKI A. Polaryzacja komórki, białka polarne i cytokineza. *Post Bioch* 1996; **42**: 227–237.
- [31] KARESS RE, CHANG XJ, EDWARDS KA, KULKARNI S, AGUILERA I, KICHART DP. The regulatory light chain of nonmuscle myosin is encoded by spaghetti-squash, a gene required for cytokinesis in *Drosophila*. *Cell* 1991; **65**: 1177–1189.

- [32] KILMARTIN JV, DYOS SL, KERSHAW D, FINCH JT. A spacer protein in the *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body whose transcript is cell cycle-regulated. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1175–1184.
- [33] KINOSHITA M, KINOSHITA A, HARAGUCHI T, HIRAOKA Y, KUMAR S, NODA M. Mammalian septins: involvement in cytokinesis, actin-based structures and neurodegenerative diseases. *Mol Biol Cell* 1997; **8**: 369a.
- [34] KINOSHITA N, KUMAR S, MIZOGUCHI A, IDE C, KINOSHITA A, HARAGUCHI T, HIRAOKA Y, NODA M. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev* 1997; **11**: 1535–1547.
- [35] KRAUZE K, MAKUCH R. Rola białek motorycznych w mitozie. W przygotowaniu.
- [36] KRON SJ, GOW NAR. Budding yeast morphogenesis: signaling, cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 845–855.
- [37] LI R, ZHENG Y, DRUBIN DG. Regulation of cortical actin cytoskeleton assembly during polarized cell growth in budding yeast. *J Cell Biol* 1995; **128**: 599–615.
- [38] LONGTINE MS, DeMARINI DJ, VALENCIK ML, AL-AWAR OS, FARES H, DeVIRGILIO C, PRINGLE JR. The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 106–119.
- [39] McCOLLUM D, BALASUBRAMANIAN MK, PELCHER LE, HEMMINGSEN SM, GOLULD KL. *Schizosaccharomyces pombe* cdc4 gene encodes a novel EF-hand protein essential for cytokinesis. *J Cell Biol* 1995; **130**: 651–660.
- [40] MILLER KG, KIEHART DP. Fly division. *J Cell Biol* 1995; **131**: 1–5.
- [41] MOMANY M, MORREL JL, HARRIS SD, HAMER JE. Septum formation in *Aspergillus nidulans*. *Can J Bot* 1995; **73**: 396–399.
- [42] MOOSEKER MS, CHENEY RE. Unconventional myosin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; **11**: 633–675.
- [43] NAKATSURU S, SUDO K, NAKAMURA Y. Molecular cloning of a novel human cDNA homologous to CDC10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **202**: 82–87.
- [44] NEUFELD TP, RUBIN GM. The *Drosophila peanut* gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell* 1994; **77**: 371–379.
- [45] NOBES CD, HALL A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibres, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995; **81**: 53–62.
- [46] OAKLEY BR. γ -tubulin: the microtubule organizer? *Trends Cell Biol* 1992; **2**: 1–5.
- [47] OZSARAC N, BHATTACHARYYA M, DAWES IW, CLANCY MJ. SPR3 gene encodes a sporulation - specific homologue of the yeast CDC3/10/11/12 family of bud neck microfilament genes and is regulated by ABFI. *Gene* 1995; **164**: 157–162.
- [48] RODRIGUEZ JR, PATERSON BM. Yeast myosin heavy chain mutant: maintenance of the cell type specific budding pattern and the normal deposition of chitin and cell wall components requires an intact myosin heavy chain gene. *Cell Motil Cytoskel* 1990; **17**: 301–108.
- [49] ROEMER T, VALLIER LG, SNYDER M. Selection of polarized growth sites in yeast. *Cell Biol* 1996; **6**: 434–441.
- [50] SANDERS SL, FIELD CM. Septins in common? *Curr Biol* 1994; **4**: 907–910.
- [51] SANDERS SL, HERSKOWITZ J. The Bud4 protein of yeast, required for axial budding, is localized to the mather/bud neck in a cell cycle dependent manner. *J Cell Biol* 1996; **134**: 413–427.
- [52] SCHROER TA, BINGHAM JB, GILL SR. Actin-related protein 1 and cytoplasmic dynein-based motility – what’s the connection? *Trends Cell Biol* 1996; **6**: 212–215.
- [53] WATTS FZ, SCHIELDS G, ORR E. The yeast *MYO1* gene encoding a myosin-like protein required for cell division. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 1987; **6**: 3499–3505.

- [54] WELCH MD, HOLTZMAN DA, DRUBIN DG. The yeast actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 110–119.
- [55] ZACHNER JE, HARKINS HA, PRINGLE JR. Genetic analysis of the bipolar pattern of bud site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 1857–1870.
- [56] ZHANG CX, LEE MP, CHEN AD, BROWN SD, HSIEH T. Isolation and characterization of a *Drosophila* gene essential for early embryonic development and formation of cortical cleavage furrows. *J Cell Biol* 1996; **134**: 923–934.

Redaktor prowadzący – W. Kilariski

Otrzymano: 01.11. 1997 r.

Przyjęto: 09.02.1998 r.

Adres autora: ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

INDUKCJA EMBRYONALNA W ZARODKACH *XENOPUS LAEVIS* – CZYNNIKI INDUKUJĄCE

EMBRYONAL INDUCTION IN *XENOPUS LAEVIS* EMBRYOS – INDUCING FACTORS

Zofia BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA

Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Weterynaryjny,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Streszczenie: Indukcja embrionalna leży u podstaw różnicowania się komórek. Mimo licznych badań na ten temat charakter czynników indukcyjnych długo był niejasny. W ostatnich latach zidentyfikowano szereg produktów genów zarodkowych: białka sekrecyjne oraz czynniki transkrypcyjne, zdolnych do indukcji. W artykule przedstawiono, jakie białka sekrecyjne i czynniki transkrypcyjne są czynne w indukcji we wczesnym okresie rozwoju zarodków żaby *Xenopus*. Szczególną uwagę zwrócono na rolę tych czynników w tworzeniu centrum Nieuwkoop, indukcji mezodermy, indukcji organizatora Spemanna oraz w indukcji nerwowej.

Słowa kluczowe: embriologia, indukcja, induktory, *Xenopus*.

Summary: Embryonic induction lies at the base of cell differentiation. Despite numerous studies the nature of the inducers remained unclear for a long time. In recent years, however, embryonic gene products: secreted proteins and transcription factors capable of inducing have been identified. In this review secreted proteins and the transcription factors active in embryonic development of the frog *Xenopus laevis* have been presented. The focus is on the role of these factors in the establishment of the Nieuwkoop center, mesodermal induction, induction of the Spemann organizer and in neural induction.

Key words: embryonic induction, *Xenopus*, inducers.

1. WSTĘP

Indukcja embrionalna jest to wzajemne oddziaływanie na siebie różnych części rozwijającego się zarodka, powodująca utworzenie nowego szlaku rozwojowego

w jednym lub obu reagujących systemach [33]. Stoi ona u podstaw różnicowania się komórek w każdym rozwijającym się organizmie. Badania nad indukcją embrionalną, zwłaszcza w rozwoju zarodków płazów i ptaków mają już bardzo długą historię. Rozpoczęli je Spemann i Mangold w 1924 r., a w 1935 r. Spemann został za nie wyróżniony nagrodą Nobla. Od tej pory zainteresowanie indukcją embrionalną nie słabnie. Spemann i Mangold pierwsi wprowadzili pojęcie indukcji embrionalnej induktora, czyli czynnika indukującego i kompetencji jako zdolności komórki do odpowiedzi na działanie induktora. Przez wiele lat starano się bezskutecznie określić naturę i mechanizmy funkcjonowania czynników indukcyjnych. Dopiero pod koniec lat osiemdziesiątych zwrócono uwagę na czynniki wzrostowe jako potencjalne induktory. Od tego czasu uzyskano wiele nowych informacji, które przybliżają nas do zrozumienia istoty indukcji embrionalnej. Najwięcej badań w tym zakresie prowadzonych jest na zarodkach płazów, a w szczególności na zarodkach *Xenopus*, które z wielu względów najlepiej się do tego nadają.

Podstawowe procesy zachodzące w czasie indukcji embrionalnej omówione są w podręcznikach embriologii [4*, 18*¹]. W artykule tym zostaną przedstawione ostatnie osiągnięcia w badaniach nad czynnikami biorącymi udział we wczesnej indukcji embrionalnej w zarodkach *Xenopus*.

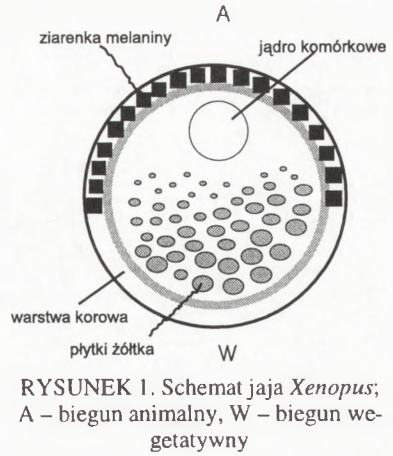
2. ROZWÓJ ZARODKA PŁAZA

Jaja płazów są mezolecytalne, wyraźnie spolaryzowane, można bowiem w nich wyróżnić biegun animalny z jądrem komórkowym i wegetatywny z zagęszczonymi płytkami żółtka (rys. 1). Biegunowość jaja wiąże się z rozłożeniem żółtka w gradiencie animalno-wegetatywnym, a podkreślona jest zagęszczeniem ziaren pigmentu – melaniny w warstwie korowej pod błoną komórkową na półkuli animalnej. W warstwie korowej znajdują się także mikrotubule oraz filamenty aktynowe i miozynowe, stanowiące podścielisko błony komórkowej. W cytoplazmie jaja zawarte są informacje rozwojowe w postaci różnych mRNA i białek zsyntetyzowanych w czasie oogenezy.

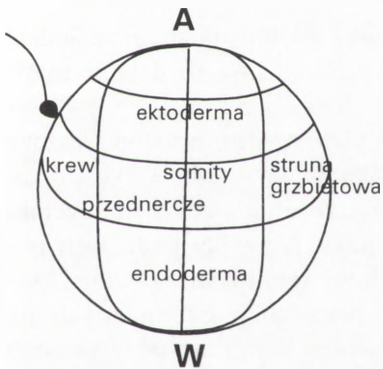
Wniknięcie plemnika powoduje resymetralizację jaja z promienistej na grzbietowo-brzuszną. Odbywa się to na skutek depolaryzacji błony komórkowej, reakcji korowej i obkurczenia się cytoplazmy korowej na półkuli animalnej, co powoduje przesunięcie się warstwy korowej wraz z barwnikiem, tzw. rotację korową. Na skutek tych przesunięć na granicy półkuli animalnej i wegetatywnej na stronie jaja przeciwległej do miejsca wniknięcia plemnika tworzy się obszar, który u większości płazów ma szare zabarwienie, tzw. szary półksiężyc. W zapłodnionych jajach *Xenopus* obszar ten nie wyróżnia się odmiennym zabarwieniem.

¹ np. 18* – pozycja zawiera obszerniejszą literaturę.

Bruzdkowanie całkowite nierównomiernie prowadzi do wytworzenia kulistej blastuli z jamą – blastocellem w środku. Ściana blastuli *Xenopus* składa się z kilku warstw komórek, z małych blastomerów wokół bieguna animalnego i dużych w półkuli wegetatywnej. Pośredniej wielkości blastomery tworzą skośny pas na granicy półkuli animalnej i wegetatywnej zwany strefą brzezną (*marginal zone*). Wyróżnia się stadia wczesnej, średniej i późnej blastuli. Kluczowym dla rozwoju zarodka jest przejście z wczesnej do średniej blastuli – MBT (*Mid Blastula Transition*), kiedy kończą się synchroniczne podziały blastomerów i rozpoczyna się ekspresja własnych (zygotycznych) genów zarodka. Do MBT rozwojem zarodka kieruje wyłącznie matczyzna informacja rozwojowa, nagromadzona uprzednio w jaju w czasie oogenezy.



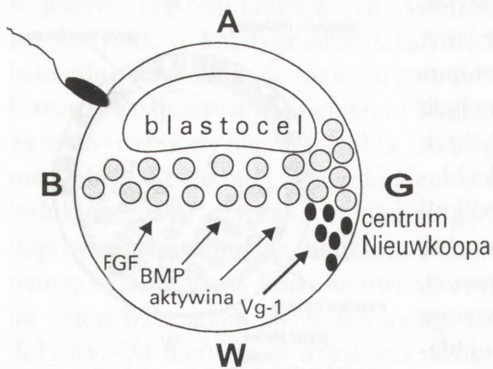
Gastrulacja jest związana z ruchami komórek, a morfologicznym przejawem ich rozpoczęcia jest powstawanie prągeby. Wpuklanie się komórek grzbietowej części strefy brzeżnej do jamy blastuli prowadzi do wytworzenia prajelita, którego strop zawiera materiał na strunę grzbietową, boki na mezodermę przyosiową i boczną, a dno na endodermę (rys. 8). Wpuklanie się komórek zachodzi dzięki ruchom powodującym równoczesne skupianie się ich w pasma w linii środkowej zarodka



oraz wydłużanie się tych pasm w kierunku przyszłego końca głowowego zarodka, co zostało nazwane ruchami morfogenetycznymi zbieżno-wydłużającymi (*convergent-extension*). W końcowym etapie gastrulacji obszar półkuli animalnej obejmujący ektodermę rozciąga się i okrywa półkulę wegetatywną, która wpukla się do blastocellu i pozostaje widoczna jedynie w formie czopa żółtkowego zatykającego prągebę. W ektodermie wyodrębnia się płyta nerwowa, której boczne fałdy łączą się ze sobą tworząc cewę nerwową. Zarodek osiąga wtedy stadium neuruli.

W trakcie rozwoju płaza z jaja o symetrii promienistej powstaje zarodek o wyraźnych osiach: grzbietowo-brzuszej D-V (*dorso-ventralis*) i przednio-tylnej A-P (*anterior-posterior*) o symetrycznym ułożeniu zawiązków narządów wzdłuż osi A-P. Początkiem przemiany symetrii promie-

http://rcin.org.pl



RYSUNEK 3. Schemat blastuli zarodka *Xenopus*: strzałki wskazują kierunek działania czynników indukcyjnych z półkuli wegetatywnej na stronę brzuszną; A – biegun animalny, B – strona brzuszna, G – strona grzbietowa, W – biegun wegetatywny, zaznaczone miejsca wniknięcia plemnika w czasie zapłodnienia

znaczeniu, determinacji i różnicowaniu osi zarodkowych.

nistej jest przesunięcie się składników jaja i nierównomierne ich przydzielenie poszczególnym blastomerom. Interakcja między różniącymi się składem blastomerami, zwłaszcza w strefie brzeżnej, rozpoczyna procesy indukcyjne. W dalszym rozwoju wzajemne oddziaływanie różnych grup komórek prowadzi do wytworzenia listków zarodkowych. Narządy pierwotne, a następnie ostateczne narządy powstają na skutek dalszych indukcji tzw. drugorzędnych w obrębie listków zarodkowych i ich pochodnych. Prace eksperymentalne wielu autorów dały podstawę do wysunięcia hipotezy wielu różnych organizatorów działających w kolejności czasowej i przestrzennej w rozwoju zarodka płazów, w szczególności w wy-

3. METODY BADANIA INDUKCJI U PŁAZÓW

Znakując różnymi metodami poszczególne komórki blastuli można prześledzić ich los w trakcie rozwoju zarodka. Na tej podstawie sporządzono już dawno mapę presumptywnych obszarów jaja i blastuli *Xenopus* (rys. 2, 5).

Klasyczną metodą badania indukcji embrionalnej płazów, wprowadzoną jeszcze przez Spemann, jest wszczepianie wycinków zarodka dawcy w różne okolice zarodka biorcy. Później stosowano często metodę sandwiczów hodując razem wycinki różnych listków zarodkowych czy fragmentów zarodka. W wielu badaniach posługiwano się znakowaniem grup lub pojedynczych komórek. Badano również ksenoindukcję, tj. wpływ obcych tkanek i różnych substancji chemicznych na wywoływanie indukcji. Zaznaczyć tu trzeba, że głównym kryterium pozytywnego wyniku indukcji jest otrzymanie wtórnej cewy nerwowej wyznaczającej dodatkową oś A-P zarodka. Liczne badania prowadzone są na izolowanych częściach blastuli i gastruli, zwłaszcza na izolowanej półkuli animalnej nazwanej czapeczką animalną (*animal cap*) – AC, która hodowana *in vitro* różnicuje się wyłącznie w nietypową ektodermę. AC używane są jako modele testowania wpływu różnych substancji na przebieg indukcji. Badane są również odpowiedzi na czynniki indukcyjne po-

jedynczych komórek izolowanych z zarodka. W ostatnich latach zastosowanie całego wachlarza metod biologii molekularnej i inżynierii genetycznej posunęło badania nad wczesnym rozwojem zarodków kręgowców. Metody te połączone z cytoimmunologicznym oznaczaniem białek i zastosowaniem mikroskopu konfokalnego pozwoliły na lokalizację niektórych czynników indukcyjnych w wczesnych fazach rozwoju zarodkowego *Xenopus*.

4. WYZNACZANIE OSI GRZBIETOWO-BRZUSZNEJ ZARODKA

Determinacja osi D-V zachodzi przed pierwszym podziałem bruzdkowania na skutek rotacji korowej. Rotacja korowa prowadzi do zmiany składu cytoplazmy w rejonie podrównikowym po stronie przeciwnej do miejsca wnikięcia plemnika, przez co rejon ten staje się wyznacznikiem strony grzbietowej zarodka. Przemieszczanie warstwy korowej zachodzi na skutek ślizgania się względem siebie mikrotubul zlokalizowanych w warstwie korowej półkuli wegetatywnej [27].

Wysunięto dwie przeciwstawne hipotezy dotyczące mechanizmu wyznaczenia osi D-V przez rotację korową:

1) Rotacja korowa w czasie pierwszego cyklu komórkowego dostarcza wskazówek przestrzennych, które aktywują lokalnie poszczególne rejony jaja; w nich z kolei ujawniają się nowe wskazówki decydujące o późniejszych etapach determinowania osi D-V.

2) Na biegunie wegetatywnym jaja są zlokalizowane determinanty grzbietowe i w czasie rotacji przesuwają się do rejonu podrównikowego [38].

Za tą drugą hipotezą przemawiają wyniki badań z ostatnich dwóch lat. Wykazano bowiem, że wegetatywna warstwa korowa jest specjalną częścią cytoszkieletu, w której zakotwiczą się czynniki matczyne oraz że w niezapłodnionym jajku na małym obszarze (obejmującym około 2% powierzchni warstwy korowej) na biegunie wegetatywnym skupione są determinanty grzbietowe [22, 38]. W rotacji korowej determinanty te przesuwane są wzdłuż linii południka do rejonu podrównikowego. W czasie bruzdkowania determinanty zostają przydzielone określonym blastomerom. W blastuli ta mała grupa komórek zlokalizowana w rejonie wegetatywnym poniżej części równikowej tworzy tzw. centrum Nieuwkoop [10] (rys. 3, 9). Centrum to indukuje w przylegających do niego komórkach pasa równikowego powstanie organizatora Spemanna. W odróżnieniu od organizatora Spemanna komórki centrum Nieuwkoop nie wchodzi w skład struktur, które ono indukuje, a zgodnie ze swoim przeznaczeniem wchodzi w skład endodermy.

Determinanty grzbietowe mogą być transportowane w czasie oogenezy, dojrzewania jaja oraz po zapłodnieniu wraz z tzw. chmurkami (ang. *nuage material*) związanymi z mitochondriami i stanowiącymi determinanty komórek prapłciowych.

TABELA 1. Zestawienie czynników białkowych odgrywających rolę w początkowych procesach indukcji w zarodkach *Xenopus*.

Czynniki	Lokalizacja w rozwoju zarodka			Działanie na izolowaną AP	Literatura
	ja-jo	blastula	gastrula		
CZYNNIKI SEKRECYJNE Rodzina TGF β (<i>Transforming Growth Factor</i>) – transformujący czynnik wzrostowy typu β Aktywina	X	półkula weget. cała	struna grzbietowa brzuszna połowa	dorsalizacja mezodermy wentralizacja mezodermy, epidermizacja	3,21*
<i>BMP (Bone Morphogenetic Protein)</i> – białko morfogenetyczne kości Vg 1	X	cała	struna grzbietowa brzuszna połowa	dorsalizacja mezodermy	3,9*, 16, 21*,48
Chordyna	?	półkula weget. ?	struna grzbietowa organizator Spemanna	dorsalizacja	3,10, 21*
Dorsalina	X	?	ektoderma epidermalna organizator Spemanna	?	49*
Xnr białko kodowane przez gery związane z <i>Nodal</i> myszy	–	–	organizator Spemanna	dorsalizacja	21*, 14,17, 39
Rodzina WNT białka homologiczne do wingless <i>Drosophila</i> Xwnt	?	centrum Nieuwkoop	strefa brzeżna		3,10, 15
Noggin	X		organizator Spemanna	neuralizacja ektodermy	3,52*
Follistatyna	X	–	organizator Spemanna	neuralizacja	3
FGF (<i>Fibroblast Growth Factor</i>) czynnik wzrostu fibroblastów	X	?	organizator Spemanna		3,21*, 52*
CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE Rodzina T-box – białka o domenie T-box <i>Apod (anipodean)</i>	X	strefa brzeżna	presumptywna mezoderma	mezoderma brzuszna mięśnie	43*
Brat	X	strefa brzeżna	presumptywna mezoderma	mezoderma brzuszna	15*
<i>Eomes (eomesodermin)</i>	X	strefa brzeżna	presumptywna mezoderma	mezoderma grzbietowa	15*, 43*

TABELA 1 cd.

Czynniki	Lokalizacja w rozwoju zarodka			Działanie na izolowaną AP	Literatura
	ja-jo	blastula	gastrula		
CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE Veg-T	X	strefa brzeżna	presumptywna mezoderma w a r g a blastoporu	różne	51
Xbra (<i>Xbrachyury</i>)	X	strefa brzeżna	mezoderma zanika w strunie grzbietowej	dorsalizacja mezodermy	3, 7*, 46*
Xombi (<i>Xenopus optomotor blind</i>)	X	strefa brzeżna		różne	31*
Rodzina Homeobox koduje białka o homeodomenie Gsc (<i>goosecoid</i>)	-	mezoderma grzbietowa	?	modyfikacja mezodermy	3, 52*
Lim-1	-	-	organizator Spemann		3
Otx (<i>orthodenticle</i>)	-	-	organizator Spemann		1*, 29*
Siamois	-	centrum Nieuwkoop	cała	?	10
Vox	X	cała	część brzuszna zarodka	wentralizacja	41*
Xmsx1	-	-	część brzuszna zarodka	epidermizacja	45*
Xnot	-	strefa brzeżna		częściowa wentralizacja	41*
Xwent	-	mezoderma brzuszna	mezoderma brzuszna	wentralizacja	40*, 41*
Rodzina fork head HNF (<i>hepatic nuclear factor</i>) (dawniej LNF – <i>liver nuclear factor</i>)	-	-	mezoderma endoderma		3, 47*
Pintallavis	-	-	organizator Spemann		7*, 51*
Białka z palcami cynkowymi Xcat podobne do nanos u <i>Drosophila</i>	X	-	-	?	52
Inne białka XIPOU		strefa brzeżna grzbietowa	organizator Spemann	hamowanie BMP	49

Wykazano, że chmurki te zawierają szereg specyficznych mRNA, takich jak mRNA dla Xcat-2, Xwnt-11 (tab. 1) [43, 52].

Inny mechanizm wyznaczania strony grzbietowej zarodka *Xenopus*. proponuje Kageura [19]. W niezapłodnionym jaju czynnik grzbietowy jest zlokalizowany w cytoplazmie korowej dookoła bieguna wegetatywnego. Drugi czynnik określony jako korowy jest rozmieszczony nierównomiernie, najwyższe stężenie ma w strefie równikowej malejące w kierunku obu biegunów. Czynniki te są rozdzielone. W czasie rotacji korowej czynnik grzbietowy przesuwa się z bieguna wegetatywnego na przyszłą stronę grzbietową i rozciąga się na półkulę animalną. Ponieważ położenie czynnika korowego nie zmienia się, w rejonie grzbietowym części równikowej obydwie te czynniki nakładają się. Na skutek ich interakcji pojawia się ostateczny determinant nazwany rzeczywistym determinanem grzbietowym (*actual dorsal determinant*), który determinuje centrum Nieuwkoopa. Może on być zmodyfikowanym czynnikiem korowym lub zmodyfikowanym czynnikiem grzbietowym.

Jakie są mechanizmy działania i natura samych determinantów grzbietowych, nie wiadomo. Za czynniki dorsalizujące uważane są przez wielu autorów aktywna i białka sekrecyjne kodowane przez geny *Vg1*, *noggin*, *Wnt* (tab. 1), ponieważ indukują one drugą oś grzbietową zarodka, jednak rola ich w pierwotnej determinacji strony grzbietowej nie jest jasna.

Niektórzy autorzy przypuszczają, że determinanem grzbietowym jest proteaza, która rozszczepia prekursor Vg-1 (patrz dalej) do aktywnej formy [38*]. Zhang i King [51] sugerują, że determinanem grzbietowym może być czynnik transkrypcyjny Veg-T, tworzy on gradient stężenia wzdłuż osi animalno-wegetatywnej, który może determinować losy komórek przez regulację genów docelowych w zależności od poziomu jego stężenia.

W centrum Nieuwkoopa ulegają ekspresji geny *Siamois* i *Wnt* (tab. 1). Białko Siamois pojawia się w grzbietowej części półkuli wegetatywnej w jądrach komórkowych w MBT. W centrum Nieuwkoopa wykryto również obecność cząsteczek sygnalizacji śródkomórkowej: kateniny β^* oraz kinazy syntazy glikogenowej-3 GSK-3 (*Glycogen Synthase Kinase*). Katenina α , jak i katenina β oraz plakoglobina są syntetyzowane w czasie oogenezy w oocyocie *Xenopus*. Katenina β jest obecna pod koniec rotacji korowej w warstwie mikrotubul na grzbietowej stronie jaja, a następnie w grzbietowych blastomerach z maksimum koncentracji w zewnętrznej warstwie ektodermalnej. Od stadium 16 blastomerów znajduje się także w jądrach komórkowych. Wstrzyknięta do zarodka katenina β gromadzi się na grzbietowej stronie zarodka [10, 19*, 24, 28, 50].

Wnt dla działania indukcyjnego wymaga pośrednictwa kateniny β [10]. Z kilku znanych białek rodziny Wnt obecnych w zarodku *Xenopus*, tylko Xwnt-8 wpływa

* Katenina jest białkiem cytoplazmatycznym związanym z kadheryną i także czynnikiem transkrypcyjnym.

na ekspresję kateniny β . Wstrzyknięte do zarodka Xwnt-8 zwiększało w nim ilość kateniny o ponad 200%, podczas gdy Xwnt-11 wpływało minimalnie na poziom kateniny. Xwnt-8 hamuje działanie GSK-3, ta w braku Xwnt-8 fosforyluje bezpośrednio kateninę, powodując jej degradację. Asymetryczne rozmieszczenie kateniny β w zarodku we wczesnej blastuli może być spowodowane większą aktywnością GSK-3 na stronie brzusznej niż na grzbietowej [27].

Według Fagotto i wsp. [10] centrum Nieuwkoopowa powstaje dzięki kaskadzie sygnalizacyjnej Wnt- GSK – katenina β , w której Wnt rozpoczyna szlak transdukcji hamując działanie GSK-3, przez co uruchamia sygnalizację kateniny β , prowadzącą do ekspresji *Siamois*. Centrum Nieuwkoopowa wydziela z kolei czynnik (czynnik ?) bliżej jeszcze nieznaną, który w przylegającej mezodermie grzbietowej indukuje powstanie organizatora Spemanna. Autorzy ci uważają również, że aktywna, Vg-1 i Noggin nie mogą być determinantami grzbietowymi, gdyż nie wymagają obecności kateniny β dla swej funkcji indukcyjnej.

5. INDUKCJA MEZODERMALNA

Indukcja mezodermalna zachodzi w blastuli jeszcze przed rozpoczęciem ekspresji genów zygotycznych. Uważa się obecnie, że indukcja mezodermy zachodzi równocześnie z indukcją endodermy [15].

Półkula wegetatywna jest dominującą we wczesnej blastuli i wpływa na dalszy rozwój zarodka. Czynniki w niej wydzielane lub znajdujące się wpływają na komórki leżące w części granicznej – równikowej, ukierunkowując je w przyszłe komórki mezodermalne. Czynniki indukujące mezodermę – tzw. mezodermizujące są rozmieszczone nierównomiernie w półkuli wegetatywnej, co wykazano już dawno badając zdolności indukcyjne poszczególnych blastomerów. Makromery grzbietowe indukują w półkuli animalnej strunę grzbietową i mięśnie, a makromery brzuszne powstawanie mezotelium i mezenchymy. [4]. Prowadzi to więc do wytworzenia uporządkowanego wzoru różnicowania się przyszłej mezodermy wzdłuż osi D-V. Dla ułatwienia obszary strefy brzeżnej zaindukowanej w mezodermę i przeznaczone na wytworzenie określonych struktur nazwano strefą brzeżną grzbietową, boczną, czyli pośrednią i brzusznią (rys. 4).

Wysunięto kilka hipotez przebiegu indukcji mezodermalnej. Hipoteza lansowana przez Smith i Slacke [40, 42] pod koniec lat osiemdziesiątych zakłada trzy sygnały w indukcji mezodermalnej.



RYSUNEK 4. Podział strefy brzeżnej w blastuli zarodka *Xenopus*: A – biegun animalny, W – biegun wegetatywny

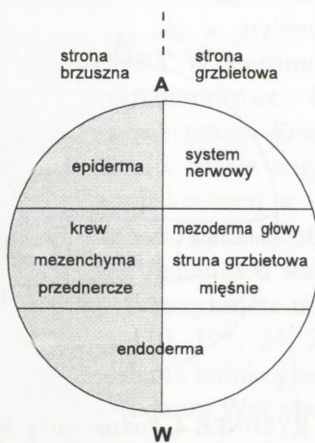
Pierwszy sygnał pochodzi z grzbietowej części półkuli wegetatywnej i indukuje strunę grzbietową oraz niewielką ilość mięśni, drugi sygnał pochodzi z brzusznej części i indukuje krew, mezenchymę i mezotelium. Trzeci sygnał, wytworzony już przez samą zaindukowaną mezodermę, determinuje jej część grzbietową i powoduje, że z bocznej mezodermy tworzą się mięśnie zamiast krwi i mezenchymy. Obecnie przedstawiane są dwa modele indukcji mezodermy. Jeden zakłada, że mezoderma brzuszna jest stanem podstawowym, jaki przyjmuje strefa brzeżna zaindukowana przez półkulę wegetatywną w braku sygnałów dorsalizacyjnych. Według drugiego dla uformowania mezodermy brzusznej konieczne są aktywne sygnały i nie wystarcza pierwotne zaindukowanie w kierunku mezodermy [16*].

W ciągu ostatnich 10 lat rozpoznano charakter niektórych czynników indukujących mezodermę. Są to zarówno białka sekrecyjne, jak i czynniki transkrypcyjne. Rolę tych czynników badano głównie śledząc ich wpływ na AC, wstrzykując ich transkrypty do wczesnych zarodków lub do poszczególnych komórek. Jednak działanie danego czynnika w warunkach eksperymentalnych nie zawsze odzwierciedla jego działanie *in vivo*. Brak jest również jednolitych kryteriów określających wynik działania danego czynnika.

Czynniki sekrecyjne

Rozpoczęcie indukcji mezodermy odbywa się pod wpływem czynników matczynych przed transkrypcją genów zygotycznych w MBT. W ostatnich kilku latach wykazano że białka bFGF i eFGF, aktywina, Vg 1 i transkrypty genów *Xbra*, *Eomes*, *Apod*, *Xwnt 8*, *Brat*, (tab. 1), które mają wpływ na różnicowanie się mezodermy, są już obecne przed zapłodnieniem w jajach *Xenopus* [3, 15, 43 i inni].

Co najmniej dwa rodzaje mezodermy zostają zaindukowane w strefie brzeżnej przed MBT. Brzuszna mezodermę indukują czynniki aktywne w części brzusznej półkuli wegetatywnej, a czynniki wytwarzane w centrum Nieuwkoop indukują mezodermę grzbietową. Lemaire i Gurdon (cyt. za [51]) sugerują, że dla wytworzenia wzoru mezodermy konieczna jest równoczesna aktywacja dwóch szlaków: indukcyjnego i autonomicznego komórkowego. W tym drugim mogą uczestniczyć czynniki matczyne, o czym świadczą obserwacje, że w komórkach izolowanych z strefy brzeżnej blastuli autonomicznie ulegają ekspresji geny charakterystyczne dla



RYSUNEK 5. Schemat obszarów presumptywnych blastuli zarodka *Xenopus*: A – biegun animalny, W – biegun wegetatywny

wczesnej mezodermy, takie jak: *Gsc* i *Xwnt* -8 (Lemaire i Gurdon 1994 cyt. za [15])

Za główne czynniki indukujące mezodermę uważa się aktywinę, Vg1 i Noggin. Aktywina była pierwszym czynnikiem wzrostowym z rodziny TGF β , który został rozpoznany jako czynnik indukujący mezodermę [4]. To rozpuszczalne białko występuje w wielu narządach kręgowców. Aktywina gromadzi się w oocycie *Xenopus* prawdopodobnie transportowana z pęcherzyka jajnikowego (gdyż w oocycie nie znaleziono jej mRNA [21]). We wczesnej blastuli jest rozmieszczona nierównomiernie w półkuli wegetatywnej, w wyższym stężeniu w części grzbietowej. Rozmieszczenie jej pokrywa się z polem morfogenetycznym dla indukcji mezodermy określonym przez Nieuwkoop i innych [4]. We wczesnej gastruli ekspresja aktywiny ogranicza się do obszarów przyszłej struny grzbietowej i struktur głowowych [21]. Aktywina działa na komórki AC w zależności od stężenia, w dużych dawkach indukuje mezodermę grzbietową. Na podstawie tego sądzi się, że endogenne gradient stężenia aktywiny jest odpowiedzialny za różnicowanie się poszczególnych części mezodermy (*patterning*) [21] i uważa się aktywinę za czynnik dorsalizujący pierwotnie zaindukowaną mezodermę. Aktywina może aktywować czynniki matczyne przed wejściem zarodka w MBT [50]. Zahamowanie indukcji mezodermy przez aktywinę można także uzyskać wprowadzając do zarodka okrojone receptory typu II dla aktywiny [21]. Zablokowanie czynności indukcyjnej aktywiny daje w sumie sygnał neurulizujący. Naturalnym inhibitorem aktywiny jest follistatyna (patrz rozdz. 6).

Cząsteczki matczynego Vg 1 zlokalizowane w wegetatywnej półkuli jaja i we wczesnym zarodku są nieaktywne [52]. Dojrzewanie tego białka, prawdopodobnie potranslacyjne, zachodzi w komórkach grzbietowej części półkuli wegetatywnej [21]. Dojrzały Vg 1 ma zdolność indukowania mezodermy grzbietowej i organizowania całej osi grzbietowej w AC. Uważany jest za naturalny induktor mezodermy grzbietowej [21].

Działanie dorsalizujące Vg1 i aktywiny zachodzi bezpośrednio w miejscach powstawania organizatora Spemanna o obniżonej ekspresji *Siamois* [10]. Białka te mogą jednak działać jako trzeci sygnał Smith i Slacka, naśladując czynniki wydzielane przez centrum Nieuwkoopu indukujące organizator Spemanna. Zgadza się to z poglądem, że organizator Spemanna jest determinowany przez koordynację sygnałów mezodermalnych i sygnałów dorsalizujących z centrum Nieuwkoopu [10*].

Ostatnio zwrócono uwagę na działanie białek BMP (tab. 1) w indukcji embrionalnej. W blastuli ulegają ekspresji *Bmp-2*, *Bmp-4* i *Bmp-7*. BMP-2 jest białkiem matczym występującym w bardzo małym stężeniu i przypuszcza się, że ta forma nie działa w indukcji mezodermy. Białka BMP-4 i BMP-7 mają podobną lokalizację we wczesnym zarodku i prawdopodobnie pełnią jednakową funkcję. Ekspresja genu *Bmp-4* rozpoczyna się w MBT w całym zarodku, z maksimum w brzusznej jego połowie. We wczesnej gastruli białko to wykrywane jest w części brzusznej

i brzuszno-bocznych strefy brzeżnej. Zawartość mRNA dla BMP-4 w brzusznej strefie brzeżnej jest 5 razy wyższa niż w grzbietowej [9, 41]. W czasie gastrulacji ekspresja *Bmp-4* zanika w presumptywnej neuroektodermie, a pozostaje w brzusznej i bocznej strefie brzeżnej oraz w presumptywnej ektodermie epidermalnej [14, 16]. W warunkach eksperymentalnych BMP-4 indukuje mezodermę brzuszną w AC, hamuje także rozwój mezodermy grzbietowej w AC zaindukowanej aktywiną. Wstrzyknięty do wczesnego zarodka mRNA dla BMP-4 blokuje rozwój struktur grzbietowych. Brzuszna strefa brzeżna z wysoką ekspresją *Bmp-4* nie ulega dorsalizacji pod wpływem sygnałów z organizatora [16]. Częściowe zahamowanie działania BMP-4 w bocznych obszarach strefy brzeżnej prowadzi do wytworzenia mięśni i przednercza [16]. Nadekspresja *Bmp-4* powoduje rozwój epidermy, a zahamowanie tej ekspresji rozwój neuroektodermy [14, 16]. Funkcję BMP-4 hamuje aktywina, follistatyna, Noggin i chordyna [16]. Chordyna i Noggin wiążą się bezpośrednio z BMP-4 [14*]. Wykazano również, że efekt działania BMP-4 i aktywiny zależy od czasu jego działania oraz od zapotrzebowania na ten czynnik komórek reagujących z nim. Przedłużenie działania może wyrównać jego niski poziom [48].

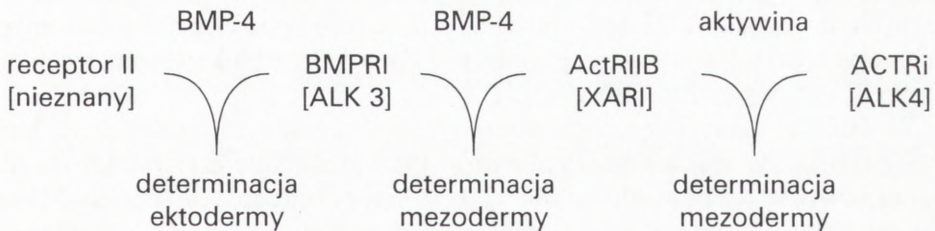
Różne wyniki, jakie uzyskiwano działając BMP-4 na izolowaną półkulę animalną i izolowane komórki zarodka, zostały ostatnio wyjaśnione. Białko BMP4 jest, jak się wydaje, kluczowym czynnikiem odgrywającym rolę zarówno w indukcji mezodermy, jak i w różnicowaniu się ektodermy w epidermę i neuroektodermę. Uważa się, że BMP-4 jest równocześnie czynnikiem wentralizującym mezodermę i epidermalizującym ektodermę. Po rozpoczęciu transkrypcji genów zygocytycznych w średniej blastuli BMP-4 wywiera działanie wentralizujące na mezodermę i uodparnia ją na działanie czynników dorsalizujących [16]. Wynik działania BMP-4 zależy od jego stężenia, lokalizacji oraz od stadium rozwoju zarodka. Stopniowanie aktywności BMP-4 w strefie brzeżnej jest wynikiem nakładania się antagonistycznych czynników: BMP-4 i Noggin (rys. 10). Obydwa te czynniki uważane są za działające na dużą odległość (*long range*), stąd ich stężenie może być także regulowane przez dyfuzję w substancji międzykomórkowej. W zależności od stężenia BMP-4 indukuje w AC z blastuli 4 rodzaje komórek mezodermalnych [9]. Różnicowanie się mezodermy brzusznej przejawiające się ekspresją genu *Xwent-1* jest skutkiem najwyższej aktywności BMP-4. Z bocznych części strefy, gdzie aktywność BMP-4 jest częściowo zablokowana przez Noggin różnicują się mięśnie z ekspresją markerowego dla nich genu *Xmf 5*. Dosch i wsp. [9] podkreślają, że ważniejsza jest aktywność BMP-4 niż jego stężenie.

Do rodziny TGF β należą także białka kodowane przez geny *Xnr* (tab. 1), homologiczne z genami *nodal* występującymi w węzle pierwotnym zarodka myszy. W zarodkach *Xenopus* aktywne są cztery geny *Xnr 1, 2, 3 i 4*. *Xnr 1, 2 i 4* odgrywają rolę w indukcji mezodermy, *Xnr1 i Xnr2* ulegają ekspresji w całej strefie brzeżnej, a *Xnr4* w głębokiej warstwie grzbietowej strefy brzeżnej. Indukują one mezodermę w AC, jednak każdy inaczej. Białko *Xnr2* jest najsilniejszym induktorem, już w

małych dawkach aktywuje gen *Xbra* uważany za marker mezodermy oraz gen *gsc* (tab. 1). *Xnr2* indukuje mezodermę zależnie od stężenia, a obecność *Noggin* zwiększa jego aktywność [39]. *Xnr4* aktywuje równocześnie *Xbra* i *Xwent* [17]. *Xnr3* nie jest zdolny do indukcji mezodermy i odgrywa rolę w organizatorze Spemann (patrz niżej). Produkty genów *Xnr* nie zostały znalezione do tej pory w jaju wśród białek informacji matczynej, prawdopodobnie ekspresja ich jest uruchamiana dopiero w blastuli. Sądzić więc można, że nie biorą one udziału w początkowej indukcji mezodermy i odgrywają rolę w utrzymaniu mezodermy i wytwarzaniu organizatora Spemann. Ekspresja genów *Xnr* zanika po gastrulacji, jedynie *Xnr1* w dalszym rozwoju zarodka wpływa na asymetryczne położenia serca i zawoju jelita [39].

Stennard i wsp. [43] uszeregowali czynniki z rodziny TGF β według wzrastającej zdolności dorsalizacji mezodermy w następującej kolejności: aktywina, Vg1, *Xnr2*, BMP-4.

Nieco światła na działanie indukcyjne czynników TGF β rzuciły wyniki badań nad ich receptorami. Zarówno aktywina, Vg 1, jak i BMP oddziałują na komórki za pośrednictwem takich samych heterodimerowych kompleksów receptorów objętych nazwą ALK (*activin receptor like kinase*), złożonych z receptora typu I (ActRI - ALK2, BMPRIA - ALK3, XALK4) oraz receptora typu II (ActRII, BMPRII, TII). BMP wiąże się z receptorem typu II i fosforyluje reszty serynową i treoninową sródkomórkowej domeny receptora typu I. Rozpoczyna to kaskadę sygnałów transdukcyjnych, w której udział biorą białka o wspólnej nazwie Smad. Białka te usforylowane przemieszczane są z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie regulują transkrypcję docelowego genu (genów). W transdukcji sygnałów BMP-4 czynne są Smad 1 i Smad 4 [44, 48], aktywina działa prawdopodobnie przez Smad 2 [48]. Chang i wsp [6] wykazali, że aktywina wiąże się z kompleksem receptora typu I (XALK 4) z receptorem typu II (XActRIIB). BMP-3 może się wiązać z kompleksami innych receptorów. Jeżeli BMP-4 zwiąże się z kompleksem receptora typu I – BMPRI (Alk3) i typu II – ActRIIB, indukuje mezodermę, natomiast jeżeli zwiąże się z kompleksem receptora typu I – BMPRI (Alk3) z bliżej nieznanym receptorem typu II, indukuje ektodermę (rys. 6). Dla indukcji mezodermy konieczna



RYSUNEK 6. Schemat działania indukcyjnego BMP i aktywiny zależnego od kompleksu receptorów (wg Chang i wsp. [6] nieco zmieniony; szersze omówienie w tekście)

jest obecność w kompleksie receptora ActRIIB. Zablokowanie jednego receptora w kompleksie powoduje zahamowanie aktywności indukcyjnej czynnika. W cytoplazmie jaja zawarty jest natomiast mRNA dla receptora aktywiny typu II. Receptory typu I i II dla aktywiny ulegają ekspresji po pierwszym podziale bruzdkowania w zarodku *Xenopus* [6]. Działanie czynników indukujących z rodziny TGF β jest prawdopodobnie regulowana nie tylko przez aktywne receptory.

Właściwości indukcyjne FGF wykazano pod koniec lat osiemdziesiątych [40]. Zarówno transkrypty matczyne, jak i samo to białko znajdują się w półkuli wegetatywnej zapłodnionego jaja [21], jak się wydaje czynnik ten pełni wieloraką funkcję zależnie od stadium rozwoju zarodku *Xenopus*. W AC FGF indukuje mezodermę brzuszno-boczną, mezenchymę i w niewielkiej ilości mięśnie, nie indukuje natomiast mezodermy grzbietowej i krwi (tj. definitywnej mezodermy brzusznej). Uważa się, że sygnały FGF są niezbędne dla tworzenia tułowia i tylnej mezodermy ze struną grzbietową i mięśniami włócznic, ponieważ zablokowanie receptorów dla FGF w całym zarodku powoduje defekty w rozwoju struktur tylnych. Tworzenie się przednich części ciała jest niezależne od FGF [5, 21]. Sygnalizacja FGF jest potrzebna dla odpowiedzi komórek na indukcję aktywiny. Nie jest jasne, czy szlaki sygnalizacyjne aktywiny i FGF zachodzą równocześnie w tych samych komórkach i w tym samym czasie. Cornell i wsp. (cyt. za [5]) uważają, że czynniki podobne do aktywiny obecne w półkuli wegetatywnej nie prowadzą do wytworzenia mezodermy, ponieważ w tej półkuli brak jest sygnałów FGF, podczas gdy FGF obecne w pasie równikowym blastuli pozwala na ekspresję w tych komórkach genów mezodermalnych. Nie wiadomo jednak, jak sygnały FGF są wykluczane z endodermy.

Tada i wsp. [46] widzą co najmniej podwójną rolę FGF w tworzeniu mezodermy u *Xenopus*. Czynnik ten jest zdolny do indukcji mezodermy w presumptywnej ektodermie, ale właściwość ta zanika na początku gastrulacji, na skutek wygasania kompetencji w komórkach ektodermalnych.

W czasie tworzenia się mezodermy sygnalizacja FGF wiąże się z ekspresją genów *Xbra* i *eFGF* i powstaje samoregulująca się pętla. FGF indukuje ekspresję genu *Xbra*, a białko *Xbra* indukuje ekspresję genu *fgf*. Obecność FGF jest potrzebna dla utrzymania pętli. Ta wzajemna regulacja zachodzi tylko w mezodermie grzbietowej, Ekspresja *Xbra* w mezodermie brzusznej nie podlega autoregulacji [7]. W normalnym zarodku FGF jest potrzebny dla ruchów gastrulacyjnych bocznych i brzusznych przy formowaniu się prągnię. Zarodki z zablokowanym receptorem dla FGF nie wytwarzają prągnię [31].

W przekazywaniu sygnału induktorów mezodermalnych pośredniczą kinazy Raf-1 i MAP [1, 5]. La Bonne i Whitman [5] wykazali, że aktywna kinaza MAP jest nieodzowna dla prawidłowej funkcji FGF w rozwoju zarodku *Xenopus*. Mierzyli oni aktywność tej kinazy i stwierdzili, że jest niewielka w czasie bruzdkowania, a wzrasta nieco we wczesnej blastuli. Jest jednakowa w półkuli wegetatywnej i strefie brzeżnej, ale kilkakrotnie wyższa niż w półkuli animalnej. Po stadium MBT

aktywność kinazy Map gwałtownie wzrasta w całym zarodku i osiąga maksimum w połowie gastrulacji, przy czym najwyższa jest w półkuli wegetatywnej. Przed powstaniem komórek butelkowych (charakterystycznych dla rozpoczynającej się gastrulacji [4]) aktywność kinazy MAP kilkakrotnie zwiększa się w grzbietowej części zarodka, następnie wykazuje się ją wokół tworzącej się prągeby. Niska aktywność kinazy MAP w półkuli animalnej, jak się sądzi, osłabia działanie FGF i zapobiega odpowiedzi na sygnały mezodermizujące. Aktywność kinazy MAP w tworzących się wargach prągeby i obecność tam FGF świadczą o roli tego czynnika wzrostowego w ruchach morfogenetycznych komórek w czasie gastrulacji. Ponadto endogenna aktywacja kinazy MAP przez FGF w zarodku wpływa na nabywanie kompetencji przez komórki trzech listków zarodkowych w odpowiedzi na wczesne sygnały indukcyjne [5].

W indukcji mezodermy, jak się wydaje, odgrywa rolę również białko Wnt. Gen *Xwnt-8* ulega ekspresji w strefie brzeżnej, która zanika w organizatorze Spemanna pod wpływem białka Gsc. Działanie *Xwnt* nie jest jeszcze jasne. Jak się wydaje, białko to działa inaczej we wczesnej blastuli, kiedy wpływa na wytworzenie centrum Nieuwkoop, a inaczej po MBT, kiedy powoduje wentralizację przedniej mezodermy i hamuje jej zdolność indukcji przedniej części mózgu [34]. *Xwnt-8* wstrzyknięte do brzusznych blastomerów przed MBT powoduje powstanie z nich pełnej osi wtórnej zarodka [51]. Rozmieszczenie transkryptów *Xwnt-8* w normalnym zarodku *Xenopus* w części brzusznej i fakt, że nadekspresja *Xwnt* w późnej blastuli wentralizuje już zaprogramowaną mezoderme, nie wskazują na jego rolę jako modyfikatora mezodermy. Może działać jako modyfikator kompetencji komórek, zmieniając odpowiedź komórki na indukcję i wzmacniając przez to tworzenie się mezodermy grzbietowej [34].

Czynniki transkrypcyjne

Obok czynników wzrostowych na determinację i różnicowanie się mezodermy ma wpływ wiele czynników transkrypcyjnych ulegających ekspresji w blastuli i w gastruli.

Czynniki transkrypcyjne z rodziny T-box: *Apod*, *Brat*, *Xbra* i *Eomes*, *Xombi*, *Veg-T* (tab. 1) jako transkrypty matczyne znajdują się w cytoplazmie jaja, a następnie ulegają ekspresji zygotycznej. Matczyny *Xbra* mRNA jest rozmieszczony w jaju równomiernie, ale może być uwidoczny dopiero po zabezpieczeniu go przed działaniem rybonukleaz [51]. Prawdopodobnie indukuje endoderme [15]. Geny *Apod*, *Brat* i *Xbra* uważa się za geny panmezodermalne, a ich ekspresja wskazuje na ukierunkowanie komórek w mezoderme. Zygotyczna ekspresja *Apod* i *Eomes* zachodzi równocześnie w szerokim pasie równikowym w MBT [43]. *Xbra* i *Brat* ulegają ekspresji w zaindukowanej presumptywnej mezodermie w późnej blastuli i wczesnej gastruli. W dalszym rozwoju ekspresja *Xbra* utrzymuje się w strunie

grzbietowej, a ekspresja *Brat* w niej zanika [15]. Białko Veg-T w jaju jest zlokalizowane w tych samych miejscach cytoplazmy korowej co Vg1. W MBT ekspresję *Veg-T* oraz *Xbra* obserwuje się w jądrach komórek początkowo w całej strefie brzeżnej. Następnie ekspresja *Veg-T* zanika w strunie grzbietowej, ale pozostaje dookoła zamykającej się prąży [51].

W warunkach eksperymentalnych każde z wyżej wspomnianych białek z rodziny *T-box* indukuje inny rodzaj mezodermy. *Apod* indukuje mezodermę brzuszną i mięśnie, a *Xbra* mezodermę brzuszną [8]. *Brat* niezależnie od dawki indukuje mezodermę w całej strefie brzeżnej [15]. Jak się wydaje, żaden z tych czynników nie jest zdolny do samodzielnej i całkowitej indukcji mezodermy. Geny *Apod* i *Eomes* mają zdolność wzajemnego aktywowania się i tworzą pętlę regulacji krzyżowej (*crossregulatory loop*). *Eomes* indukuje również ekspresję *Xbra* [43]. *Xbra* powoduje dorsalizację mezodermy, jeżeli ulega ekspresji równocześnie z *Noggin* i *Xwnt* [51*]. Wykazano również podobne synergistyczne działanie *Xbra* i *pin-tallavis* [51*]. Ponadto jak wyżej wspomniano, *Xbra* kooperuje w indukcji mezodermalnej z FGF [7]. *Xbra* w swej domenie regulacyjnej ma zarówno rejon aktywujący, jak i rejon hamujący [51].

Veg-T w warunkach eksperymentalnych wykazuje różne działania. Ma zdolność samoregulacji [60]. Ektotopowa ekspresja tego genu przemienia ektodermę w mezodermę i wywołuje ekspresję *Xwnt-8*. *Veg-T* i *Xwnt8* mają właściwości wentralizujące. *Veg-T* wstrzyknięte do blastomerów wentralnych przed MBT powoduje powstanie z nich niepełnej osi wtórnej zarodka. Może zmieniać właściwości powierzchniowe komórek ektodermy. Ekspresja *Veg-T* w różnych rejonach zarodka powoduje powstawanie innych typów komórek, zależnie od ich początkowej kompetencji [51]. Różne stężenia *Veg-T* mogą powodować albo aktywację, albo represję tego samego genu.

Białko *Xombi* jest, jak się wydaje, kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym odgrywającym rolę w rozpoczęciu ruchów morfogenetycznych na początku gastrulacji. Białko to znajduje się w nie zapłodnionym jaju, a w czasie bruzdkowania zlokalizowane jest w jądrach blastomerów wegetatywnych. Nie wiadomo jednak, jaką rolę pełni ono w tym okresie rozwoju zarodka. Można przypuszczać, że *in vivo* wpływa na „ogólne” zaprogramowanie mezodermy, *in vitro* bowiem w izolowanych komórkach presumptywnej ektodermy powoduje (w wysokim stężeniu) ekspresję charakterystycznych genów mezodermalnych: *Xbra*, *Xwnt8* i *gsc* [31]. Lustig i wsp. [31] nie wykluczają, że *Xombi* może odgrywać rolę także w rozwoju endodermy. Zygotyczna ekspresja *Xombi* rozpoczyna się po MTB w grzbietowej strefie brzeżnej. Przed rozpoczęciem ruchów gastrulacyjnych *Xombi* wykrywa się w obszarze całej przyszej wargi prąży z wyjątkiem pasma komórek przeznaczonych na wytworzenie prajelita wywędrowujących najbardziej powierzchniowo. Później *Xombi* w strunie grzbietowej zanika. O roli *Xombi* w tworzeniu się wargi prąży świadczy fakt, że wokół miejsca wstrzyknięcia mRNA *Xombi* wpuklają

się komórki, co jest poprzedzone takimi samymi zmianami morfologicznymi w komórkach wargi grzbietowej (jak gromadzenie się pigmentu w apikalnej części komórek, tworzenie się komórek butelkowych). Ekspresja *Xombi* jest aktywowana w AC przez czynniki sekrecyjne indukujące mezodermę: aktywinę i FGF oraz przez czynnik transkrypcyjny *Xbra*. Przy czym obecność FGF nie jest konieczna dla rozpoczęcia tej ekspresji, lecz jest niezbędna dla jej kontynuacji w środkowej i późnej gastruli [31]. Ekspresja *Xombi* w strefie brzeżnej w dalszym rozwoju zarodka pokrywa się z lokalizacją *Xbra* z tą różnicą, że *Xbra* nie zanika ze struny grzbietowej. Lustig i wsp. [31] sugerują, że te dwa białka mogą tworzyć pozytywnie regulującą się pętlę.

Czynniki transkrypcyjne z rodziny homeobox: *Gsc*, *Vox*, *Xnot*, *Xwent-1* (tab. 1) są syntetyzowane w blastuli i odgrywają rolę w tworzeniu mezodermy.

Gen *gsc* ulega ekspresji w późnej blastuli w rejonie mezodermy grzbietowej (najsilniej w organizatorze Spemanna) i odgrywa rolę w przebiegu gastrulacji. *Gsc* mRNA jest obecny w jądrach komórkowych, wykrywa się go w strefie brzeżnej w gradiencie malejącym wzdłuż osi grzbietowo-brzuszej z maksimum w części grzbietowej. Takie rozmieszczenie pokrywa się z lokalizacją i gradientem stężenia aktywiny. Ekspresja *gsc* jest aktywowana przez aktywinę [16, 43]. Wykazano również, że gradient *Gsc* w strefie brzeżnej blastuli może być regulowany przez stopień aktywności cyklu transdukcyjnego fosfotydylo inozytolowego (PI), przy czym zwiększona aktywność cyklu obniża ekspresję *gsc* [1]. *Gsc* wraz z aktywiną zależnie od stężenia wpływają na los komórek mezodermalnych i w ten sposób modelują mezodermę. Ekspresja *gsc* w izolowanej półkuli wegetatywnej prowadzi do wytworzenia niepełnej wtórnej osi zarodka [8, 49]. Jednak jako czynnik transkrypcyjny jądrowy, sam nie może uruchomić indukcji, musi być wspomagany przez czynnik sekrecyjny.

Vox znajduje się w niezaplodnionym jaju i wczesnej blastuli w niewielkiej ilości. Zygocytyny pojawiają się w blastuli w całym zarodku, a na początku gastrulacji jest eliminowany z przyszłej struny grzbietowej i płytki nerwowej. Ekspresja *Vox* wyprzedza nieco ekspresję *Bmp-4* i w czasie gastrulacji pokrywają się one. *Vox* podobnie jak *BMP-4* powoduje wentralizację AC, a nadekspresja jego genu w zarodku całkowitą jego wentralizację. Dokładniejsza analiza wykazała, że wentralizacja jest wynikiem zablokowania genów *gsc*, *Xnot-2*, *chordyny* z równoczesną stymulacją *Bmp-4* i *MyoD* na grzbietowej stronie zarodka [41]. Schmidt i wsp. [41] przyjmują, że *BMP-4* i *Vox* nawzajem się regulują tworząc pętlę, która jest niezbędna dla stabilizacji rejonu brzuszego zarodka. Zdolność produktów niektórych genów do indukowania niekompletnej wtórnej osi zarodka może być spowodowana blokowaniem powstawania tej pętli regulacyjnej.

Geny *Xwent* ulegają pozycygotycznej transkrypcji w mezodermie brzusznej po MBT. Aktywacja tych genów podobnie jak genu *XMyf-5** w częściach lateralnych

**XMyf-5* jest markerem różnicujących się mięśni.

trefy brzeżnej zależna jest od aktywności BMP-4. Lokalizacja ekspresji *Xwent-1* i *Xwent-2* pokrywa się z tym, że obszar ekspresji *Xwent-2* rozciąga się dalej w kierunku grzbietowym. Obszar ekspresji *XMyf-5* rozdziela komórki z aktywnymi genami *Xwent* od komórek z aktywnym genami *noggin* (rys. 10). W eksperymencie *Xwent* powoduje też wentralizację zarodka [9].

HNF-4 (tab. 1) jest syntetyzowany we wczesnej blastuli jako jedno z pierwszych białek pozygotycznych i jest lokalizowany w jądrach komórkowych. Ilość jego nie zmienia się w ciągu dalszego rozwoju zarodka. Inny natomiast czynnik z tej samej rodziny – HNF-1 α pojawia się w mezodermie wczesnej gastruli. Obydwa te czynniki są ze sobą funkcjonalnie powiązane [47]. Ekspresja *HNF1 α* w AC jest stymulowana przez aktywinę. Stąd można uważać, że aktywina za pośrednictwem HNF indukuje mezoderme i endoderme.

Na dalsze różnicowanie się zaindukowanej mezodermy wpływa *Xmsz-1* (tab. 1). Ekspresja tego genu zachodzi w strefie brzeżnej oraz w brzusznych i bocznych obszarach półkuli animalnej, W AC jest on aktywowany przez BMP-4. Samo białko *Xmsz-1* nie ma zdolności indukowania mezodermy w AC, wentralizuje natomiast częściowo mezoderme grzbietową, ale nie prowadzi do wytworzenia w niej komórek krwi. Prawdopodobnie jest on potrzebny dla wczesnej fazy różnicowania się komórek mezodermalnych w prekursorzy mioblastów [32].

W czasie indukcji mezodermy, a następnie w trakcie jej przemieszczania się w czasie gastrulacji, oprócz zmian kształtów komórek zmienia się lokalnie wzajemna adhezja komórek i do fibronektyny. Fibronektyna występuje w zarodkach *Xenopus* w dachu blastocelu, a następnie między przemieszczającymi się warstwami komórek. Jest ona niezbędna dla ruchów morfogenetycznych. Ramos i wsp. [37] zwrócili uwagę na zmianę aktywności integryn w tych procesach. Czynniki indukujące mają wpływać na istniejące już receptory, integryny $\alpha 5$ i $\beta 1$, aktywując je lub inhibując.

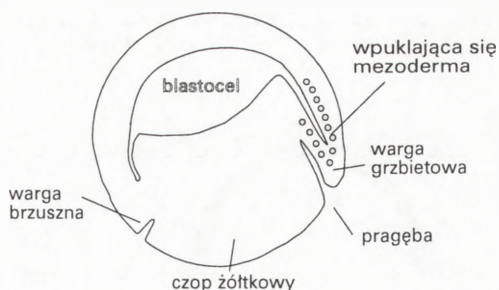
Wyniki przedstawionych wyżej badań wskazują, że w zarodku *Xenopus* mezoderma grzbietowa jest indukowana przez czynniki z rodziny TGF β , natomiast brzuszna przez BMP i FGF. Równocześnie czynniki transkrypcyjne z rodziny T-box i rodziny *homeobox* modyfikują już zaindukowaną mezoderme, ukierunkowując ją na odpowiednią drogę rozwoju.

6. ORGANIZATOR SPEMANNA

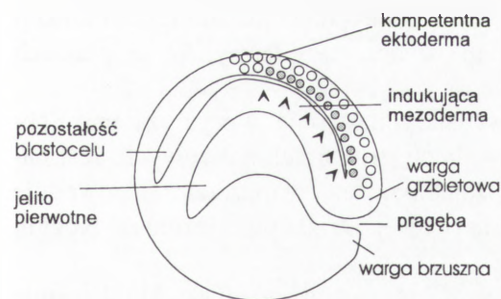
Od czasu odkrycia Spemanna i Mangold [4,18] organizator Spemanna jest określany jako zespół komórek w grzbietowej części blastuli, która indukuje drugą oś zarodka, jeżeli zostanie wszczepiona do zarodka w stadium wczesnej gastruli. Jest to dynamicznie zmieniająca się struktura, która reguluje procesy rozwojowe oraz tworzy struktury osiowe. Funkcja organizatora Spemanna polega na indukcji

systemu nerwowego, dorsalizacji mezodermy w bocznej strefie brzeżnej, rozpoczęciu i wykonywaniu ruchów morfogenetycznych i samoróżnicowaniu się w strunę grzbietową, przedstrunową mezoderme i endoderme gardzieli (rys. 7 i 8).

Organizator Spemanna w warunkach normalnych jest determinowany przez koordynację sygnałów mezodermalnych i sygnałów dorsalizujących wysyłanych przez centrum Nieuwoopa. Według Lane i Kelly [26] tworzy się on w dwóch etapach. W pierwszym blastomery centrum Nieuwoopa indukują leżące nad nimi komórki strefy brzeżnej do wytworzenia organizatora późnej blastuli (*late blastula organizer*) (rys. 9). Jest on zlokalizowany w wegetatywnej połowie zarodka, obejmuje prospektywną mezoderme głowy, część materiału na strunę grzbietową i somity w głębokiej warstwie, a w warstwie powierzchniowej prospektywną endoderme gardzieli. W drugim etapie organizator późnej blastuli indukuje w leżących nad nim komórkach półkuli animalnej organizator gastruli (*gastrula organizer*), który następnie różnicuje się w strunę grzbietową i dorsalizuje boczne części strefy brzeżnej. Na granicy między tymi dwoma częściami organizatora



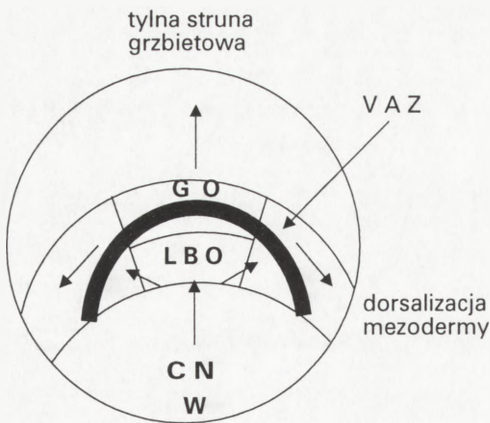
RYSUNEK 7. Schemat początku gastrulacji zarodka *Xenopus*.



RYSUNEK 8. Schemat gastruli zarodka *Xenopus*: główki strzałek wskazują kierunek sygnałów indukujących wysyłanych ze struny grzbietowej w kierunku ektodermy

Spemanna uwidacznia się pasmo komórek w formie półksiężycowatego łuku, nazwane przez tych autorów wegetatywną strefą uporządkowania (*vegetal alignment zone*), w której komórki wydłużają się wzdłuż przyszłej osi A-P. Strefa ta, według nich, ma być niezbędna dla zorganizowania struny grzbietowej i somitów oraz dla wykonania ruchów zbieżno-rozciągających. Być może jest to najważniejszy składnik organizatora Spemanna lub właściwy organizator.

W organizatorze Spemanna wykryto obecność czynników sekrecyjnych: chordyny, follistatyny, HNF, Noggin, Xnr3 oraz czynników transkrypcyjnych:



RYSUNEK 9. Schemat gastruli zarodka *Xenopus*: widok od strony grzbietowej, podział organizatora Spemanna według koncepcji Lane i Kelly [26]; GO – organizator gastruli, LBO – organizator późnej blastuli, VAZ – wegetatywna strefa uporządkowania, CN – centrum Nieuwkoopa, W – część wegetatywna zarodka, strzałki wskazują kierunek działania induktorów

Gsc, Pintallavis, Xbra, XIPOU (tab. 1) [3, 14, 16, 26]. Niektóre czynniki transkrypcyjne (Xnot, Gsc, Zanf-1, Xotx-2) są aktywowane w MBT, a następnie ulegają one ekspresji w wardze grzbietowej prągnięby [49]. Współdziałanie wymienionych, a prawdopodobnie i innych czynników określa działanie organizatora Spemanna. Pojawienie się transkryptów Noggin, chordyny, Gsc oraz Xnr3 w organizatorze jest stymulowane przez Siamois, natomiast obecność Siamois jest konieczna, lecz niewystarczająca dla aktywacji *Xlim1* i *Xbra*. Prawdopodobnie inne czynniki współpracują przy aktywacji tych genów [11]. Follistatyna, chordyna i Noggin mają działanie neuralizujące, mogą ponad to dorsalizować mezoderme brzuszną. Białka te wiążą się bezpośrednio z BMP-4, przez co blokują działanie tego czynnika [49 i inni].

Noggin jest białkiem sekrecyjnym, które zdolne jest przywrócić oś D-V zarodkowi z centrum Nieuwkoopa uprzednio zniszczonym przez promienie UV. Matczyny Noggin jest równomiernie rozmieszczony w jaju i w bruzdkującym zarodku. Zygotyczne transkrypty pojawiają się w wardze grzbietowej prągnięby, a następnie w strunie grzbietowej [21]. Noggin indukuje ogólnie neuroektoderme i głowowe części cewy nerwowej. W warunkach eksperymentalnych nie ma zdolności indukcji mezodermy, jednak działa jako modyfikator wzoru mezodermy. W eksplantach dorsalizuje mezoderme brzuszną [3, 21].

Follistatyna* (tab. 1) wykrywana jest w jaju, a następnie w organizatorze Spemanna, później w strunie grzbietowej i przednich strukturach nerwowych. Jest naturalnym inhibitorem aktywiny, stąd w AC zaindukowanej w mezoderme powoduje aktywację genów markerowych dla tkanki nerwowej. Działa niezależnie od Noggin [3,21].

Chordyna (tab. 1) jest aktywowana w czasie gastrulacji przez Gsc. Ma działanie dorsalizujące, wiąże się bezpośrednio z BMP-4, przez co blokuje jego działanie. Wstrzyknięta do 16-blastomerowego zarodka powoduje powstanie drugiej osi AP zarodka [49 ii].

*Follistatyna – białko działające hamująco na wydzielanie FSH z przysadki kręgowców.

Xnr 3 (tab. 1) jest genem specyficznym dla *Xenopus*, jak dotąd nie znaleziono go u innych kręgowców [39]. Ulega ekspresji wyłącznie w zewnętrznej warstwie komórek organizatora Spemanna. Warstwa ta przeznaczona jest na wytworzenie ektodermy, a warstwa głębsza na wytworzenie mezodermy. Zewnętrzna warstwa ma inną zdolność indukcyjną niż głęboka, jest ona organizatorem ruchu zbieżno-wydłużającego, w czym może odgrywać rolę *Xnr 3*. W AC *Xnr 3* indukuje ekspresję markerów nerwowych i nie ma zdolności indukcji mezodermalnej. Mechanizm działania *Xnr 3* w indukcji nerwowej jest podobny jak *Noggin*, *follistatyny* i *chordyny*. *Xnr 3* i *BMP-4* działają antagonistycznie nawzajem się blokując. *Xnr 3* może także częściowo blokować indukcję mezodermy przez aktywinę, czym różni się od *Noggin* i *chordyny* [14]. *Xnr 4* ulega ekspresji w głębokich warstwach organizatora, w strunie grzbietowej i cewie nerwowej, prawdopodobnie uczestniczy w formowaniu układu nerwowego [17].

Czynniki transkrypcyjne ulegające ekspresji w warunkach eksperymentalnych podobnie jak czynniki sekrecyjne mogą naśladować działanie organizatora. *Gsc*, *Xanf-1* i *Xnot* indukują niepełną wtórną oś zarodka, a *Siamois* kompletną [49].

Ekspresję *gsc* w organizatorze Spemanna indukuje *Siamois*. Jest ona szczególnie wyraźna w komórkach, które przemieszczają się w czasie gastrulacji i stanowią zawiązek mezodermy przedstrunowej i przedniej endodermy. Ekspresja ta zachowuje się w nich po zakończonej gastrulacji [11]. *Gsc* stymuluje prawdopodobnie ruchy zbieżno-wydłużające tych komórek, bowiem komórki blastuli nastrzykane *Gsc* wykonują takie ruchy [3].

Ważną rolę w gastrulacji odgrywa czynnik transkrypcyjny *XIPOU-2* (tab. 1). Gen kodujący ten czynnik jest aktywowany w MBT i ulega ekspresji wyłącznie w grzbietowej strefie brzeżnej i organizatorze Spemanna. Jego genem docelowym jest *gsc*. *XIPOU-2* wiąże się z dwoma elementami promotora (proksymalnym i dystalnym) i zawieszają ekspresję *Gsc* wywołaną przez aktywinę. Być może ma on również właściwość wiązania się z promotorami innych genów ulegających ekspresji w mezodermie grzbietowej i brzusznej. Ponadto hamuje ekspresję *noggin*, *chordyny* oraz *Xlim* i *Xotx2*, przez co aktywuje *BMP* w organizatorze. Nadekspresja *XIPOU-2* jednak nie eliminuje funkcji organizatora Spemanna, a brak tej ekspresji zaburza jedynie powstawanie pochodnych części cewy nerwowej do przodu od pęcherzyka ocznego. *XIPOU* mRNA wstrzyknięte do komórek zarodka nie zmienia rozwoju mezodermy, neuralizuje ektodermę [49]. Witta i Sato [49] uważają, że *XIPOU-2* ma działanie wentralizujące, ale paradoksalnie działa neuralizująco hamując w organizatorze Spemanna aktywność *BMP* (*BMP4* lub *BMP7*). Sam *XIPOU-2* nie indukuje tkanki nerwowej jedynie powoduje neuralizację ektodermy. Endogenny *XIPOU-2* obniża w zarodku selektywnie na poziomie transkrypcji ogólną sygnalizację mezodermalną lub dorsalizację spowodowaną przez szlak *WNT* oraz może regulować wpływ organizatora na części głowowe przez supresję genów *gsc*, *Xlim* po ich uprzedniej ekspresji w MBT.

Działanie organizatora Spemanna jest wynikiem skomplikowanego współdziałania aktywowującego i hamującego aktywność czynników sekrecyjnych i transkrypcyjnych.

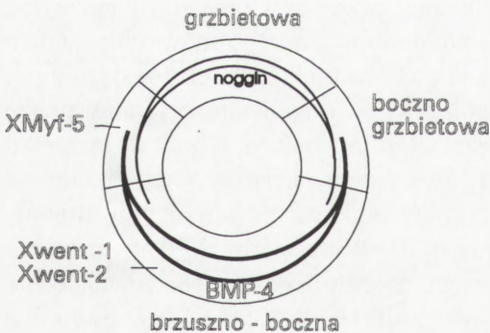
7. INDUKCJA NERWOWA

Półkula animalna zarodka płaza w stadium późnej blastuli obejmuje ektodermę brzuszną i grzbietową (rys. 5). Losy ich są odmienne, brzuszną przekształca się w naskórek i jego pochodne, grzbietową w neuroektodermę dającą początek systemowi nerwowemu. Indukcja nerwowa ektodermi grzbietowej zarodka płazów zachodzi w czasie wpuklania się chordomezodermi z powierzchni zarodka przez wargę grzbietową pod ektodermę. Przemieszczanie się chordomezodermi wiąże się z ruchami zbieżno-wydłużającymi jej komórek. Pierwsza koncepcja indukcji nerwowej wysunięta przez Spemanna i Mangold zakładała wysyłanie sygnałów indukcyjnych z chordomezodermi pionowo do leżącej nad nią ektodermi. Poszczególne odcinki przyszłej struny grzbietowej wysyłają inne sygnały, czym tłumaczyli oni zróżnicowanie wzdłuż osi A-P struktur powstających z cewy nerwowej. Rozpatrywali także możliwość poziomego rozchodzenia się w ektodermie sygnałów emitowanych z wargi grzbietowej [35]. Zagadnienie sygnałów poziomych i pionowych jest nadal przedmiotem dyskusji. Wyniki wielu badań i obserwacji wskazują, że sygnały neuralizujące rozchodzą się zarówno pionowo, jak i poziomo [21].

Późniejsza koncepcja Nieuwkoop'a przyjmuje dwie fazy indukcji nerwowej. W

pierwszej zachodzi aktywacja, a ektoderma nabywa właściwości tworzenia struktur nerwowych przednich (przodomózgowie). Jest to etap niezbędny ukierunkowujący ektodermę na szlak neuralizacji. W drugiej zachodzi transformacja zaindukowanej już ektodermi w struktury nerwowe o charakterze bardziej tylnym wzdłuż osi A-P pod kontrolą induktora zlokalizowanego w organizatorze Spemanna w gradiencie malejącym ku przodowi [35 i inni].

Aktywacja zachodzi już w blastuli przez wczesne ukierunkowanie ektodermi w dwa obszary: brzuszny presumptywnej ektodermi naskórkowej i grzbietowy neuroektodermi. W tym



RYSUNEK 10. Schemat działania Bmp i Noggin w strefie brzeżnej przedstawionej w przekroju poprzecznym do osi animalno-wegetatywnej zarodka

procesie ważną rolę odrywa BMP. Jak już zaznaczono wyżej, BMP-4 wpływa na różnicowanie się mezodermy i epidermy. Na początku gastrulacji białko to jest eliminowane z okolic grzbietowych organizatora Spemanna i z obszaru przyszłej płytki nerwowej. Aktywność jego jest zahamowana na skutek działania czynników wydzielanych przez organizator Spemanna (Noggin, chordyna i follistatyna). W miejscu, gdzie zostaje zahamowana aktywność BMP-4, ektoderma różnicuje się w neuroektoderme. Nadekspresja *Bmp-4* wygasa sygnały nerwowe i powoduje rozwój epidermy z całej ektodermy. Natomiast zahamowanie działania BMP-4 i BMP-7 prowadzi do wytworzenia tkanki nerwowej w AC [14]. Stąd BMP-4 uważany jest za czynnik indukujący epiderme. W półkuli animalnej podobnie jak w półkuli wegetatywnej efekty działania BMP-4 zależą od jego stężenia. Ilościowe różnice w sygnalizacji BMP-4 prowadzą do jakościowo różnych odpowiedzi komórek ektodermalnych. W gastruli BMP-4 ma wysoką aktywność w presumptywnej epidermie (ektoderma brzuszna), a nie ma jej w presumptywnej neuroektodermie (ektoderma grzbietowa), pośrednie natężenie aktywności obserwuje się na granicy między tymi polami w obszarze, z którego powstanie larwalny gruczoł cementowy. Ilościowe różnice w aktywności BMP-4 można naśladować wstrzykując do zarodka *Smad 1* w różnych stężeniach [48].

BMP-4 w indukcji epidermy jest wspomagane przez białka *Msx* (tab. 1). Ekspresja genów *msx1* i *msx2* we wczesnej gastruli ma taką samą lokalizację jak rozmieszczenie BMP-4. Poziom ekspresji *msx1* od wczesnej gastruli do stadium pączka ogonowego jest stała. Oba białka *Msx* w warunkach eksperymentalnych naśladowują działanie BMP-4, powodując epidermizację AC, a przy nadekspresji powodują wentralizację całego zarodka. Ekspresja *msx1* po rozproszeniu komórek półkuli animalnej zostaje w tych komórkach znacznie obniżona, co można tłumaczyć brakiem stymulacji ze strony BMP-4 lub brakiem bezpośredniego kontaktu komórek z sobą [45].

Do niedawna dyskutowano, co jest stanem wyjściowym dla różnicowania się ektodermy: prospektywna epiderma czy prospektywna neuroektoderma. Większość autorów uważała prospektywną epiderme za stan wyjściowy, gdyż AC hodowana w środowisku neutralnym *in vitro* samoistnie rozwija się w struktury przypominające epiderme. Wyniki badań ostatnich kilku lat wskazują jednak, że podstawowym stanem – stanem wyjściowym dla komórek ektodermy jest „stan nerwowy” – ukierunkowanie neuralne. Wilson i wsp. [48] przeprowadzili szereg doświadczeń z rozproszonymi, a następnie agregowanymi komórkami ektodermalnymi pobranymi z półkuli animalnej z wczesnej gastruli. Istotną rolę w wyniku tych doświadczeń odegrał czas, przez jaki komórki były rozproszone. Po krótkim okresie rozproszenia reagregowane komórki różnicowały się w ektoderme z ekspresją keratyny, po 1–2 godzinach rozproszenia tworzyły gruczoł cementowy, a po 3 godzinach powstawały komórki nerwowe z ekspresją NCAM. Tak więc przedłużona dysocjacja prowadzi do neuralizacji komórek ektodermy. Z obserwacji tych wynika, że komórki ektodermalne, a co najmniej presumptywne epidermalne, zawierają endogenne BMP-4,

które po rozproszeniu komórek zostaje rozcieńczone i obniżone jego stężenie nie pozwala na wytworzenie epidermy. Utrata substancji międzykomórkowej może także powodować taki efekt. Kessler i Melton [21] sądzą, że bliska interakcja komórek w ektodermie brzusznej hamuje w nich rozwój w kierunku nerwowym, a dysocjacja uwalnia ich od tej represji.

Czynnikiem hamującym neuralizację ektodermy jest także aktywina. Kiedy działanie jej zostanie zneutralizowane przez follistatynę, komórki epidermalne mogą się rozwijać w komórki nerwowe [21]. Również eliminacja *Vox* z obszarów przyszłej płytki nerwowej i struny grzbietowej jest warunkiem krytycznym dla wytworzenia struktur osiowych [41].

W sumie rozpoczęcie indukcji neuralnej (aktywacja Nieuwkoop) polega bardziej na hamowaniu działania BMP niż na bezpośrednim oddziaływaniu czynników indukujących.

Zaindukowana neuroektoderma nie jest jeszcze zdolna do wytworzenia pełnego systemu nerwowego. Z izolowanej płytki nerwowej rozwijają się tylko przednie części mózgu. W eksperymentach follistatyna, *Noggin* i *chordyna* indukują przedni typ tkanki nerwowej, co wyraża się pojawieniem się w komórkach markerów specyficznych dla mózgu. Płytkę nerwową dla pełnego zróżnicowania wymaga dalszego ukierunkowania (modulacji) zgodnie z koncepcją Nieuwkoop.

W czasie gastrulacji przemieszczająca się chordomezoderma kontaktuje się z leżącą nad nią neuroektoderma i powoduje drugi etap indukcji, a to wyodrębnianie się presumptywnych obszarów tylnych tzw. posterioryzację. Wpuklanie się mezodermy zaczyna się od przyszłego tylnego końca płytki nerwowej. Sygnały z chordomezodermy rozchodzą się pionowo i poziomo.

Za główny czynnik determinujący części tylne płytki nerwowej uważa się *eFGF*. Wiele obserwacji wskazuje na odmienną rolę tego czynnika w posterioryzacji neuroektodermy niż w indukcji mezodermy i neuralizacji zarodka [14*]. Nadekspresja *eFGF* w gastruli powoduje nadmierny rozwój części tylnych zarodka i zahamowanie rozwoju części przednich. Kulki heparynowo-akryloamidowe nasączone *eFGF* wprowadzone do wargi grzbietowej prągnięcia w czasie gastrulacji powodowały rozwój tylnych struktur nerwowych a brak przodomózgowia, natomiast wprowadzone do wargi brzusznej prągnięcia dawały efekt wentralizujący, przejawiający się powiększeniem jelita tylnego (*proctodeum*) [36]. W rozproszonych komórkach ektodermalnych gastruli *FGF* wywołuje tworzenie się neuronów i melanoforów [29]. Zarówno brak *FGF*, jak i jego receptorów zaburza rozwój centralnego systemu nerwowego, tułowia i ogonowych części zarodka [29]. Przy braku *FGF* komórki nie odpowiadają na działanie *Noggin*, co można wytłumaczyć wpływem *FGF* na kompetencje komórek neuroektodermy [29]. W normalnym rozwoju zarodka kompetencja ektodermy na indukcję nerwową, w tym na działanie *Noggin*, gwałtownie wzrasta na początku gastrulacji i spada w późnej gastruli [23]. Rolę *eFGF* w tworzeniu osi głowowo-ogonowej potwierdzają wyniki badań Pownall i wsp. [36],

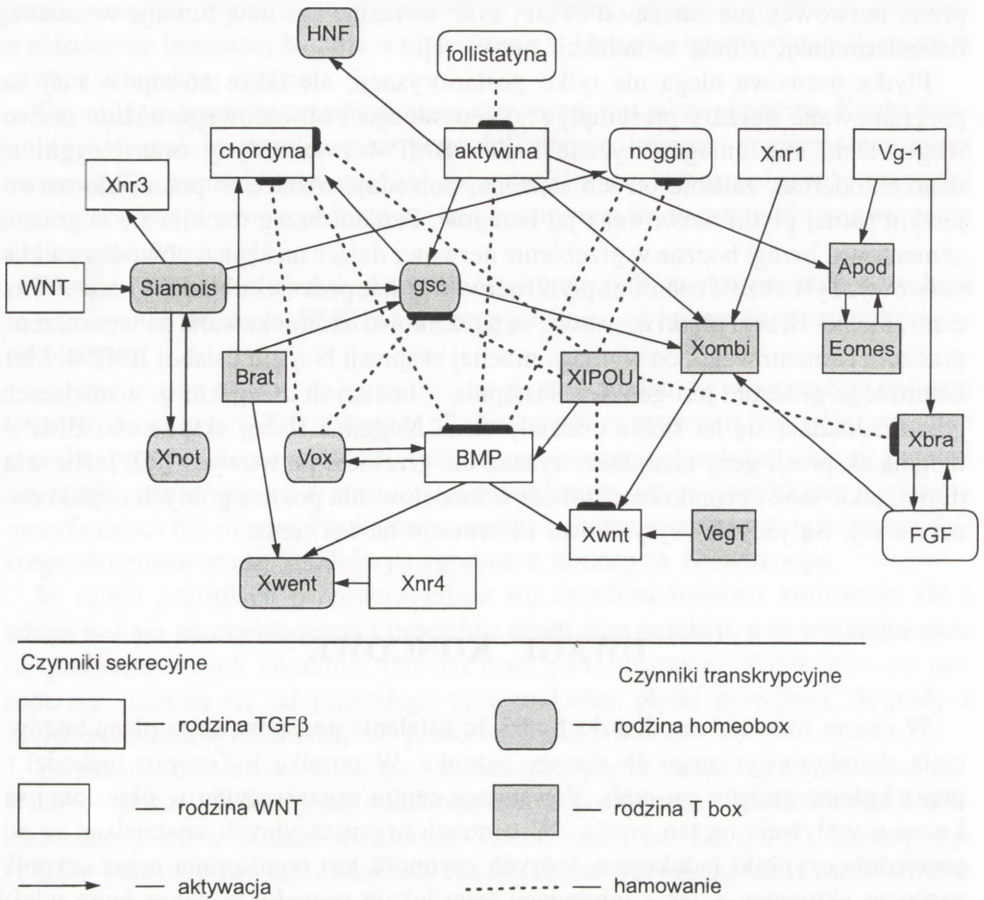
którzy wykazali, że tylne geny *Hox*, odpowiedzialne za segmentację tyłomózgowia, są aktywowane przez eFGF, natomiast geny, które są czynne w przedniej części płytki nerwowej, nie zależą od eFGF. FGF wyraźnie ma inną funkcję w indukcji mezodermalnej, a inną w indukcji nerwowej.

Płytką nerwową ulega nie tylko posterioryzacji, ale także zostają w niej zaprogramowane obszary presumptywne centralnego i obwodowego układu nerwowego. Działanie antagonistyczne białek BMP-4 i chordyny oraz Noggin na neuroektodermę, zależne od ich stężenia, powoduje różnice w potencjale rozwojowym samej płytki nerwowej i jej brzegów. Przedni brzeg rozwija się w gruczoł cementowy, brzegi boczne w grzebienie nerwowe dające następnie obwodowy układ nerwowy. Tylko część centralna płytki nerwowej daje początek układowi nerwowemu centralnemu. Brzegi płytki nerwowej są początkowo ukierunkowane na wytworzenie gruczołu cementowego, co wymaga mocnej ekspresji Noggin i słabej BMP-4. Markerem tego gruczołu jest gen *Xc*. Następnie w bocznych brzegach, tj. w miejscach, gdzie nakładają się na siebie oddziaływania Noggin i słabej aktywności BMP-4, ulegają ekspresji geny charakterystyczne dla grzebieni nerwowych [29*]. Nie wiadomo, jakie inne czynniki biorą udział w modelowaniu poszczególnych części cewy nerwowej. Są jedynie wrywkowe informacje na ten temat.

UWAGI KOŃCOWE

W czasie rozwoju zarodka dochodzi do ustalenia podstawowego planu budowy ciała charakterystycznego dla danego gatunku. W zarodkach *Xenopus* zachodzi to przez kolejne zmiany osi ciała. Powstające centra organizacyjne w określonej sekwencji wpływają na ten proces. W centrach organizacyjnych wydzielane są odpowiednie czynniki indukujące, których czynność jest regulowana przez czynniki zarówno aktywujące, jak i inhibujące transdukcję sygnału, w czym biorą udział czynniki transkrypcyjne oraz odpowiednie receptory. Wyizolowanie nowych czynników indukujących w zarodkach *Xenopus* rozszerzyło znacznie poznanie przebiegu początku różnicowania się komórek i tkanek. Jednak nakładanie się na siebie ich sygnalizacji powoduje trudności w dokładnym określeniu szlaku, na jakim poszczególne z nich działają, a doświadczenia z pojedynczymi czynnikami nie dają pełnego odzwierciedlenia ich rzeczywistej funkcji w zarodku. Mimo tych zastrzeżeń można sformułować kilka wniosków.

1. W procesach indukcji istotna jest interakcja między czynnikami sekrecyjnymi i transkrypcyjnymi. Na rysunku 11 przedstawiono prawdopodobne wzajemne oddziaływanie tych czynników w procesach wczesnych indukcji embrjonalnych u *Xenopus*.



RYSUNEK 11. Próba schematycznego przedstawienia wzajemnego oddziaływania czynników sekrecyjnych i czynników indukcyjnych biorących udział we wczesnych procesach indukcyjnych w zarodku *Xenopus* (nie uwzględniono zależności przestrzennych i czasowych)

- Większość opisanych czynników występuje i działa w zarodku w gradiencie stężenia. Gradient ten nie zależy wyłącznie od dyfuzji i odległości od miejsca wytwarzania, ale także od blokowania przez lokalnie wytwarzane białka.
- W indukcji biorą udział czynniki działające tylko jednorazowo w określonym etapie rozwoju i czynniki aktywowane wielokrotnie, wtedy ten sam czynnik indukujący, jak i transkrypcyjny może odgrywać inną rolę zależnie od czasu i miejsca ekspresji

w zarodku. Nie wiadomo jednak, czy dla różnych funkcji wykorzystuje taki sam szlak transdukcji.

4. We wczesnej indukcji mezodermalnej odgrywają rolę czynniki śródkomórkowe (obok zewnętrznych) pochodzące z informacji matczynej, które zostały przydzielone poszczególnym komórkom w czasie bruzdkowania.
5. Dla prawidłowego przebiegu indukcji ważna jest droga, jaką czynnik zewnętrzny przekazuje sygnał do genu docelowego, którego ekspresja jest efektem końcowym.
6. Nie wykazano do tej pory, na czym polega kompetencja komórek umożliwiająca odpowiedź na działanie induktora. Jest to zapewne wynik współdziałania składników szlaku transdukcji sygnału indukującego.

Ciekawym będzie zbadanie, jaką drogą działają xenoinduktory wykrywane jeszcze przez Spemann i Mangold i następnie wielu innych embriologów [4*], a powodujące powstawanie dodatkowej osi zarodka lub inne zmiany rozwojowe. Wykazanie przez Ault i wsp. [2], że lit, znany jako czynnik dorsalizujący, działa na zarodek przez zahamowanie cyklu transdukcyjnego, a przez to wywołanie nadekspresji *gsc*, może być wskazówką kierunku badań. Wydaje się, że niektóre ksenoinduktory, jak na przykład wątroby ssaków, działają przez czynniki wzrostowe w nich zawarte.

LITERATURA

- [1] ANDREAZZOLI M, PANNESE M., BONCINELLI E. Activating and repressing signals in head development: the role of *Xotx1* and *Xotx2*. *Development* 1997; **124**: 1732–1743.
- [2] AULT KT, DURMOWICZ A, HAGER PL., BUSA WB. Modulation of *Xenopus* embryo mesoderm-specific gene expression and dorsoanterior patterning by receptors that activate the phosphatidylinositol cycle signal transduction pathway. *Development* 1996; **122**: 2033–2044.
- [3] BALLY-CUIF L. Les genes du developpement., Paris, Nathan, 1995.
- [4] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Embriologia, Warszawa, PWRIL 1995:
- [5] LA BONNE C, WHITMAN M. Localization of MAP kinase activity in early *Xenopus* embryos: Implication for endogenous FGF signaling. *Development* 1997; **124**: 9–20.
- [6] CHANG C, WILSON PA, MATHEWS L, HERMANTI-BRIVANLOU A. A *Xenopus* type I activin receptor mediates mesodermal but not neural specification during embryogenesis. *Development* 1997; **124**: 827–837.
- [7] CONLON FL, SEDGWICK SG, WESTON KM, SMITH JC. Inhibition of Xbra transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveal autoregulation of mesoderm patterning in *Xenopus*. *Development* 1996; **122**: 2427–2435.
- [8] DAVID IB, TAIRA M. Axis determination in *Xenopus*; gradient and signals. *Bio Essays* 1994; **16**: 385–386
- [9] DOSCH R, GAWANTKA V, DELIUS H, BLUMENSTOCK C, NIEHRS C. *Bmp-4* acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in *Xenopus*, *Development* 1997; **124**: 2325–2334.
- [10] FAGOTTO F, GUGER K, GUMBINET B. Induction of the primary dorsalizing center in *Xenopus* by the Wnt/ GSK/ β -catenin signaling pathway, but not by Vg1, activin or noggin. *Development* 1997; **124**: 453–460.

- [11] FAN MJ, SOKOL SV. A role for Siamois in Spemann organizer formation. *Development* 1997; **124**: 2581–2589.
- [12] FOLEY AC, STOREY KG, STERN CD. The prechordal region lacks neural inducing ability but can confer anterior character to more posterior neuroepithelium. *Development* 1997; **124**: 2983–2996.
- [13] GRAFF JM. Embryonic patterning: to BMP or not to BMP, that question. *Cell* 1997; **89**: 1171–1174.
- [14] HANSEN CS, MARION CD, STEELE K, GEORGE S, SMITH WC. Direct neural induction and selective inhibition of mesoderm and epidermis inducers by Xnr3. *Development* 1997; **124**: 483–493.
- [15] HORBME, THOMSEN GH. A vegetally localized T-box transcription factor in *Xenopus* eggs specifies mesoderm and endoderm and is essential for embryonic mesoderm. *Development* 1997; **124**: 1689–1698.
- [16] JONES MC, DALE L, HOGAN BLM, WEIGHT CVE, SMITH JC. Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) acts during gastrula stages to cause ventralization of *Xenopus* embryos. *Development* 1996; **122**: 1545–1554.
- [17] JOSEPH E, MELTON DA. Xnr-4; A *Xenopus* nodal-related gene expressed in Spemann organizer. *Develop Biol* 1997; **1164**: 367–372.
- [18] JURA C, KRZANOWSKA H, RZEHAŁ K. Podstawy embriologii zwierząt, Warszawa, PWN, 1983.
- [19] KAGEURA H. Activation of dorsal development by contact between the cortical dorsal determinant and the equatorial core cytoplasm in eggs of *Xenopus laevis*. *Development* 1997; **124**: 1543–1551.
- [20] KENGAKU M, OKAMOTO H. bFGF as a possible morphogen for the anterior-posterior axis of central nervous system in *Xenopus*. *Development* 1996; **122**: 3121–3130.
- [21] KESSLER DS, MELTON DA. Vertebrate embryonic induction mesodermal and neural patterning. *Science* 1994; **266**: 596–604.
- [22] KIKKAWA M, TAKANO K, SHINGAWA A. Location and behavior of dorsal determinants during first cycle in *Xenopus* eggs. *Development* 1996; **122**: 3687–3699.
- [23] KNECHT AK, HARLAND RM. Mechanisms of dorsal-ventral patterning in noggin-induced neural tissue. *Development* 1997; **124**: 2477–2488.
- [24] KOFRON M, SPAGNUOLO A, KLYMKOWSKY M, WYLIE C, HEASMAN J. The roles of the maternal α -catenin and plakoglobin in the early *Xenopus* embryo. *Development* 1997; **124**: 1553–1560.
- [25] LALLIER TE, WHITAKER CA, DE SIMONE DW. Integrin $\alpha 6$ expression is required for early nervous system development in *Xenopus laevis*. *Development* 1995; **122**: 2539–2554.
- [26] LANE MC, KELLER R. Microtubule distribution reveals that Spemann organizer is subdivided into two domains by the vegetal alignment zone. *Development* 1997; **124**: 895–906.
- [27] LARABELL CA, ROWING BA, WELLS J, WU M., GERHARDT JC. Confocal microscopy analysis of living *Xenopus* eggs and the mechanism of cortical rotation. *Development* 1996; **122**: 1281–1284.
- [28] LARABELL CA, TORRES M., ROWING BA, YOST C, MILLER JF, WU M, KIMELMAN D, MOON RT. Establishment of the dorso-ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in β -catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. *J Cell Biol* 1997; **136**: 1123–1136.
- [29] LAUNAY C, FROMENTOUX V, SHI DL, BOUCAUT JC. A truncated FGF receptor blocks neural induction by endogenous *Xenopus* inducer. *Development* 1996; **122**: 869–880.
- [30] LUSTIG KD, KROLL K, SUN E, RAMOS H, ELMENDORF H, KIRSCHNER MW. A *Xenopus* nodal related-gene that acts in synergy with noggin to induce complete secondary axis and notochord formation. *Development* 1996; **122**: 3276–3282.

- [31] LUSTIG KD, KROLL K, SUN E, KIRSCHNER MW. Expression cloning of a *Xenopus* T-related gene (Xombi) involved in mesoderm patterning and blastopore lip formation. *Development* 1996; **122**: 4001–4012.
- [32] MAEDA R, KOBAYASHI A, SEKINE R, LIN JJ, KUNG HF, MAENO M. *Xmsx-1* modifies mesodermal tissue pattern along dorsoventral axis in *Xenopus laevis* embryo. *Development* 1997; **124**: 2553–2560.
- [33] NIEUWKOOP PD, WEIJER CJ. Neural induction, a two way process. *Med Biol* 1978; **56**: 366–371.
- [34] POPPERL H, SCHMIDT C, WILSON V, DODD J, KRUMLAUF R, BEDDINGTON RSP. Misexpression of *Cwnt8C* in the mouse induces an ectopic embryonic axis and causes a truncation of the anterior neuroectoderm. *Development* 1997; **124**: 2987–3007.
- [35] POURQUIE O. Biologie du developpement; la construction du systeme nerveux. Paris, Nathan 1995.
- [36] POWNALL ME, TUCKER AS, SLACK JMW, ISAACS HV. *eFGF*, *Xcad 3* and Hox genes form molecular pathway that establishes the anterior-posterior axis in. *Development* 1996; **122**: 3681–3892.
- [37] RAMOS JW, WHITTAKER CA, De SIMONE DW. Integrin-dependent adhesive activity is spatially controlled by inductive signals at gastrulation. *Development* 1996; **122**: 2873–2883.
- [38] SAKAI M. The vegetal determinants required for the Spemann organizer move equatorially during the first cycle. *Development* 1996; **122**: 2207–2214.
- [39] SAMPATH K, CHENG AMS, FRISCH A, WRIGHT CVE. Functional differences among *Xenopus* nodal-related genes in left-right axis determination. *Development* 1997; **124**: 3293–3302.
- [40] SLACKE JM, ISAACS HV. Presence of basic fibroblast growth factor in early *Xenopus* embryo. *Development* 1989; **105**: 147–153.
- [41] SCHMIDT JE, DASSOW G, KIMELMAN D. Regulation of dorsal-ventral patterning; the ventralizing effects of the novel *Xenopus* homeobox gene *Vox*. *Development* 1996; **122**: 1711–1721.
- [42] SMITH JC. Mesoderm-inducing factors in early vertebrate development. *EMBO J* 1993; **12**: 4633–4370.
- [43] STENNARD F, CARNAC G, GURDONN JB. The *Xenopus* T-box gene, *Antipodean*, encodes a vegetally localised maternal mRNA and can trigger mesoderm formation. *Development* 1996; **122**: 4179–4188.
- [44] SUZUKI A, CHANG C, YINGLING JM, WANG XF, HEMMATI-BRIVANNLOU A. Smad 5 induces ventral fate in *Xenopus* embryo. *Develop Biol* 1997; **184**: 400–405.
- [45] SUZUKI A, UENO NN, HEMMANTI-BRIVANLOU A. *Xenopus msx1* mediates epidermal induction and neural inhibition by BMP-4. *Development* 1997; **124**: 3037–3044.
- [46] TADA M, O REILLY MAJ, SMITH JC. Analysis of competence and Brachyury autoinduction by use hormone-inducible *Xbra*. *Development* 1997; **124**: 2225–2234.
- [47] WEBER H, HOLEWA B, JONES EA, RYFFEL G. Mesoderm and endoderm differentiation in animal cap explants: identification of the HNF4-binding site as an activin A responsive element in the *Xenopus* HNF I promoter. *Development* 1996; **122**: 1975–1984.
- [48] WILSON PA, LAGNA G, SUZUKI A, HEMMATI-BRIVANNLOU A. Concentration-dependent patterning of the *Xenopus* ectoderm by BMP-4 and its signal transducer Smad 1. *Development* 1997; **124**: 3177–3184.
- [49] WITTA SE, SATO SM. *ZIPOU2* is a potential regulator of Spemann's organizer. *Development* 1997; **124**: 1179–1189.
- [50] WYLIE C, KOFRON M, PAYNE C, ANDERSON R, HOSOBUCHI M., JOSEPH E, HEASMAN J. Maternal β -catenin establishes a „dorsal signal” in early *Xenopus* embryo. *Development* 1996; **122**: 2987–2996.

- [51] ZHANG J, KING ML. *Xenopus VegT* RNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-box transcription factor involved in mesodermal patterning. *Development* 1996; **122**: 4119–4129.
- [52] ZHOU Y, KING ML. Localization of *Xcat-2* RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocyte. *Development* 1996; **122**: 2947–2953.

Redaktor prowadzący – S. Biliński.

Otrzymano: 28.11. 1997 r.

Przyjęto: 17.02. 1998 r.

Adres autora: Warszawa, ul. Nowoursynowska 166

BIOLOGIA MOLEKULARNA WIRUSÓW PAPILLOMA*

MOLECULAR BIOLOGY OF PAPILLOMAVIRUSES

Elżbieta POREBA

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Zakład Wirusologii Molekularnej,
UAM, Poznań

Streszczenie: Wirusy *Papilloma* (PV) należące do rodziny *Papoviridae* są to wirusy zwierzęce o genomie w postaci kolistej, dwuniciowej cząsteczki DNA zbudowanej z około 7,9 tpb. W genomie wirusów PV można wyróżnić regiony kodujące E i L oraz dwa regiony niekodujące SNR i URR. Region wczesny E zawiera do 8 ramek odczytu, kodujących białka niezbędne dla wirusowej replikacji oraz transformacji komórek gospodarza. Za właściwości transformujące wirusów *Papilloma* odpowiedzialne są białka kodowane przez ramki odczytu E6 i E7. Region późny L zawiera 2 ramki odczytu ORF L1 i ORF L2, kodujące białka kapsydu wirusów *Papilloma*. Region niekodujący URR pełni funkcje regulatorowe w transkrypcji wirusowych genów. Region SNR prawdopodobnie ma aktywność promotorową, regulowaną przez czynniki białkowe pojawiające się w trakcie różnicowania keratynocytów.

Słowa kluczowe: wirusy *Papilloma*, struktura genomu, transformacja nowotworowa.

Summary: Papillomaviruses (PV) belong to *Papoviridae* family and are animal viruses with a circular double stranded DNA genome of a size of about 7.9 kbp. Clinical, epidemiological and experimental studies have shown their part in pathogenesis of dermal lesions and lesions of mucous membrane of oral cavity, throat and genitals. *Papillomaviruses* have tropism to epiderm and mucosa covered with paraepidermal epithelium. In these cells *Papillomaviruses* may cause proliferative lesions. The genome of PVs consists of coding region E and L as well as two uncoding regions SNR and URR. Early coding region contains up to 8 open reading frames coding for proteins necessary for viral replication and transformation of host cells. Proteins coded by E6 and E7 open reading frames are responsible for transformative features of *Papillomaviruses*. Late coding region L contains 2 open reading frames L1 and L2 coding for structural proteins of *Papillomaviruses* capsid. URR uncoding region functions as transcriptional regulator of viral genes. SNR region probably has a promotor activity regulated by keratinocyte dependent protein factors.

Key words: papillomaviruses, genome structure, transformation.

*Artykuł napisano w ramach grantu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

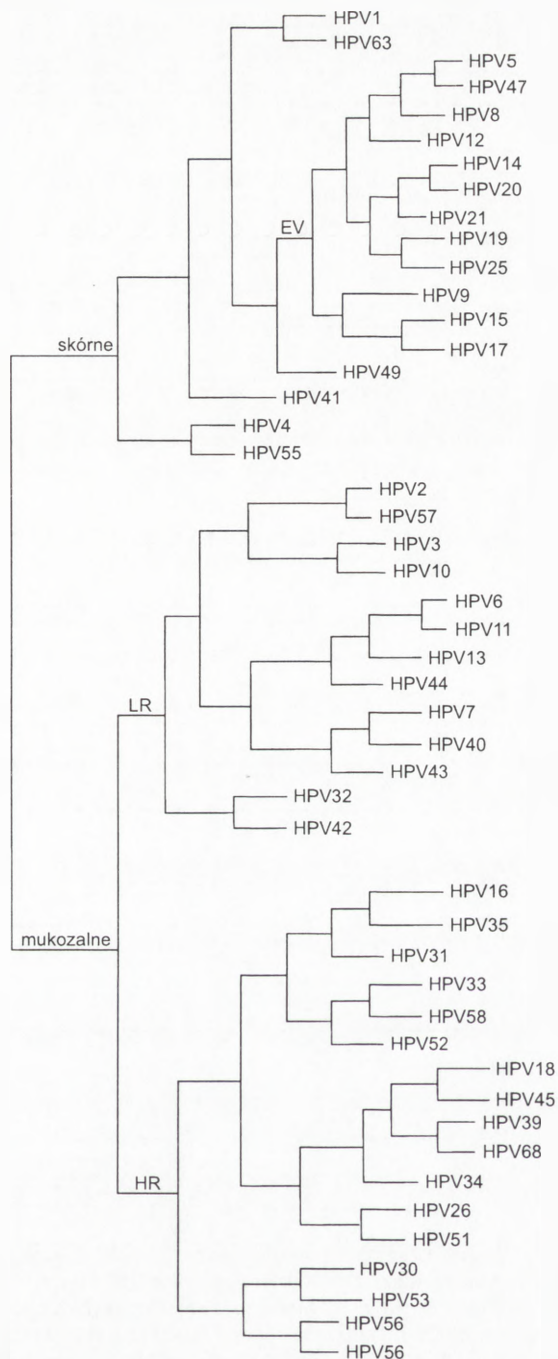
I. WPROWADZENIE

Wirusy *Papilloma*, a w szczególności ludzkie wirusy *Papilloma* (HPV) stanowią w ostatnich latach przedmiot uwagi i badań wielu ośrodków na całym świecie. Liczne badania kliniczne, epidemiologiczne i eksperymentalne wykazały bowiem udział tych wirusów jako jednego z ważnych czynników w patogenezie różnych schorzeń skórnych, błon śluzowych jamy ustnej i gardła oraz narządów płciowych, w tym raka szyjki macicy.

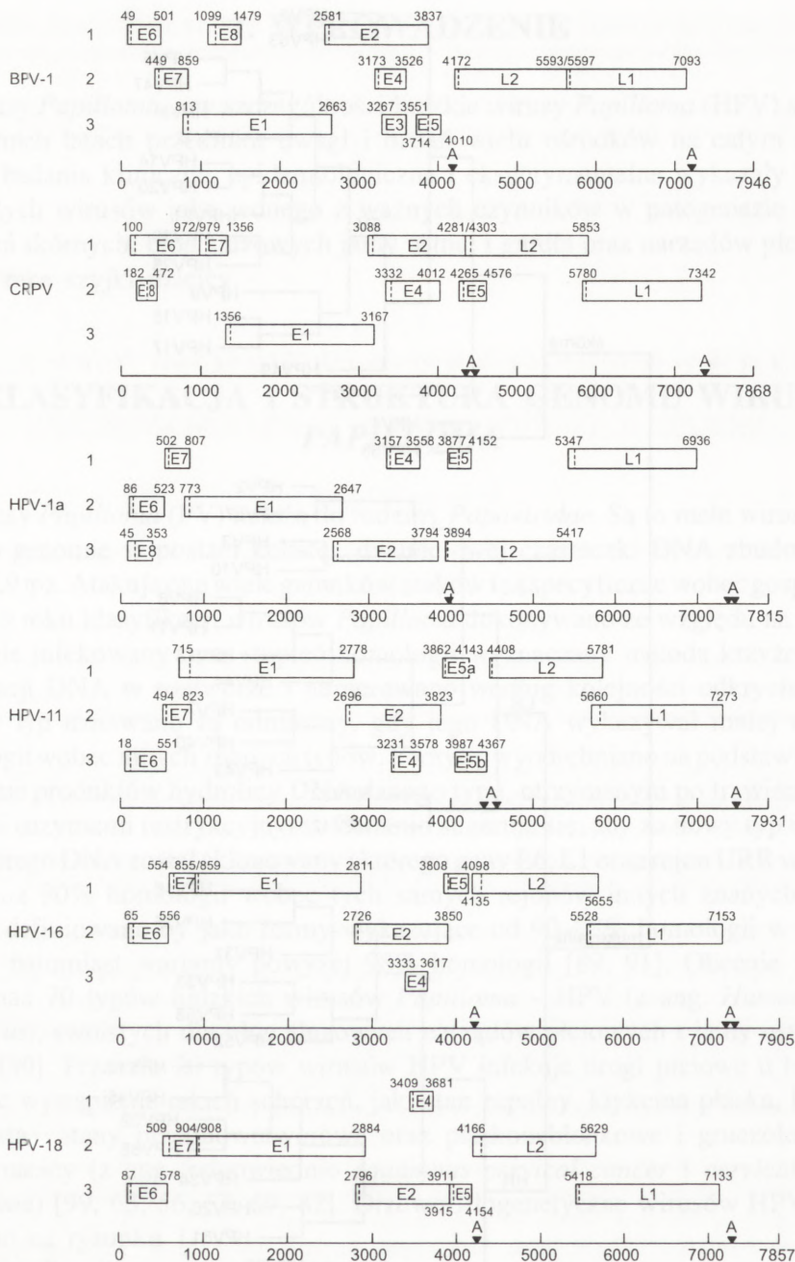
II. KLASYFIKACJA I STRUKTURA GENOMU WIRUSÓW PAPILLOMA

Wirusy *Papilloma* (PV) należą do rodziny *Papoviridae*. Są to małe wirusy zwierzęce o genomie w postaci kolistej, dwuniciowej cząsteczki DNA zbudowanej z około 7,9 tpz. Atakują one wiele gatunków ssaków i są specyficzne wobec gospodarza. Od 1979 roku klasyfikacji wirusów *Papilloma* dokonywano ze względu na gatunek przez nie infekowany oraz stopień homologii wyznaczany metodą krzyżowej hybridyzacji DNA w roztworze i numerowano według kolejności odkrycia. Nowo odkryty typ uznawano za odmienny, gdy jego DNA wykazywał mniej niż 50% homologii wobec innych znanych typów. Podtypy wyodrębniano na podstawie różnic w obrazie produktów hydrolizy DNA danego typu, otrzymanym po trawieniu określonymi enzymami restrykcyjnymi. Ostatnio sugeruje się, aby za nowy typ uznawać taki, którego DNA został sklonowany i którego geny E6, L1 oraz rejon URR wykazują mniej niż 90% homologii wobec tych samych rejonów innych znanych typów. Podtyp definiowano by jako formy wykazujące od 90–98% homologii w tych rejonach, natomiast warianty powyżej 98% homologii [89, 91]. Obecnie znanych jest ponad 70 typów ludzkich wirusów *Papilloma* – HPV (z ang. *Human Papillomavirus*), swoistych dla błon śluzowych narządów płciowych i jamy ustnej oraz skóry [90]. Przeszło 20 typów wirusów HPV infekuje drogi płciowe u ludzi powodując wystąpienie takich schorzeń, jak: stan zapalny, kłykcina płaska, kłykcina kończysta, stany przednowotworowe oraz płaskonabłonkowe i gruczołowe raki szyjki macicy (z ang. odpowiednio *squamous cervical cancer* i *cervical adenocarcinoma*) [99, 63, 56, 57, 69, 82]. Drzewo filogenetyczne wirusów HPV przedstawiono na rysunku 1.

Wirusy *Papilloma* wywołujące łagodne zmiany nienowotworowe nazwano wirusami niskiego ryzyka (z ang. *low-risk viruses*), natomiast związane ze zmianą złośliwą (rakiem) – wirusami wysokiego ryzyka (z ang. *high-risk viruses*). Mimo różnic w sekwencji DNA między różnymi typami wirusów *Papilloma*, organizacja ich genomu jest podobna (rys. 2). W genomie wirusów PV można wyróżnić dwa



RYSUNEK 1. Drzewo filogenetyczne wirusów HPV uzyskane na podstawie homologii fragmentu 384 pz. genu E6 [91]; EV – *epidermodysplasia verruciformis*, LR – typy niskiego ryzyka, HR – typy wysokiego ryzyka



RYSUNIK 2. Organizacja genomu ludzkich wirusów *Papilloma* (HPV) typu: 1a, 11, 16, 18; BPV (*bovine papillomavirus*); CRPV (*cottontail rabbit papillomavirus*) [35]. Genom każdego z wirusów przedstawiono w postaci liniowej, jako 0 przyjęto punkt odpowiadający miejscu restrykcyjnemu HpaI w genomie BPV-1, zlokalizowany w pobliżu ramki odczytu E6. Otwarte ramki odczytu zaznaczono w postaci prostokątów opisanych literami E oraz L, oznaczającymi fragmenty DNA kodujące białka wirusowe wczesne (E) i późne (L). Liniją przerywaną zaznaczono pozycję pierwszego kodonu metioninowego w obrębie każdej ramki. Litera A oznacza miejsce poliadenylacji

regiony kodujące E i L, przedzielone regionem niekodującym, pełniącym funkcje regulatorowe. Wszystkie ramki odczytu wirusów *Papilloma* znajdują się na jednej nici DNA, w przeciwieństwie do innych wirusów należących do rodziny *Papoviridae*, takich jak wirusy polyoma, czy SV40, których wczesne i późne ramki odczytu znajdują się na różnych niciach DNA [35].

III. REGION WCZESNY

Region wczesny E zawiera do 8 ramek odczytu (z ang. ORF – *open reading frame*), kodujących białka niezbędne dla wirusowej replikacji oraz transformacji komórek gospodarza. Do ekspresji tych ramek dochodzi krótko po infekcji komórki, w bazalnej warstwie wielowarstwowego nabłonka. Ramki odczytu E1, E2, E4, E6 i E7 występują we wszystkich znanych dotychczas genomach wirusów *Papilloma*, ramkę E3 wykryto tylko u BPV1 (z ang. *bovine papillomavirus type 1*), natomiast ramki odczytu E5 i E8, występujące u różnych typów wirusów *Papilloma* różnią się między sobą zarówno wielkością, jak i lokalizacją [35].

ORF E1

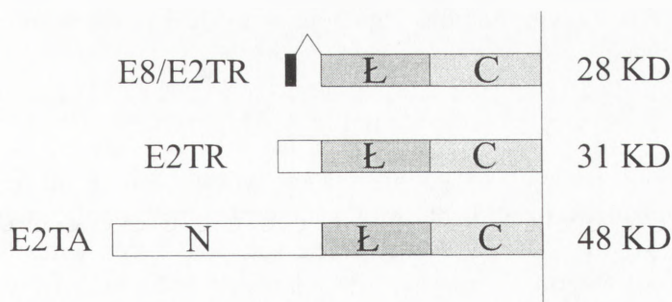
ORF E1 jest największą i bardzo konserwatywną ramką odczytu w genomie wirusów *Papilloma*. Najlepiej poznana jest budowa i funkcja produktu ORF E1 wirusa BPV1. Jest to białko jądrowe o masie cząsteczkowej od 68–72 kD [73, 81, 10], fosforylowane na końcach aminowym i karboksylowym [48, 73, 86]. Sekwencja aminokwasowa zlokalizowana na jego końcu aminowym jest bardziej zmienna niż na końcu karboksylowym i zawiera głównie aminokwasy zasadowe. Konserwatywny rejon na końcu karboksylowym wykazuje homologię z dużym antygenem T SV40, który bierze udział w replikacji DNA wirusa SV40. W regionie homologicznym dla obu białek duży antygen T SV40 zawiera sygnały lokalizacji jądrowej, aminokwasy, których reszty mogą ulegać fosforylacji, moduły wiążące ATP oraz wykazujące aktywność ATP-azową i aktywność helikazy, natomiast białko E1 – miejsce wiązania ATP [73, 81]. Badania prowadzone nad BPV1 wykazały, że ramka E1 koduje białko ważne dla replikacji DNA wirusa i utrzymania wirusowego DNA w formie episomalnej [42]. W warunkach *in vitro* produkt tej ramki odczytu tworzy kompleks z wirusowym białkiem E2TA i wiąże się z DNA wirusowym rozpoczynając jego replikację [87, 88, 95]. W tworzeniu kompleksu pomiędzy białkiem E1 i E2TA biorą udział reszty aminokwasowe z końca karboksylowego białka E1 i końca aminowego E2TA. Przypuszcza się, że tworzenie kompleksu między białkiem E1 a E2TA nadaje białku E1 zdolność specyficznego wiązania się z DNA wirusowym w miejscach zawierających sekwencje ACCGN₄CGGT rozpoznawane

przez białko E2TA [60]. Samo białko E1 może także wiązać się z DNA, lecz bez specyficzności względem sekwencji nukleotydowej [73, 10]. W komórkach myszy transformowanych wirusem BPV1 oprócz produktu E1 o masie 68–72 kD stwierdzono również mniejszy produkt o masie 23 kD, którego funkcja nie jest dokładnie poznana [86].

ORF E2

Otwarta ramka odczytu ORF E2 znajduje się na 3' końcu regionu wczesnego. Początek ORF E2 pokrywa się z ramką E1 (ok. 79–85 pz. wspólnych). Porównanie prawdopodobnych produktów ramek E2 różnych wirusów *Papilloma* wykazało obecność sekwencji konserwatywnych na obu końcach tego białka. Odcinek środkowy jest zmienny i odpowiada pozycji ramki odczytu E4. Najlepiej poznanymi produktami ramki E2 są białka kodowane przez ORF E2 wirusa BPV1. Wykazano, że ORF E2 BPV1 koduje trzy białka jądrowe o masach cząsteczkowych 28, 31 i 48 kD, które są regulatorami transkrypcji. Białko E2 pełnej długości oznaczane jako E2TA reguluje ekspresję wirusowych promotorów przez wiązanie z elementami enhancerowymi zależnymi od E2, tzw. E2RE (z ang. E2 – *responsive enhancer elements*) i pełni funkcję transaktywatora lub represora transkrypcyjnego w zależności od miejsca przyłączenia. Moduł odpowiedzialny za transaktywację transkrypcji przez E2TA znajduje się na aminowym końcu białka, natomiast koniec karboksylowy bierze udział w dimeryzacji cząsteczek białka oraz ich wiązaniu z DNA. Pozostałe dwa produkty ORF E2 to białka E2TR o masie 32 kD oraz E8/E2TR o masie 28 kD powstały przez połączenie fragmentów produktów ramek E2 i E8. Podobnie jak E2TA białka E2TR oraz E8/E2TR mają na końcu karboksylowym moduł odpowiedzialny za dimeryzację cząsteczek i wiązanie z DNA, natomiast koniec aminowy tych białek jest skrócony w porównaniu z E2TA i nie zawiera modułu transaktywującego. Fragmenty sekwencji znajdującej się na końcu karboksylowym białka E2TR oraz E8/E2TR umożliwiają wiązanie obu białek z sekwencjami specyficznymi dla E2TA oraz tworzenie heterodupleksów z E2TA, hamując w ten sposób działanie E2TA. Schemat struktury białek E2 BPV1 przedstawiono na rysunku 3.

W przypadku wirusów HPV atakujących narządy płciowe białko E2 pełnej długości powoduje represję transkrypcji wczesnych ramek odczytu [71, 9, 84]. Do represji transkrypcji dochodzi w wyniku wiązania się białka E2 z dwiema sekwencjami ACCGAAAACGGT, znajdującymi się w pobliżu TATA box promotora i tworzenia przestrzennej bariery w formowaniu kompleksu inicjującego transkrypcję. Wykazano, że białko E2 współzawodniczy z białkami TBP w ich wiązaniu się z promotorem [25]. Prawdopodobnie dochodzić może również do negatywnego oddziaływania białka E2 z białkiem Sp1, którego miejsce wiązania znajduje się



RYSUNEK 3. Schemat struktury białek E2 wirusa BPV1: Produktami E2 ORF wirusa BPV1 są trzy białka o masie 48 kD, 31 kD, 28 kD, pełniące rolę regulatorów w transkrypcji genów wirusowych. W strukturze białka E2 o masie 48 kD wyróżnić można trzy domeny: (1) domenę odpowiedzialną za funkcję transaktywacyjną białka E2, zlokalizowaną w rejonie N końca cząsteczki, oznaczoną na schemacie literą N; (2) domenę biorącą udział w dimeryzacji cząsteczki białka E2, zlokalizowaną w rejonie C końca cząsteczki, oznaczoną na schemacie literą C; (3) domenę łączącą, oznaczoną literą Ł. Odcinek wypełniony czarnym kolorem jest kodowany przez ORF E8

obok miejsca rozpoznawanego przez E2, położonego dalej w kierunku 5' od TATA box [33, 12, 83].

Ostatnio wykazano również, że białko E2 może powodować represję podstawowej aktywności promotora genów późnych P₇₅₃₅ u HPV8 [80]. Wykazano, że w negatywnej regulacji promotora P₇₅₃₅ bierze udział miejsce wiązania E2 o niskim powinowactwie – tzw. sekwencja P2, która jest oddzielona przez jeden nukleotyd od sekwencji TATA P₇₅₃₅. Biochemiczne i genetyczne analizy sugerują, że do represji dochodzi na skutek zastąpienia czynników wiążących się z sekwencją TATA przez białko E2 i oddziaływania E2 z czynnikami komórkowymi aktywującymi promotor, specyficznymi rozpoznającymi sekwencję P2. Sekwencja P2 jest zachowawcza i występuje u kilku typów HPV związanych z powstawaniem *epidermodysplasia verruciformis*, u HPV1, CRPV (z ang. *cottontail rabbit papillomavirus*) i BPV1 w pobliżu promotora genu późnego. Sugeruje to, że wzajemne oddziaływanie E2 i czynników komórkowych w miejscu tej sekwencji może być ważne dla ekspresji białek strukturalnych tych wirusów.

ORF E4

Otwarta ramka odczytu E4 położona jest całkowicie w obrębie ramki E2 i koduje białko, które pojawia się w etapie późnym cyklu rozwojowego wirusa [23, 11]. W komórkach nabłonka (*simple epithelial cells*) infekowanych zrekombinowanym wirusem ospy bydłowej umożliwiającym ekspresję ORF E4 HPV 16, białko E4 wiąże się z pośrednim typem włókienek keratyny i powoduje zapadanie cytoszkieletu keratynowego [24]. Pomimo iż w zainfekowanych komórkach nabłonka białko E4

ulega ekspresji w dużym stopniu, jego rola w cyklu rozwojowym wirusa nadal pozostaje nieznana.

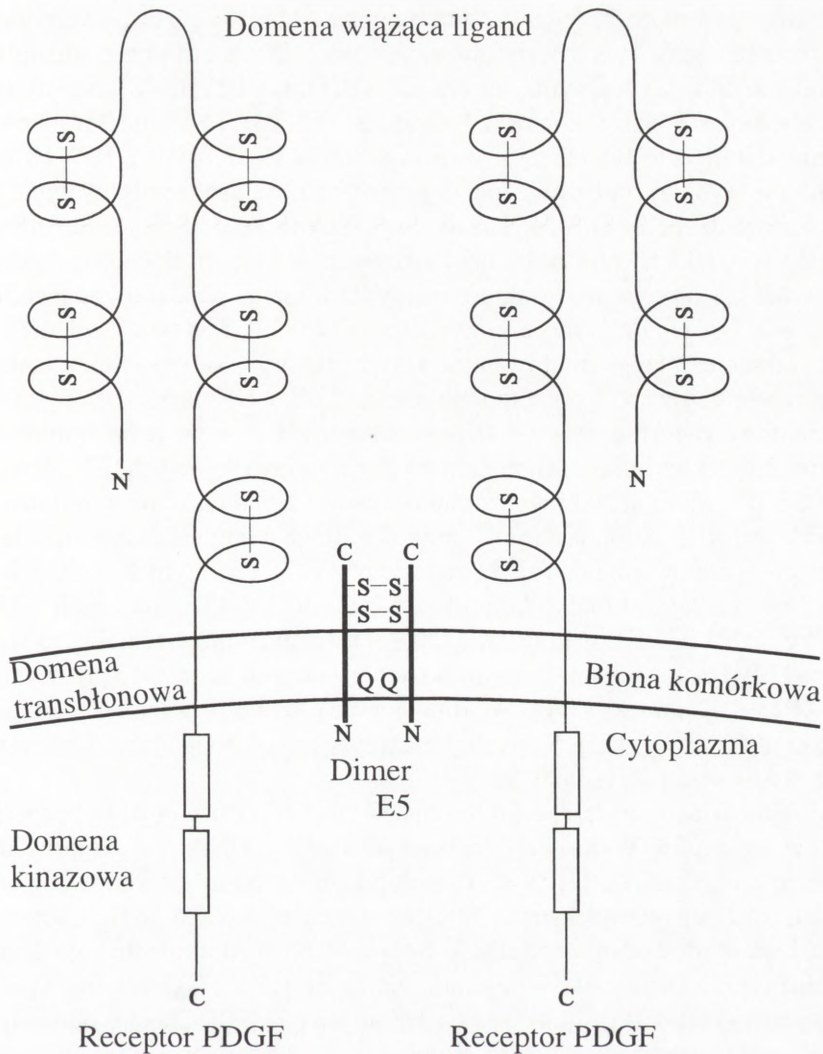
ORF E5

Otwarta ramka odczytu E5 koduje białko hydrofobowe o niskiej masie cząsteczkowej, zlokalizowane głównie w błonach retikulum endoplazmatycznego oraz aparatu Golgiego [4]. Jest ona wysoce konserwatywna wśród wirusów *Papilloma*, które wykazują tropizm do fibroblastów i łatwo transformują fibroblasty mysie w liniach komórkowych. Białko E5 BPV1 może zmieniać działanie błonowych kinaz białkowych, takich jak receptory EGF lub receptory PDGF (rys. 4) [67], przypuszcza się jednak, że z wewnątrzkomórkową lokalizacją tego białka związane są również inne jego funkcje. W przypadku HPV 16 otwarta ramka odczytu E5 może transformować ludzkie keratynocyty [47], jednakże biochemiczny mechanizm działania białka E5 wirusów wykazujących tropizm do nabłonka nie jest znany. Wykazano, że może ono wzmacniać transdukcję sygnału do jądra za pośrednictwem EGF oraz że ma zdolność indukowania aktywności kinazy MAP (z ang. *mitogen-activated protein*) zarówno w obecności, jak i braku EGF, co sugeruje, że białko to może wzmacniać również odpowiedź komórki na drodze kinazy MAP [34].

ORF E6

Otwarta ramka odczytu E6 koduje małe białko występujące w jądrze. Na jego końcu karboksylowym znajdują się dwa moduły o strukturze palców cynkowych, które są niezbędne dla jego stabilności [7]. Białko E6 nie wykazuje podobieństwa strukturalnego do żadnego ze znanych białek komórkowych. Istnieją jednak pewne podobieństwa funkcjonalne między białkiem E6 a białkami onkogennymi kodowanymi przez inne onkogenne wirusy DNA, takie jak adenowirus, czy SV40. Białko E6 wirusów HPV wysokiego ryzyka, podobnie jak E1B adenowirusa i LT SV40, ma zdolność wiązania białka komórkowego p53 [92].

Białko p53 jest produktem genu supresorowego, odgrywającego istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego. Mutacje somatyczne w obrębie tego genu wykryto w kilkunastu najczęściej występujących nowotworach, w tym także w raku szyjki macicy. Mutacje w obrębie genu p53 stwierdzano głównie w komórkach nowotworowych raka szyjki macicy HPV negatywnych, podczas gdy w komórkach nowotworowych HPV pozytywnych wykrywano głównie niezmutowaną formę białka p53. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że inaktywacja białka p53 w wyniku mutacji w obrębie genu i inaktywacja p53 przez białko E6 HPV są procesami wykluczającymi się wzajemnie [18]. Wyniki badań prowadzonych nad identyfikacją mutacji genu p53 w komórkach raka szyjki macicy nie są jednak jednoznaczne.



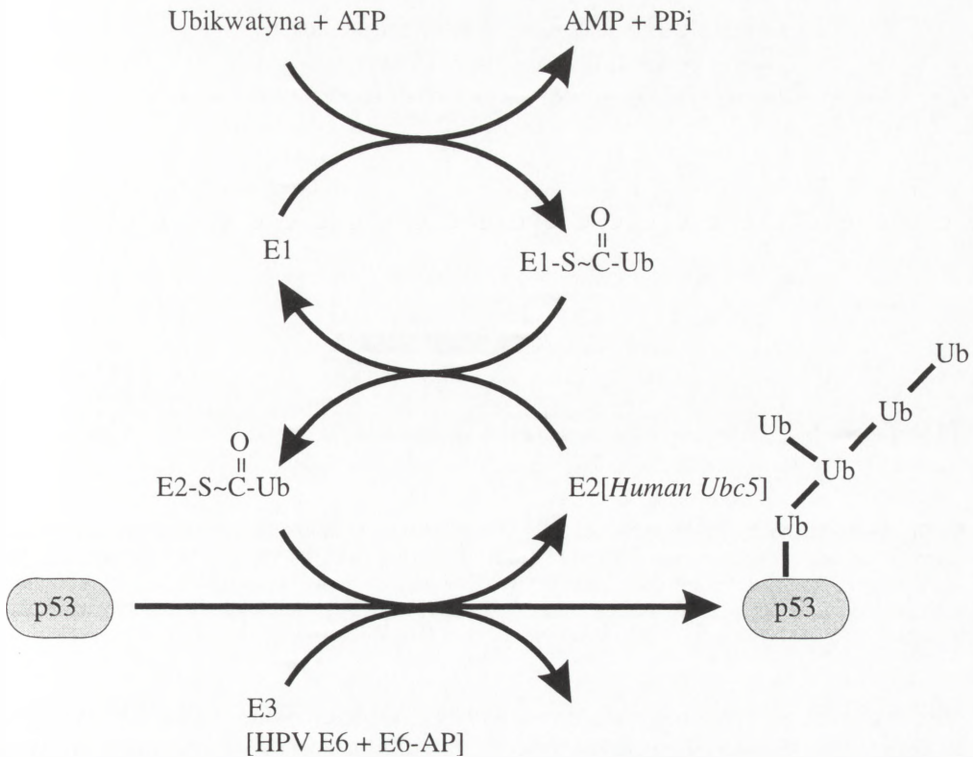
RYSUNEK 4. Schemat przedstawiający oddziaływanie białka E5 i receptora PDGF w komórkach transformowanych [35]: Dimer białka E5, tworzący się przy udziale wiązań dwusiarczkowych oddziałuje z dwoma monomerami receptora PDGF, powodując jego dimeryzację, aktywację i fosforylację tyrozyny

Badania prowadzone w ostatnim czasie nie potwierdzają proponowanej hipotezy [64]. Równoczesne występowanie mutacji w genie p53 i infekcji wirusem HPV w tkance nowotworowej nie wyklucza udziału białka E6 w procesie karcinogenezy, ponieważ wykazano, że mutacje w genie p53 mogą być procesem wtórnym. Doniesienia wykazujące obecność mutacji w genie p53 w komórkach przerzutowych raka szyjki macicy HPV pozytywnego potwierdzają tę możliwość. Niezmutowana

forma białka p53 może aktywować lub hamować ekspresję genów komórkowych przez wiązanie się ze specyficznymi sekwencjami DNA lub przez oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi, takimi jak TBP lub CBF [1, 78], negatywnie regulując w ten sposób wzrost komórki. Podczas gdy białka LTSV40 i E1B adenowirusa powodują stabilizację białka p53, wiązanie białka E6 HPV16 i HPV18 *in vitro* prowadzi do szybkiej proteolitycznej degradacji p53 w drodze ubikwytynacji [74]. Badania prowadzone *in vitro* wykazały również znaczne zmniejszenie stabilności białka p53 w ludzkich komórkach nabłonkowych, w których dochodzi do ekspresji ramki E6 [45]. Białko E6 ma zdolność inaktywacji białka p53, znosząc jego funkcję zarówno w aktywacji, jak i represji transkrypcji [45, 59]. Pod tym względem białko E6 przypomina działanie zmutowanej formy białka p53, która również inaktywuje niezmutowaną formę p53 po oligomeryzacji. Białko E6 może zostać zastąpione przez zmutowaną formę p53 we współdziałaniu z E7 w procesie immortalizacji pierwotnych ludzkich komórek nabłonkowych narządów płciowych [77]. W wiązaniu białka E6 z p53 biorą udział reszty aminokwasowe zlokalizowane w pobliżu końca karboksylowego E6, natomiast reszty aminokwasowe położone w sąsiedztwie końca aminowego są odpowiedzialne za degradację p53 [17]. Poza tym do asocjacji białka E6 z p53 niezbędne jest białko komórkowe o masie 100 kD nazwane E6-AP [38]. W obrębie białka E6-AP znajduje się krótka sekwencja odpowiedzialna za wiązanie białka E6 HPV16 oraz odcinek biorący udział w wiązaniu białka p53 przez kompleks E6/E6-AP [39]. Kompleks E6/E6-AP funkcjonuje jako element szlaku ubikwytynacji (E3 ligaza ubikwytyny) [75]. Schemat obrazujący udział białka E6 w ubikwytynacji p53 przedstawiono na rysunku 5.

Obecnie nie wiadomo jeszcze, które z białek: E6, E6-AP czy obydwa bezpośrednio kontaktują się z p53. Wykazano, że kompleks p53 z DNA jest odporny na ubikwytynację w obecności E6 HPV16. Prawdopodobnie jest to spowodowane brakiem zdolności wiązania kompleksów p53-DNA przez białko E6 [61]. Ostatnio prowadzone badania dowodzą, że zdolność asocjacji z p53 i zdolność do jego degradacji są niezależnymi od siebie aktywnościami białka E6 [17, 85]. Odmienne są również domeny p53 potrzebne do asocjacji z E6 i degradacji p53 [50]. Choć oddziaływanie E6 z p53 jest wystarczające dla zniesienia takich właściwości p53, jak: wiązanie DNA, transaktywacja czy transrepresja transkrypcji [85, 45, 46, 19], pewne funkcje p53 zostają zahamowane jedynie na skutek degradacji tego białka. Wykazano, że do zniesienia indukowanego przez p53 bloku G1, jak również do zahamowania indukowanej przez p53 apoptozy wymagana jest zdolność E6 do degradacji p53 [31].

Stwierdzono również, że białko E6 ma właściwości transformujące niezależne od p53. Przypuszcza się, że aktywność ta jest związana z innymi białkami wiążącymi się z E6. Jednym z takich białek może być białko wiążące wapń ERC-55, które prawdopodobnie jest zlokalizowane w retikulum endoplazmatycznym [14].

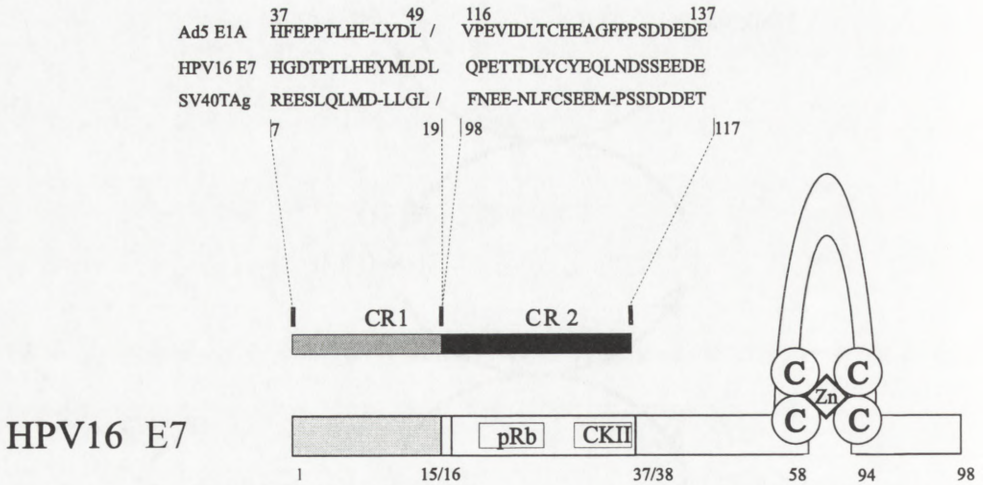


RYSUNEK 5. Ubikwatynacja białka p53 przy udziale białka E6 HPV [35]: Białko E6 HPV wiąże się z komórkowym białkiem E6-AP, tworząc kompleks funkcjonujący jako E3 ligaza-białko-ubikwatyna (z ang. *ubiquitin protein ligase*), który bierze udział w ubikwatynacji białka p53. W ubikwatynacji białka p53 uczestniczą kolejno: E1 enzym aktywujący ubikwatynę (z ang. *ubiquitin activating enzyme*), E2 *Human Ubc5* enzym wiążący ubikwatynę (z ang. *ubiquitin conjugating enzyme*) oraz E3

ORF E7

Produkt ramki E7 jest białkiem jądrowym o niskiej masie cząsteczkowej, zawierającym na swym końcu karboksylowym 1 moduł o strukturze palców cynkowych. Na końcu aminowym tego białka znajduje się odcinek wykazujący podobieństwo sekwencji do regionu konserwatywnego CR1 białka E1A adenowirusa. Dalej w kierunku COOH białka E7 występuje odcinek o wyraźnym podobieństwie sekwencji do drugiego regionu konserwatywnego CR2 białka E1A adenowirusa oraz LT wirusa SV 40. Moduł ten jest odpowiedzialny za liczne funkcjonalne podobieństwa między białkami E7, E1A oraz LT SV 40, odgrywa on bowiem rolę w ich wiązaniu z Rb oraz innymi białkami podobnymi funkcjonalnie i strukturalnie do Rb jak np. p107 [62, 27, 22]. Schemat struktury białka E7 przedstawiono na rysunku 6.

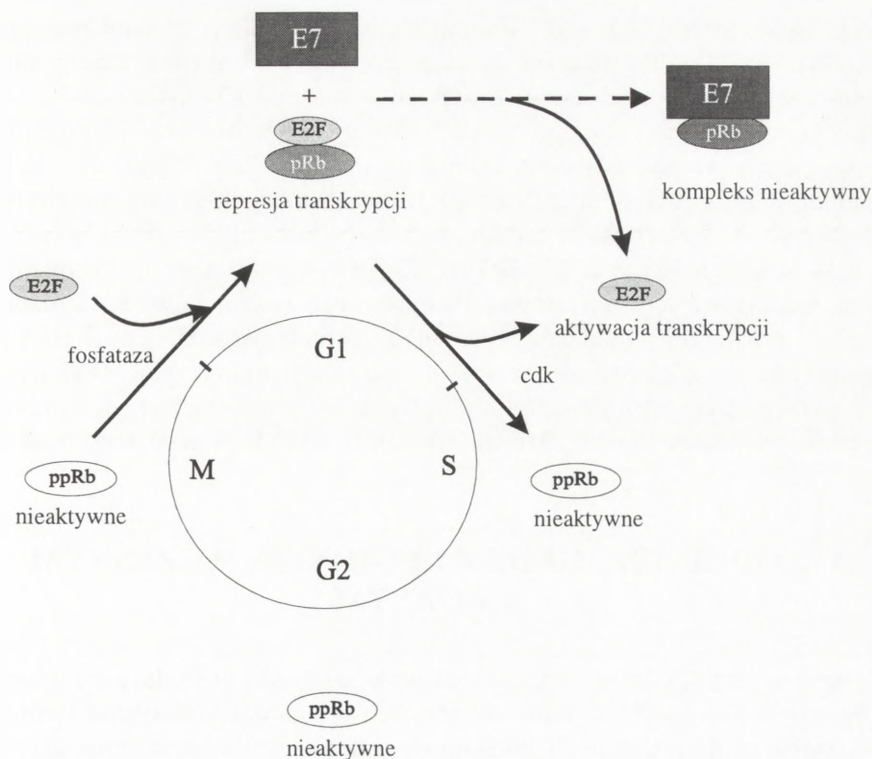
Białko Rb odgrywa ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego. Utrata prawidłowo funkcjonującego białka Rb spowodowana mutacjami w jego genie jest



RYSUNEK 6. Schemat struktury białka E7 [35]: Porównanie homologii aminokwasowej pomiędzy fragmentami regionów konserwatywnych 1 i 2 (CR1, CR2) białka E1A adenowirusa, regionem antygeny T SV40 oraz 38 aminokwasami białka E7 HPV16. Region E7 homologiczny do CR2 E1A adenowirusa jest odpowiedzialny za oddziaływanie białka E7 z Rb, p107 i zawiera aminokwasy fosforylowane przez kinazę kazeinową II (CK II)

obserwowana w różnych typach nowotworów. W fazie G0/G1 białko Rb występuje w komórce w postaci niefosforylowanej i tworzy kompleksy z czynnikiem transkrypcyjnym E2F. Wykazano, że wirusowe białko E7 wiąże się preferencyjnie z niefosforylowaną formą Rb i może niszczyć lub zmieniać kompleksy utworzone przez białka z rodziny Rb z czynnikami transkrypcyjnymi E2F oraz myc [72, 13]. W wyniku ekspresji E7 w komórce zwiększa się stężenie wolnego czynnika transkrypcyjnego E2F, co w rezultacie prowadzi do uruchomienia transkrypcji genów mających promotory zależne od E2F [93] i umożliwia przejście komórki ze stanu spoczynkowego w fazę G1 oraz z fazy G1 w fazę syntezy DNA (rys. 7).

Wiele informacji na temat funkcjonowania białka E7 w cyklu komórkowym dostarczyły badania prowadzone na zmutowanych formach tego białka [22]. Mutacje wprowadzone w rejonie E7 podobnym do E1A i LT znoszą zdolność E7 do wiązania białka Rb lub p107 oraz aktywność transformującą E7 w komórkach gryzoni. Zamiana pojedynczego aminokwasu w tym rejonie prowadzi do powstania formy E7, niezdolnej do wiązania białka Rb, natomiast jej zdolność oddziaływania z p107 pozostaje niezmienną. Taka forma zmutowana E7 traci również właściwości transformujące, co sugeruje, że oddziaływanie E7 z Rb może być bardziej istotne dla aktywności onkogennej E7 niż interakcja z p107. Mutacje wprowadzane w miejscach fosforylacji białka E7 nie wpływają natomiast na zmianę zdolności E7 do współdziałania z aktywowanym onkogenem ras w transformacji komórek gryzoni oraz immortalizacji keratynocytów szyjki macicy [79]. Badania prowadzone na zmutowanych formach



RYSUNEK 7. Wpływ białka E7 HPV na regulację cyklu komórkowego przez pRb [35]: W czasie cyklu komórkowego pRb jest fosforylowany w różnym stopniu. Nieufosforylowana forma białka Rb jest formą aktywną, działającą jako negatywny regulator cyklu komórkowego i obecna jest tylko w czasie faz Go/G1. W czasie przejścia do fazy S białko Rb jest fosforylowane przez kinazy cyklinozależne (cdk), co prowadzi do jego inaktywacji. W czasie faz Go/G1 nieufosforylowana forma białka Rb jest związana z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, na skutek czego E2F nie może aktywować transkrypcji. Fosforylacja białka Rb lub przyłączenie się do niego wirusowego białka onkogenego E7 HPV (lub E1A adenowirusa) prowadzi do uwolnienia z kompleksu E2F, który funkcjonuje jako aktywator transkrypcji genów komórkowych zaangażowanych w syntezę DNA komórkowego i przejście do fazy S cyklu komórkowego

białka E7 HPV16 wykazały również, że zdolność wiązania Rb przez E7 jest istotna, ale niewystarczająca dla aktywności transformującej E7. Niektóre zmutowane białka E7 mające zdolność wiązania Rb mają znacznie obniżoną aktywność transformującą [5, 30]. Fakt ten sugeruje możliwość oddziaływań E7 z innymi białkami. Wykazano, że E7 może asocjować z co najmniej dwoma innymi białkami komórkowymi, takimi jak cyklina A i cdc 2 zależną kinazą, które regulują przejście komórki do fazy cyklu komórkowego S i G2/M. Białko E7 HPV18 może także tworzyć kompleks z cyklina E, która kontroluje przejście G1/S cyklu komórkowego. W procesie tym bierze udział również białko p107. Zarówno kompleks E7/cyklina E, jak i E7/cyklina A wykazują aktywność kinazową przez asocjację z białkiem cdk2, co może przy-

czyniać się do fosforylacji p107. Zdolność oddziaływania E7 z tymi białkami komórkowymi może być dodatkowym mechanizmem prowadzącym do hiperprolifracji komórkowej w komórkach zainfekowanych wirusem HPV [54].

Sugeruje się ponadto, że białko E7 HPV16 może aktywować transkrypcję również w inny sposób niż oddziaływanie z kompleksem pRb-E2F. Wykazano, że białko E7 pełnej długości ma zdolność aktywacji dwóch różnych genów reporterowych, zawierających w swoich promotorach miejsca wiązania dla bakteryjnego represora LexA. W przeciwieństwie do E7 HPV16, E7 HPV11, należącego do grupy niskiego ryzyka, nie ma właściwości aktywacji transkrypcji tych genów. Stwierdzono, że mutacje w rejonie odpowiedzialnym za właściwości transformujące E7 HPV16 nie mają wpływu na zdolność tego białka do aktywacji transkrypcji. Wykazano, że w aktywacji transkrypcji biorą udział aminokwasy znajdujące się na końcu aminowym i częściowo aminokwasy zlokalizowane na końcu karboksylowym tego białka [98].

IV. ODCINEK MIĘDZY REGIONEM WCZESNYM A PÓŻNYM

Pomiędzy ramką odczytu E5 a L2 znajduje się krótki niekodujący region SNR (z ang. *short non-coding region*). W regionie tym występuje sygnał poli(A) dla transkryptów genów wczesnych. Ponadto sugeruje się, że SNR może mieć aktywność promotorową, regulowaną przez czynniki białkowe pojawiające się w trakcie różnicowania keratynocytów [49].

V. REGION PÓŻNY

Region późny L zawiera 2 ramki odczytu ORF L1 i ORF L2, kodujące białka kapsydu wirusów *Papilloma*. Ekspresja tych ramek odczytu zachodzi tylko w całkowicie zróżnicowanych keratynocytach, a jej regulacja jest obecnie słabo poznana. ORF L1 jest najbardziej konserwatywną ramką odczytu wirusów *Papilloma*. Koduje białko kapsydu o średniej masie cząsteczkowej 56 kD [29, 43, 55, 37]. Białko L1 ulega glikozylacji, która jest ważna dla stabilizacji jego struktury [44]. ORF L2 koduje białko kapsydu o masie 76 kD i wykazuje mniejszą zachowawczość u znanych typów wirusów *Papilloma* [21].

VI. ODCINEK MIĘDZY REGIONAMI PÓŻNYM I WCZESNYM

Region zlokalizowany pomiędzy końcem 3' ramki L1 a końcem 5' ramki E6 jest u wirusów *Papilloma* rejonem niekodującym, zwanym rejonem regulatorowym

URR (z ang. *upstream regulatory region*). Region ten zawiera miejsca bogate w AT, kilka promotorów dla polimerazy RNA II, konstytutywne i indukowane enhancery, miejsca wiązania komórkowych czynników transkrypcyjnych, takich jak: NF1, Ap1, Oct1, TEF1, TEF2 [2,3,36] oraz kilka kopii sekwencji palindromowej ACCN₆GGT, będącej miejscem wiązania wirusowego białka E2, pełniącego rolę regulatora transkrypcji.

VII. CYKL ROZWOJOWY WIRUSÓW *PAPILLOMA*

Infekcja wirusowa wymaga zaangażowania czynników zarówno wirusowych, jak i komórkowych. Nie we wszystkich typach komórek może dojść do infekcji oraz namnażania cząstek wirusa. Komórki, które nie podlegają infekcji wirusowej lub nie umożliwiają wirusowi pełnego cyklu rozwojowego, zostały nazwane komórkami niepermissywnymi. W przypadku wirusów PV większość komórek gospodarza jest dla nich niepermissywna. Wirusy *Papilloma* wykazują bowiem szczególne powinowactwo do naskórka i błon śluzowych pokrytych nabłonkiem paraepidermalnym. W warstwie podstawnej nabłonka zainfekowanego obecne są nieliczne kopie genomu wirusowego, zlokalizowane w postaci episomalnej lub zintegrowanej z DNA gospodarza w jądrze komórkowym, ulegając podziałowi jedynie wraz z podziałem komórki. Do pełnego rozwoju wirusa może dochodzić jedynie w komórkach dojrzałej warstwy nabłonka tzw. keratynocytach. Analiza mRNA w różnych warstwach nabłonka za pomocą metody hybrydyzacji *in situ* wykazała obecność transkryptów regionu E we wszystkich warstwach, natomiast transkrypty regionu późnego L, odpowiedzialne za syntezę białek kapsydu, znajdowano jedynie w dojrzałych keratynocytach. W wyniku namnożenia cząsteczek wirusowych w warstwie powierzchniowej nabłonka dochodzi do powstania efektu cytotatycznego, charakteryzującego się pojawieniem tzw. koilocytów – komórek wielko- lub wielojądrzastych. Poznanie pełnego cyklu rozwojowego wirusów *Papilloma* napotyka na trudności spowodowane brakiem odpowiednich hodowli keratynocytów *in vitro*. Bardzo słabo poznane są etapy infekcji komórek przez wirusy *Papilloma* oraz ekspresji ich wczesnych ramek odczytu. Z badań prowadzonych na wirionach i VLP (z ang. *virus-like particles*) wirusa BPV1 oraz VLP HPV16 wynika, że podczas infekcji wirusy te wiążą się z powszechnie obecnym, ewolucyjnie zachowawczym komórkowym receptorem powierzchniowym. VLP HPV16 hamują wiązanie wirionów BPV1 z komórkami C127 i ich transformację, co sugeruje, że wirusy te interreagują z tymi samymi komórkowymi cząsteczkami powierzchniowymi [70]. Badania infekcji linii komórkowych C127 lub CV-1 przez wirusa BPV1 prowadzone przy użyciu mikroskopii elektronowej i immunofluorescencyjnej wykazały, że wiriony BPV1 ulegają adsorbcji na powierzchni komórek już po 1-godzinnej inkubacji w temperaturze 4°C. Większość wirionów była absorbowana przez komórki w czasie 30-minutowej inkubacji w temperaturze 37°C, po czym większość antygenów wi-

rusowych lokalizowano w jądrze komórkowym. Wirusy były transportowane w fagosomach, a proces ten może być hamowany przez cytochalazynę B i taxol, co sugeruje, że w transporcie wirionów mogą brać udział mikrofilamenty i mikrotubule. Białka kapsydu były wykrywane w komórce przez około 14 godzin, po czym ulegały degradacji. Przypuszcza się, że proces rozpadu wirionów zachodzi w cytoplazmie, a białka L1 i L2 migrują do jądra dzięki ich sygnałom lokalizacji jądrowej. Świadczy o tym fakt, że w jądrze komórek zainfekowanych nie stwierdzono całych wirionów, natomiast otrzymano silny sygnał fluorescencyjny pochodzący od białek L1 i L2 [97].

Model replikacji wirusów *Papilloma* został najlepiej opracowany dla wirusa BPV1 [42]. Replikacja wirusów *Papilloma* zachodzi w jądrze komórki zainfekowanej. Białkami niezbędnymi do replikacji wirusa BPV 1 są produkty otwartych ramek odczytu E1 i E2. Ekspresja tych ramek odczytu jest wystarczająca do zapoczątkowania replikacji. Przypuszcza się, że produkty ramek odczytu E5, E6 i E7 biorą udział w podtrzymywaniu replikacji. Z miejscem inicjacji replikacji wiąże się kompleks białek E1 i E2TA, zapoczątkowując replikację. Białko E1 dzięki właściwościom helikazy zależnej od ATP rozplata nici DNA i umożliwia rozpoczęcie replikacji. Proponowanymi w tym modelu poziomami regulacji replikacji są: tworzenie kompleksu pomiędzy białkami E1 i E2TA, zdolność wiązania się tego kompleksu z DNA oraz aktywność białka E1.

Możliwymi czynnikami kontrolującymi tworzenie kompleksu E1-E2TA są:

- stopień ufosforylowania E2TA (białko E1 łączy się tylko z nieufosforylowaną formą E2TA) [48],
- obecność białek E2TR i E8/E2TR w dużym stężeniu (białka te tworzą heterodimery z białkiem E2TA i uniemożliwiają mu wiązanie się z białkiem E1).
- stężenie białek E1 i E2TA (w komórkach transformowanych białka E1 i E2TA występują w niskim stężeniu, zwiększenie stężenia białka E2TA indukuje amplifikację DNA BPV 1).

Kontrola wiązania kompleksu E1-E2TA z DNA odbywać się może przez:

- białka E2TR oraz E8/E2TR (gdy są w dużym stężeniu mogą modulować działanie E1-E2TA przez kompetycyjne wiązanie się z miejscami rozpoznawanymi przez E2TA),
- multimeryczne kompleksy białka E2TA (wykazano, że białko E2TA w postaci takich kompleksów indukuje tworzenie pętli w DNA).

Ostatnio stwierdzono, że w przypadku wirusa BPV1 efektywność replikacji modulowana jest przez dodatkowe sekwencje wirusowe. Dodanie takich sekwencji do konstruktów zawierających tylko minimalny region niezbędny do zapoczątkowania replikacji tzw. ori (z ang. *origin of replication*) powoduje zwiększenie poziomu replikacji DNA. Wśród tych sekwencji zidentyfikowano fragment o długości 69 par zasad, w pozycji 4921–4990 wirusa BPV1, który zawiera co najmniej dwa miejsca wiązania dla białek komórkowych. Jednym z tych białek jest białko CDEBP,

rozpoznające oktamerowy motyw ATCACGTG identyczny jak drożdżowy element CDEI. Zarówno delecje, jak i mutacje w tym regionie wyraźnie obniżają poziom replikacji [66].

Do replikacji DNA wirusów HPV wymagane jest białko E1 i miejsce ori. Białko E2 stymuluje replikację w sposób niezależny od miejsca wiązania. Badania replikacji DNA HPV *in vitro* przy użyciu oczyszczonych białek i częściowo oczyszczonych ekstraktów białkowych wykazały, że replikacja wirusów HPV jest zależna również od czynników komórkowych: białka replikacyjnego A, czynnika replikacyjnego C, antygeny jądrowego proliferacji komórkowej (z ang. *proliferating-cell nuclear antigen*), jak również od frakcji IIA otrzymanej po rozdziale na kolumnie z fosfocelulozą. Frakcja IIA zawiera polimerazę DNA-primazę oraz polimerazę DNA. Obie te polimerazy są istotne dla replikacji DNA HPV16 *in vitro* nie są jednak wystarczające [58].

Proces nowotworzenia rozpoczyna się w warstwie podstawnej nabłonka, gdzie wirusy PV nie przechodzą pełnego cyklu rozwojowego. W komórkach nowotworowych wirusy wysokiego ryzyka występują głównie w postaci zintegrowanej z genomem gospodarza. Istnieją również doniesienia o identyfikacji w niektórych rakach obu form wirusów lub tylko jego form episomalnych [52, 20, 32, 16, 41]. Proces integracji zachodzi głównie przez przerwanie ramek odczytu E1 lub E2 [76]. Niektórzy autorzy podają również możliwość integracji przy udziale innych obszarów za wyjątkiem ramek odczytu E6, E7 oraz URR [28, 15]. Białko E2 bierze udział w regulacji transkrypcji ORF E6 i E7. Przerwanie ramki odczytu E2 w wyniku integracji DNA wirusowego z genomem gospodarza jest ważnym etapem prowadzącym do nadmiernej ekspresji genów kodujących białka onkogenne E6 i E7.

VIII. WŁAŚCIWOŚCI TRANSFORMUJĄCE WIRUSÓW HPV

Większość informacji dotyczących właściwości transformujących wirusów HPV pochodzi z doświadczeń *in vitro*. Wprowadzenie sklonowanego DNA wirusów HPV wysokiego ryzyka (np. HPV16, HPV18) do ustalonych linii komórkowych gryzoni powoduje ich transformację [96, 40]. Wykazano, że za właściwości transformujące tych wirusów odpowiedzialne są białka kodowane przez ramki odczytu E6 i E7 [40, 65] oraz, że aktywność transformująca białka E6 jest mniejsza niż białka E7 [65, 8]. Transformację komórek za pomocą produktów ORF E6 i E7 obserwowano jedynie w przypadku linii komórkowych gryzoni. Transfekcja sklonowanego DNA wirusów HPV wysokiego ryzyka lub ORF E6, E7 do linii komórek ludzkich (np. macierzystych komórek nabłonkowych, ludzkich keratynocytów, fibroblastów etc.) powodowała jedynie ich immortalizację [94, 68, 51, 53]. Aby uzyskać tumoroge-

niczne klony komórkowe komórek ludzkich, potrzebne jest współdziałanie dodatkowych czynników, np. wprowadzenia specyficznych onkogenów. Wykazano, że onkogen H-ras wprowadzony wraz z ramką odczytu E7 indukuje całkowitą transformację kultur fibroblastów i ludzkich komórek nabłonka szyjki macicy. Transformację ludzkich komórek uzyskano dzięki komplementacji ramki E7 także z takimi czynnikami, jak: onkogen c-myc, p53, duży antygen T polyoma, antygen T SV-40 oraz białkiem E1a adenowirusa. Ramka odczytu E6 pozostaje nieaktywna w tych próbach komplementacji [65]. Analogiczne próby komplementacji prowadzone na wirusach niskiego ryzyka wykazały ich niezwykle słabą zdolność transformacji i unieśmiertelniania linii komórkowych [6]. Zlokalizowanie aktywności transformującej wirusów HPV w ramach odczytu E6/E7 zwiększyło zainteresowanie produktami tych ramek oraz ich oddziaływaniem z białkami komórkowymi. Obecnie białka E6 i E7 są najlepiej poznanymi białkami kodowanymi przez wirusy *Papilloma*.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AGOFF SN, HOU J, LINZER DIH, WU B. Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* 1993; **259**: 84–87.
- [2] APT D, CHONG T, LIU Y, BERNARD HU. Nuclear factor 1 and epithelial-cell specific transcription of human papillomavirus type 16. *J Virol* 1993; **67**: 4455–4463.
- [3] APT D, LIU Y, BERNARD HU. Cloning and functional analysis of spliced isoforms of human nuclear factor I-X: interference with transcriptional activation by NFI/CTF in a cell-type specific manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **22**: 3825–3833.
- [4] BANKS L, MATLASHEWSKY G. Cell transformation and the HPV E5 gene. *Papillomavirus Rep* 1993; **4**: 1–4.
- [5] BANKS I, EDMONDS C, VOUSDEN KH. Ability of the HPV 16 E7 protein to bind RB and induce DNA synthesis is not sufficient for efficient transforming activity in NIH 3T3 cells. *Oncogene* 1990; **5**: 1383–1389.
- [6] BARBOSA MS, VASS WC, LOWY DR, SCHILLER JT. *In vitro* biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J Virol* 1991; **65**: 292–298.
- [7] BARBOSA MS, LOWY DR, SCHILLER JT. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* 1989; **63**: 1405–1407.
- [8] BEDELL MA, JONES KH, GROSSMAN SR, LAIMINS LA. Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J Virol* 1987; **63**: 1247–1255.
- [9] BERNARD BA, BAILLY C, LENOIR MC, DARMON M, THIERRY F, YANIV M. The human papillomavirus type 18 (HPV 18) E2 gene product is a repressor of the HPV 18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 1989; **63**: 4317–4324.
- [10] BLITZ IL, LAIMINS LA. The 68-kilodalton E1 protein of bovine papillomavirus is a DNA-binding phosphoprotein which associates with the E2 transcriptional activator *in vitro*. *J Virol* 1991; **65**: 649–656.
- [11] BREITBURD F, CROISSANT O, ORTH G. Expression of human papillomavirus type 1 E4 gene products in warts. *Papillomaviruses: cancer cells* 1987, **5**: 115–122, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

- [12] BUTZ K, HOPPE-SEYLER F. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J Virol* 1993; **67**: 6476–6486.
- [13] CHELLAPPAN S, KRAUS V, KROGER B, MUNGER K, HOWLEY PM, PHELPS WC, NEVIS JR. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4549–4553.
- [14] CHEN JJ, REID CE, BAND V, ANDROPHY EJ. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science* 1995; **269**: 529–532.
- [15] CHOO KB, PAN CC, HAN SH. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of the cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology* 1987; **161**: 259–261.
- [16] COOPER K, HERRINGTON CS, LO ES-F, FVANS MF, MCGEE J. O'D. Integration of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 1992; **45**: 382–384.
- [17] CROOK T, TIDY JA, VOUSDEN KH. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell* 1991; **67**: 547–556.
- [18] CROOK T, WREDE D, VOUSDEN KH. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene* 1991; **6**: 873–875.
- [19] CROOK T, FISHER C, MASTERSON PJ, VOUSDEN KH. Modulation of transcriptional regulatory properties of p53 by HPV E6. *Oncogene* 1994; **9**: 1225–1230.
- [20] CULLEN AP, REID R, CAMPION M, LORINCZ AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991; **65**: 606–612.
- [21] DANOS O, GIRI I, THIERRY F, YANIV M. Papillomavirus genomes: sequences and consequences. *J Inv Dermatol* 1984; **83**: 7s–11s.
- [22] DAVIES R, HICKS R, CROOK T, MORRIS J, VOUSDEN KH. Human papillomavirus type 16 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol* 1993; **67**: 2521–2528.
- [23] DOORBAR J, CAMPBELL D, GRANDRJA, GALLIMORE PH. Identification of the human papillomavirus-la E4 gene products. *EMBO J* 1986; **5**: 355–362.
- [24] DOORBAR J, ELY S, STERLING J, McLEAN C, CRAWFORD L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991; **352**: 824–827.
- [25] DOSTATNIN I, AMBERT PF, SOUSA R, HAM J, HOWLEY PM, YANIV M. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev* 1991; **5**: 1657–1671.
- [26] DÜRST M. Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by *in situ* hybridization. *Virology* 1992; **189**: 132–140.
- [27] DYSON N, GUIDA P, MUNGER K, HARLOW E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* 1992; **66**: 6893–6902.
- [28] EL AWADY MK, KAPLAN J, O'BRIEN SJ, BURK R. Molecular analysis of integrated Human Papillomavirus 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa. *Virology* 1987; **159**: 389–398.
- [29] FAVRE M, BREITBURD F, CROISSANT O, ORTH G. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papilloma viruses. *J Virol* 1975; **15**: 1239–1247.
- [30] FIRZLAFF JM, LÜSCHER B, EISENMAN RN. Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 5187–5191.

- [31] FOSTER SA, DEMERS GW, ETSCHIED BG, GALLOWAY DA. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation *in vivo* correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J Virol* 1994; **68**: 5698–5705.
- [32] FUKUSHIMA M, YAMAKAWA Y, SHIMANO S, HASHIMOTO M, SAWADA Y, FUJINAGA K. The physical state of human papillomavirus 16 DNA in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1990; **66**: 2155–2161.
- [33] GLOSS B, BERNARD HU. The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distant element. *J Virol* 1990; **64**: 5577–5584.
- [34] GU Z, MATLASHEWSKI G. Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity. *J Virol* 1995; **69**: 8051–8056.
- [35] HOWLEY PM. Papillomavirinae: The Viruses and their replication. (w) Fields BN, Knipe DM, Howley PM [red] *Fields Virology*, third edition, Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia 1996: 2045–2076.
- [36] KYO S, INOUE M, NISHIO Y, NAKANISHI K, AKIRA S, INOUE H, YUTSUDO M, TANIZAWA O, HAKURA A. NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the noncoding region. *J Virol* 1993; **67**: 1058–1066.
- [37] HJORTH R, MORENO-LOPEZ J. Purification of bovine papilloma virus by gel filtration on Sephacryl S-1000 superfine *J Virol Methods* 1982; **5**: 151–158.
- [38] HUIBREGTSE JM, SCHEFFNER M, HOWLEY PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16 or 18. *EMBO J* 1991; **10**: 4129–4135.
- [39] HUIBREGTSE JM, SCHEFFNER M, HOWLEY PM. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP: A protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 4918–4927.
- [40] KANDA T, FURUNO A, YOSHIIKE K. Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. *J Virol* 1988; **62**: 610–613.
- [41] KRISTIANSEN E, JENKINS A, HOLM R. Coexistence of episomal and integrated HPV16 DNA in squamous cell carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol* 1994; **47**: 253–256.
- [42] LAMBERT PF. Papillomavirus DNA replication. *J Virol* 1991; **65**: 3417–3420.
- [43] LANCASTER WD, OLSON C. Demonstration of two distinct classes of bovine papilloma virus. *Virology* 1978; **89**: 372–379.
- [44] LARSEN PM, STORGAARD L, FEY SJ. Proteins present in bovine papillomavirus particles. *J Virol* 1987; **61**: 3596–3601.
- [45] LECHNER MS, MACK DH, FINICIE AB, CROOK T, VOUSDEN KH, LAIMINS LA. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 *in vivo* and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J* 1992; **11**: 3045–3052.
- [46] LECHNER MS, LAIMINS LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 1994; **68**: 4262–4273.
- [47] LEPTAK C, RAMON S, KULKE R, HORWITZ BH, RIESELL DJ. Tumorigenic transformation of mouse keratinocytes by the E5 genes of human papillomavirus type 16 and bovine papillomavirus type 1. *J Virol* 1991; **65**: 7078–7083.
- [48] LUSKY M, FONTANE E. Formation of the complex of bovine papillomavirus E1 and E2 protein is modulated by E2 phosphorylation and depends upon sequences within the carboxyl terminus of E1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6363–6367.
- [49] MAKI H, FUJIKAWAADACHI K, YOSHIE O. Evidence for a promoter-like activity in the short non-coding region of human papillomaviruses. *J Gen Virol* 1996; **77**: 453–458.
- [50] MANSUR CP, MARCUS B, DALAL S, ANDROPHY EJ. The domain of p53 required for binding HPV16 E6 is separable from the degradation domain. *Oncogene* 1995; **10**: 457–465.

- [51] MATLASHEWSKI G, SCHNEIDER J, BANKS L, IONES N, MURRAY A, CRAWFORD L. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *EMBO J* 1987; **6**: 1741–1746.
- [52] MATSUKURA T, KOI S, SUGASE M. Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. *Virology* 1989; **172**: 63–72.
- [53] MCCANCE DJ, KOPAN R, FUCHS E, LAIMINS LA. Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 7169–7173.
- [54] McINTYRE MC, RUESCH MN, LAIMINS LA. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p 107. *Virology* 1996; **215**: 73–82.
- [55] MEINKE W, MEINKE GC. Isolation and characterization of the major capsid protein of bovine papillomavirus type 1. *J Gen Virol*. 1981; **52**: 15–24.
- [56] MEISELS A, FORTIN R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976; **20**: 505–509.
- [57] MEISELS A, FORTIN R. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol* 1977; **21**: 379–390.
- [58] MELENDY T, SEDMAN J, STENLLIND A. Cellular factors required for papillomavirus DNA replication. *J Virol* 1995; **69**: 7857–7867.
- [59] MIETZ JA, UNGER T, HUIBREGTSE JM, HOWLEY PM. The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by 5V40 large T-antigen and by HPV-16 oncoprotein. *EMBO J* 1992; **11**: 5013–5020.
- [60] MOHR IJ, CLARK R, SUN S, ANDROPHY EJ, MACPHERSON P, BOTCHAN M. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 1990; **250**: 1694–1699.
- [61] MOLINARI M, MILNER J. p53 in complex with DNA is resistant to ubiquitin-dependent proteolysis in the presence of HPV-16 E6. *Oncogene* 1995; **10**: 1849–1854.
- [62] MÜNGER K, WERNES BA, DYSON N, PHELPS WC, HARLOW E, HOWLEY PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1989; **8**: 4099–4105.
- [63] ORIEL J. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis* 1971; **47**: 1–13.
- [64] PAQUETTE RL, LEE Y, WILCZYŃSKI SP, KARMAKAR A, KIZAKI M, MILLER CW. Mutations of p53 and human papillomavirus infection in cervical carcinoma. *Cancer* 1993; **72**: 1272–1280.
- [65] PHELPS WC, YEE CL, MÜNGER K, HOWLEY PM. The human papillomavirus type 16 E7 encodes transactivation and transformation functions similar to adenovirus E1a. *Cell* 1988; **58**: 539–547.
- [66] PIERREFITE V, CUZIN F. Replication efficiency of bovine papillomavirus type 1 DNA depends on cis-acting sequences distinct from the replication origin. *J Virol* 1995; **69**: 7682–7687.
- [67] PIM D, COLLINS M, BANKS L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 1992; **7**: 27–32.
- [68] PIRISI L, YASUMOTO S, FELLER M. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* 1987; **61**: 1061–1065.
- [69] REID R, LAVERTY C, COPPLESON M, ISARANGKUL W, HILLS E. Noncondylomatous cervical wart virus infection. *Obstet Gynecol* 1980; **55**: 476–483.
- [70] RODEN RBS, KIRNBAUER R, JENSON AB, LOWY DR, SCHILLER JT. Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol* 1994; **68**: 7260–7266.
- [71] ROMANCZUK H, THIERRY F, HOWLEY PM. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol* 1990; **64**: 2849–2859.
- [72] RUSTGI AK, DYSON N, BERNARDS R. Amino-terminal domains of c-myc and Nmyc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1991; **352**: 541–544.

- [73] SANTUCCI S, ANDROPHY EJ, BONNE-ANDREA C, CLERTANT P. Proteins encoded by the bovine papillomavirus E1 open reading frame: expression in heterologous systems and in virally transformed cells. *J Virol* 1990; **64**: 6027–6039.
- [74] SCHEFFNER M, WERNESS BA, HUIBREGTSE JM, LEVINE AJ, HOWLEY PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes degradation of p53. *Cell* 1990; **63**: 1129–1136.
- [75] SCHEFFNER M, HUIBREGTSE JM., VIERSTRA RD, HOWLEY PM. The HPV16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993; **75**: 495–505.
- [76] SCHNEIDER A, HOTZ M, GISSMANN I. Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *Int J Cancer* 1987; **40**: 198–201.
- [77] SEDMAN S, HUBBERT NL, VASS WC, LOWY DR. Mutant p53 can substitute for human papillomavirus type 16 in immortalization of human keratinocytes but does not have E6-associated trans-activation or transforming activity. *J Virol* 1992; **66**: 4201–4208.
- [78] SETO E, USHEVA A, ZAMBETTI GP, MOMAND J, HORIKOSHI N, WEINMANN R, LEVINE AJ, SHENK T. Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 12028–12032.
- [79] STOREY A, ALMOND N, OSBORN K, CRAWFORD L. Mutations of the human papillomavirus type 16 E7 gene that affect transformation, transactivation and phosphorylation by the E7 protein. *J Gen Virol* 1990; **71**: 965–970.
- [80] STUBENRAUCH F, LEIGH IM, PFISTER H. E2 represses the late gene promoter of human papillomavirus type 8 at high concentrations by interfering with cellular factors. *J Virol* 1996; **70**: 119–126.
- [81] SUN S, THORNER L, LENTZ M, MACPHERSON P, BOTCHAN M. Identification of a 68 kilodalton nuclear ATP-binding phosphoprotein encoded by bovine papillomavirus type 1. *J Virol* 1990; **64**: 5093–5105.
- [82] SYRJÄNEN KJ. Natural history of genital human papillomavirus infections. *Papillomavirus Reviews: Current Research On Papillomaviruses* 1996; 189–207.
- [83] TAN SH, LEONG LEC, WALKER PA, BERNARD HU. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Spl and TFIID. *J Virol* 1994; **68**: 6411–6420.
- [84] THIERRY F, YANIV M. The BPV 1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV 18 regulatory region. *EMBO J* 1987; **6**: 3391–3397.
- [85] THOMAS M, MASSIMI P, JENKINS J, BANKS L. HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene* 1995; **10**: 261–268.
- [86] THORNER L, BACAY N, CHOE J, BOTCHAN M. The product of the bovine papillomavirus type 1 modulator gene (M) is a phosphoprotein. *J Virol* 1988; **62**: 2474–2482.
- [87] USTAV M, STENDLUNG A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* 1991; **10**: 448–449.
- [88] USTAV M, USTAV E, SZYMANSKY P, STENDLUNG A. Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E 1. *EMBO J* 1991; **10**: 4321–4329.
- [89] VAN DEN BRULE AJC, SNIJDERS PJF, MEIJER CJLM, WALBOOMERS JMM. PCR based detection of genital HPV genotypes: an update and future perspectives. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses* 1996; 180–188.
- [90] VAN RAST MA, TACHEZY R, BURK RD. Human papillomaviruses: a neverending story? *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses* 1996; 1–19.
- [91] VAN RAST MA, TACHEZY R, DELIUS H, BURK RD. Taxonomy of the human papillomaviruses. *Papillomavirus Rep* 1993; **4**: 61–65.
- [92] WERNESS BA, LEVINE AJ, HOWLEY PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; **248**: 76–79.

- [93] WIMAN KG. The retinoblastoma gene: role in cell cycle control and cell differentiation. *FASEB J* 1993; **7**: 841–844.
- [94] WOODWORTH CD, BOWDEN PE, DONIGER J. Characterization of normal human exocervical epithelial cells immortalized *in vitro* by papillomavirus types 16 and 18 DNA. *Cancer Res* 1988; **48**: 4620–4628.
- [95] YANG L, LI R, MOFIR I, CLARK R, BOTCHAN M. Activation of BPV-I replication *in vitro* by the transcription factor E2. *Science* 1991; **353**: 628–632.
- [96] YASUMOTO S, BURKHARD AL, DONIGER J. Human papillomavirus type 16- induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J Virol* 1986; **57**: 572–577.
- [97] ZHOU J, GISSMAN L, ZENTGRAF H, MULLER H, PICKEN M, MULLER M. Early phase in the infection of cultured cells with papillomavirus virions. *Virology* 1995; **214**: 167–176.
- [98] ZWERSCHKE W, JOSWIG S, JANSEN-DURR P. Identification of domains required for transcriptional activation and protein dimerization in the human papillomavirus type-16 E7 protein. *Oncogene* 1996; **12**: 213–220.
- [99] ZUR HAUSEN H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976; **36**: 794.

Redaktor prowadzący – J. Kuźnicki

Otrzymano: 10.01.1998 r.

Przyjęto: 10.03.1998 r.

Adres autora: ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

SIŁY I NAPRĘŻENIA MECHANICZNE WE WRZECIONIE MITOTYCZNYM; ICH ROLE W ROZDZIELANIU CHROMOSOMÓW*

FORCES AND MECHANICAL STRESSES IN MITOTIC SPINDLE;
THEIR ROLES IN CHROMOSOME SEGREGATION

Zygmunt HEJNOWICZ

Katedra Biofizyki i Biologii Komórki, Uniwersytet Śląski, Katowice

Streszczenie: Przegląd traktuje o mechanizmie rozdzielania par chromatyd w mitozie lub par chromosomów homologicznych w mejozie, który wyklucza możliwość, że dwaj partnerzy jednej pary przejdą do tego samego bieguna wrzeciona mitotycznego. Pary rozdzielane są na zasadzie: (a) zdolności generowania siły przesuwającej kinetochor (we współdziałaniu z przyłączonymi doń mikrotubulami) do bieguna, znacznie większej ($>1000\times$) niż siła potrzebna do ruchu chromosomu; (b) realizacji tej zdolności przy bipolarnej orientacji par kinetochorów (kinetochory jednej pary są połączone z obu biegunami, a siły działają w przeciwnych kierunkach), dzięki czemu powstają duże naprężenia rozciągające w kinetochorach; (c) zmiany chemizmu kinetochorów pod wpływem naprężenia, co umożliwia przejście przez punkt kontrolny cyklu komórkowego od metafazy do anafazy; (d) sprzężenia zwrotnego między narastaniem naprężenia w parze kinetochorów a stabilizacją tych przyłączeń mikrotubul do kinetochorów, które powodują naprężenie, co daje bipolarną orientację z efektem wymienionym w punkcie (b).

Słowa kluczowe: kinetochory, mejoza, mikrotubule, mitoza, naprężenia mechaniczne, naprężenie rozciągające, punkt kontrolny cyklu komórkowego, ruch chromosomów, siły mitotyczne, wrzeciono mitotyczne.

Summary: The review treats of the mechanism of chromosome segregation in mitosis or meiosis which excludes the possibility that both partners of a pair (sister or homologous chromosomes in mitosis or meiosis, respectively) go to the same pole. The segregation appears to rely upon: (a) the ability of kinetochores (in an interaction with attached microtubules) to generate forces which are much higher ($>1000\times$) than forces necessary to move free chromosomes; (b) the bipolar orientation of a kinetochore pair which enables realization of this ability (the forces act in opposite direction) resulting in a high

*Autor dziękuje Prof. dr A. Sieversowi (Uniwersytet Boński) za pomoc w zebraniu literatury do artykułu.

mechanical tension in the kinetochores; (c) changing of kinetochore chemistry by the tension which controls a cell cycle checkpoint in metaphase; and (d) positive feedback between increasing tension in kinetochores and stabilization of these attachments of kinetochores to microtubules that give bipolar orientation with the effect listed under (b).

Key words: cell cycle checkpoint, chromosome movement, kinetochores, mechanical stress, meiosis-microtubules, mitosis, mitotic forces, mitotic spindle, tension.

*Dedicated in memory
of Prof. Dr Karl-Ernst Wohlfarth-Bottermann (1923–1997)
who helped many Polish cell biologists in their scientific development.*

TERMINOLOGIA I WSTĘPNE OBJAŚNIENIA

W artykule, przymiotnik „mitotyczny” stosowany jest w szerokim znaczeniu, a więc rzeczowniki, które określa, takie jak wrzeciono czy siła, mogą odnosić się również do mejozy.

Zauważmy najpierw, że rozdzielać można to, co jest połączone [8]; w mitozie rozdzielane są chromatydy chromosomów, zaś w pierwszym podziale mejozycznym rozdzielane są pary skoniugowanych, homologicznych chromosomów połączonych chiasmami.

Chromosom składa się z dwu siostrzanych chromatyd, których zespolenie określane jest jako kohezja siostrzanych chromatyd [8,7]. Strukturalnie odrębne miejsce chromosomu zwane centromerem zawiera i realizuje informację dla wytworzenia siostrzanych kinetochorów oraz centromerowej kohezji chromatyd, która różni się od kohezji pozacentromerowej [72]; para siostrzanych centromerów jest kohezjnie zespolona aż do anafazy (w przypadku mejozy pozostaje zespolona aż do anafazy II). Kinetochor jest blaszkowatym kompleksem DNA i wielu białek [9,10,4780]. Odgrywa szczególną rolę w ruchach chromosomów i ich rozdzielaniu. W mitozie, siostrzane chromatydy mają oddzielne kinetochory, tworzące parę rozdzielającą w anafazie. W mejozie I, kinetochory siostrzanych chromatyd są tak ściśle zespolone w centromerze, że stanowią funkcjonalną jednostkę. Dwie takie jednostki w bivalencie stanowią parę, która ulega rozdzielaniu w pierwszym podziale.

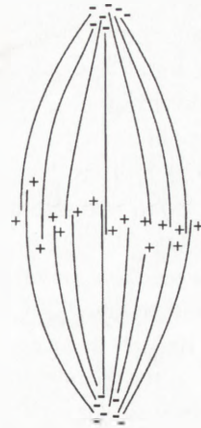
Rozdzielanie chromosomów dokonuje się we wrzecionie mitotycznym [971]. Składa się ono zwykle z dwu polarnych układów mikrotubul pogrążonych w macierzy wrzeciona [39]. Termin mikrotubula będzie skracany do MT, przy czym tensam skrót będzie stosowany zarówno do liczby pojedynczej, jak i mnogiej.

Pojedynczy polarny układ MT wrzeciona, zwany również połówką wrzeciona (nie w znaczeniu potocznym) składa się z MT skierowanych końcami minus do

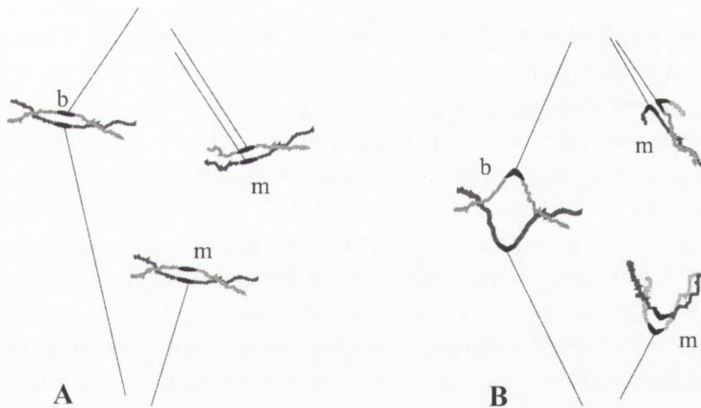
bieguna wrzeciona (rys. 1), które jest organizowane nie tylko przez centrosomy, ale i dodatkowe białka [21, 28].

Typowe wrzeciono jest dwubiegunowe (bipolarne) i składa się z dwu połówek. Eksperymentalnie można jednak otrzymać wrzeciona, w których występuje albo tylko jedna połówka (monopolarne), albo więcej jak dwie połówki.

Wyróżniamy MT kinetochorowe (kMT) z końcami plus zaczepionymi w kinetochorach i MT niekinetochorowe. Kinetochor zwykle jest dostatecznie duży, aby móc przyłączyć wiele MT, które łącznie tworzą tak zwane włókno kinetochorowe (u *Saccharomyces cerevisiae* jednak przyłącza tylko jedną MT). Wśród niekinetochorowych MT wyróżniamy dwie grupy: MT wnikające między podobne MT drugiej połówki o przeciwnej polarności i łączące się z nimi dynamicznie specjalnymi białkami oraz MT z wolnymi końcami zwykle nie sięgającymi dalej niż do równika wrzeciona. Pierwszą grupę będziemy określali jako MT zachodzące antyrównoległymi końcami (*interdigitating MT*), drugą – jako MT biegunowe (*polar MT*). W przypadku wrzeciona z centrosomami istnieją jeszcze MT astralne odchodzące na zewnątrz wrzeciona i wnikające w korową warstwę cytoplazmy. (W różnych pracach stosowane są



RYSUNEK 1. Schemat ilustrujący orientację mikrotubul we wrzecionie mitotycznym; końce minus mikrotubul znajdują się na biegunach wrzeciona



RYSUNEK 2. Schematy ilustrowujące bipolarną (b) i monopolarną (m) orientację kinetochorów w mitozie (A) i mejozie (B)

różne terminy na oznaczenie różnych MT wrzeciona; „przetłumaczono” je na terminy podane powyżej).

Jeżeli jeden z kinetochorów danej pary jest połączony za pośrednictwem kMT z jednym biegunem wrzeciona, zaś drugi kinetochor z drugim biegunem, mówimy o bipolarnym połączeniu lub orientacji. Jeżeli para kinetochorów połączona jest tylko z jednym biegunem (oba kinetochory są połączone z tym samym biegunem lub jeden w ogóle nie połączony), mówimy o monopolarnym połączeniu lub orientacji (rys. 2).

Przeście z metafazy do anafazy podlega jednemu z punktów kontrolnych cyklu komórkowego [24].

Anafaza ma dwa stadia, które mogą zachodzić na siebie: stadium A (anafaza A) – gdy chromosomy poruszają się do biegunów i stadium B (anafaza B) – gdy biegunki oddalają się od siebie (wrzeciono ulega wydłużeniu).

MITOTYCZNE RUCHY CHROMOSOMÓW

Ruch kinetochoru może odbywać się albo w kierunku do bieguna, ku któremu jest zwrócony lub z nim powiązany za pośrednictwem kMT, albo w kierunku od takiego bieguna. Kierując się uznaną szeroko terminologią, pierwszy będziemy nazywali ruchem P (od *poleward*), drugi zaś ruchem AP (od *away from the pole*). Mówi się również o stanach P i AP kinetochoru ze względu na ruch, który aktualnie wykonuje.

W późnej profazie i prometafazie, dany kinetochor wykazuje na przemian ruchy AP i P [68]. Wypadkowa tych ruchów skierowana jest ku płaszczyźnie równikowej, co powoduje, że kinetochory lokują się albo w tej płaszczyźnie (mitoza), albo symetrycznie względem niej (mejoza I). Ten wypadkowy ruch kinetochorów do równika i odpowiadające mu skupianie chromosomów w płytkę metafazową to kongresja.

W anafazie pary kinetochorów ulegają rozdzieleniu, a rozdzielone kinetochory trwają w ruchu P zmierzając ku przeciwnym biegunom.

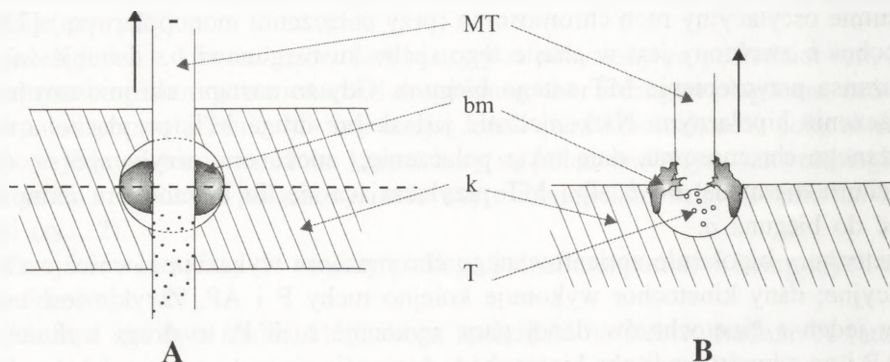
Bezpośrednio po przyłączeniu pierwszej MT przez jeden z kinetochorów siostrzanych chromatyd (połączenie monopolarne) następuje stosunkowo szybki ruch kinetochoru, a tym samym chromosomu, w kierunku bieguna, do którego należy dana MT [3]. Oznaczmy ten kinetochor, jak również wymieniony biegun, literą *a*. Kinetochor *a* jest wtedy zwrócony do bieguna *a*, zatem wykonuje ruch P (biegun *a* może nie być najbliższym biegunem dla kinetochoru *a*). Drugi kinetochor, *b*, wykonuje wtedy ruch AP względem przeciwnego bieguna *b*, ku któremu jest zwrócony, ale na razie nie jest z nim połączony. Kinetochor *a* zatrzymuje się jednak przed osiągnięciem bieguna *a*, po czym zaczyna wykonywać ruch AP. Nie osiągając

płaszczyzny równikowej wrzeczona, kinetochor znowu zmienia kierunek ruchu. Daje to w sumie oscylacyjny ruch chromosomu (przy połączeniu monopolarnym) [73]. Kinetochor *b* zwrócony jest w czasie tego ruchu ku biegunowi *b*. Istnieje więc duża szansa przyczepienia MT z tego bieguna. Gdy to nastąpi, chromosom jest w połączeniu bipolarnym. Niekoniecznie jednak już druga MT, przyłączona do rozważanego chromosomu, daje takie połączenie; może ona przyłączyć się do kinetochoru *a* zamiast do *b* albo MT przyłączająca się do kinetochoru *b* może należeć do bieguna *a*.

Kinetochory bipolarnie zorientowanego chromosomu wykazują również ruchy oscylacyjne; dany kinetochor wykonuje kolejno ruchy P i AP. Zwykle jest tak, że gdy jeden z kinetochorów danej pary wykonuje ruch P, to drugi wykonuje ruch AP i na odwrót, czyli oba kinetochory poruszają się w tym samym kierunku względem laboratoryjnego układu odniesienia. W związku z tym powszechnie uważa się, że ruch AP kinetochoru jest powodowany pociąganiem tego kinetochoru przez drugi będący w ruchu P. Kinetochory siostrzanych chromatyd mogą jednak poruszać się również w przeciwnych kierunkach. Biorąc pod uwagę ten fakt oraz to, że monopolarnie połączone kinetochory mogą także wykonywać oscylacyjne ruchy, wprowadzono pojęcie niestabilności kierunkowej kinetochoru [74]. W połączeniu bipolarnym, ruch obu kinetochorów jednej pary w tym samym kierunku stanowi przejaw synchronizacji tej niestabilności; jeden wykonuje ruch P, drugi zaś ruch AP. Występuje wtedy oscylacyjny ruch całego chromosomu. Gdy jednak para kinetochorów porusza się w przeciwnych kierunkach, występują zmiany rozciągnięcia kinetochorów i centromeru (w mitozie) albo kinetochorów i odcinków chromosomów do chiazmy (w mejozie), bez zmiany położenia chromosomu lub biwalentu jako całości [74]. Niestabilność kierunkowa zdaje się być powszechną właściwością kinetochorów [68]. Występuje nie tylko w profazie, ale również w metafazie i na początku anafazy.

Zmiana kierunku ruchu kinetochoru dokonuje się gwałtownie. W komórkach płuc traszki zmiana występuje co 7 s, zarówno gdy tylko jeden kinetochor z pary był przyłączony do kMT (orientacja monopolarna), jak i po osiągnięciu orientacji bipolarnej [73].

Prędkość ruchów oscylacyjnych kinetochoru jest wolniejsza niż jego początkowy ruch P po przyłączeniu pierwszej MT (orientacja monopolarna), ale szybsza niż ruchu P w anafazie. Należy w związku z tym mieć na uwadze, że w początkowym ruchu P kinetochor przyczepiony jest do boku MT, po której się przesuwają (rys. 3a). Następnie, część MT wystająca poza kinetochor ulega depolimeryzacji, a koniec plusowy MT lokuje się w kinetochorze (rys. 3b). Od tego momentu ruchowi P kinetochoru towarzyszy depolimeryzacja kMT, zaś ruchowi AP – polimeryzacja kMT na końcach plus przyłączonych do kinetochoru [33,52]. Prawdopodobnie, procesy polimeryzacji i depolimeryzacji na końcach MT tkwiących w kinetochorach limitują prędkość ruchu kinetochoru niezależnie od sił, które go powodują. Stąd



RYSUNEK 3. Schematy ilustrujące przyłączenie mikrotubuli do kinetochoru bokiem (A) i końcem (B): MT – mikrotubula; bm – białko motoryczne typu dyneiny; k – kinetochor; T – dimery tubuliny. Strzałka wskazuje kierunek ruchu P (ku biegunowi). Zakropkowana część MT na rysunku A ulega odrzuceniu, po czym mikrotubula zmienia położenie ze stycznego na prostopadłe względem kinetochoru, lokując swój plusowy koniec w zagłębieniu między cząsteczkami białka motorycznego. Na rysunku A zagłębienie oglądane jest z góry, na rysunku B oglądane jest z boku, na przekroju wykonanym wzdłuż linii kreskowanej na rysunku A

prawdopodobnie mniejsza prędkość ruchów oscylacyjnych niż ruchu początkowego, gdy końca MT w kinetochorze jeszcze nie było. Intrygujące jest to, że w ruchu oscylacyjnym, prędkość w obu kierunkach, również w stanie orientacji monopolarnej może być jednakowa [73]. Można to wyjaśniać istnieniem dwu typów motorów w kinetochorze, jednego dla ruchu P, drugiego dla ruchu AP (patrz niżej). Wymagałoby to jednak generowania jednakowych sił przez oba typy motorów, co wydaje się mało prawdopodobne. Podobna prędkość w obu kierunkach wynika raczej z podobnych szybkości depolimeryzacji i polimeryzacji kMT ograniczających prędkość niezależnie od wielkości działających sił. Oczywiście, prędkość ruchów oscylacyjnych kinetochorów i chromosomów jest znacznie większa niż wypadkowa prędkość kongresji. Prędkość ruchów chromosomów u roślin jest ogólnie mniejsza niż u zwierząt [9], jednak ruchy samych kinetochorów u roślin nie są dostatecznie poznane.

W czasie trwania ruchów oscylacyjnych liczby MT przyłączonych do kinetochorów wzrastają. Na ogół liczby MT przyłączonych do siostrzanych kinetochorów są różne, ale wykazują tendencję do zrównania się w późnej metafazie. Ponieważ kinetochor w oddziaływaniu z przyłączonymi do niego MT generuje siłę skierowaną ku biegunowi (patrz niżej) i siła ta zależy od liczby przyłączonych MT [27], jedną z przyczyn oscylacyjnego ruchu pary kinetochorów może być zmieniająca się różnica liczb MT przyłączonych do obu kinetochorów jednej pary. Inną przyczyną jest fazowość generowania siły w oddziaływaniu kinetochoru z MT (patrz niżej).

Jak wspomniano, oscylacyjne ruchy par kinetochorów są zwykle zsynchronizowane. Stosując mikrochirurgię laserową można ruchy jednej pary zdesynchronizować rozcinając centromer między kinetochorami [74]. Rozcięcie na ogół pozostawia pewne nitki chromatyny łączące chromatydy, tak że kinetochory rozsuwają się, ale chromatydy pozostają elastycznie połączone. Okazuje się, że desynchronizacja jest tym dalej posunięta, im słabsze jest połączenie kinetochorów jednej pary [74]. Wysłunięto w związku z tym hipotezę, że mechanizm przełączania stanów ruchu działa na zasadzie kinetochorowego tensometru; przy dużym naprężeniu rozciągającym kinetochoru włączany jest stan AP, zaś przy niskim naprężeniu włączany jest stan P [74]. Stan ruchliwości kinetochoru czy pary kinetochorów zależy jednak od wypadkowej sił działających na kinetochor(y), a generowanych w kinetochorach lub poza nimi.

WIELKOŚCI SIŁ POWODUJĄCYCH MITOTYCZNE RUCHY CHROMOSOMÓW ORAZ SIŁ GENEROWANYCH W MITOZIE

Siły – *par excellence* – to temat fizyczny, a zatem niezbędne jest jego ilościowe ujęcie. Zaczynamy omawianie sił mitotycznych od ich ilościowej charakterystyki, choć uwzględnianie takiej charakterystyki bynajmniej nie jest typowe w podejściu biologów komórkowych do tematu sił mitotycznych. Znajomość jednak charakterystyki ilościowej, choćby bardzo ogólnej, pozwoli na pominięcie wgłębiania się w charakterystykę jakościową tych sił, które być może występują, lecz są bardzo słabe. To tak jak z ciśnieniem światła; na pewno istnieje, ale po co zajmować się nim w związku z ruchami na ziemi czy powietrzu, skoro wiadomo, że siły, jakie ciśnienie światła powoduje, są do pominięcia w porównaniu z siłą grawitacji, wiatru itp.

Siłę potrzebną do poruszania chromosomu można wyznaczyć znając średnią lepkość wrzeczona oraz rozmiary i prędkość chromosomu. Dla typowego chromosomu poruszającego się z prędkością $6 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ siła ta wynosi $0,1\text{--}0,5 \text{ pN}$ (piko-niuton) w zależności od stopnia kondensacji chromosomu [3,36,54]. Oczywiście, jest to wartość otrzymana przy założeniu, że chromosom porusza się swobodnie.

Siły P działające na chromosomy we wczesnej anafazie zmierzył Nicklas [55]. Dokonał tego przy pomocy włókna szklanego, które zaczepione o chromosom, będąc elastycznie wygięte, przeciwdziało jego ruchowi. Jednostka wygięcia włókna była wykalibrowana w jednostkach siły powodującej wygięcie. Pomiar przeprowadzono na chromosomach pierwotnych spermatocytów konika polnego *Melanoplus sanguinipes* w pierwszej połowie anafazy I. Ponieważ prędkość ruchu chromosomów

była nieco zmienna w różnych komórkach (w zakresie od 9 do 15 nm · s⁻¹), prędkość chromosomu zaczepionego na włóknie wyrażano w procentach prędkości innych chromosomów tej samej komórki.

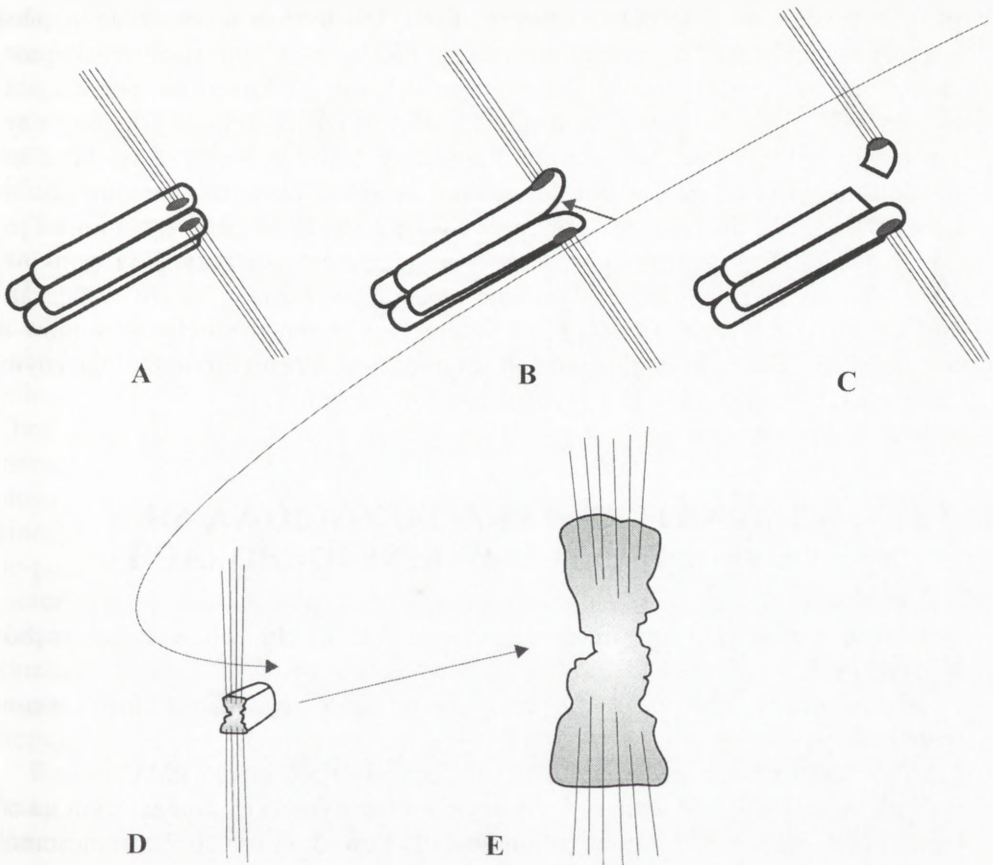
Prędkość ruchu zaczepionych chromosomów nie ulegała zmianie, dopóki siła wywierana przez włókno, a przeciwdziałająca ich ruchom nie osiągnęła około 100 pN. Oznacza to, że siła 200–500 razy większa niż ta, która jest potrzebna, aby nadać swobodnemu chromosomowi prędkość, z jaką porusza się w anafazie, nie zmniejsza prędkości chromosomu; chromosom zachowuje się jak czołg, który nie zmienia prędkości pokonując nawet duże przeszkody. Przy dalszym wzroście siły prędkość gwałtownie spadała. Spadek prędkości o 50% występował przy 370 pN (średnia statystyczna), zatrzymanie chromosomu następowało przy 700 pN (wyznaczona z ekstrapolacji liniowej regresji na wykresie prędkość *versus* siła). Według Nicklasa [55] nie jest to granica możliwości generowania siły, ale raczej granica wytrzymałości szkieletowej wrzeciona. Mianowicie, przy przyłożeniu za pomocą włókna siły zatrzymującej zaczepiony chromosom, prędkość innych niezaczepionych chromosomów ulegała zmniejszeniu, choć przy niższych siłach żadnego wpływu włókna na niezaczepione chromosomy nie obserwowano. Mamy więc następujący wynik: maksymalna siła, $F_{\max} = 700$ pN, generowana w kinetochorze jest ponad tysiąc razy większa niż siła potrzebna do ruchu chromosomu swobodnego!

Wiadomo (patrz niżej), że siła, jaka działa na chromosom w anafazie A, jest generowana w oddziaływaniu kMT z kinetochorem, czyli F_{\max} powstaje w takim oddziaływaniu. Ten rodzaj siły zależy od liczby przyłączonych MT [28]. Średnia liczba MT przypadająca na kinetochor w spermatocytach badanego konika polnego wynosi 15, maksymalna więc siła, jaka może być generowana w oddziaływaniu z jedną MT, to 47 pN. Nawet ta jednostkowa siła znacznie przewyższa siłę potrzebną do ruchu swobodnego chromosomu.

W eksperymencie z włókniem zatrzymującym chromosom, siła była generowana jakby po to, aby pokonać przeszkodę, którą stanowiło włókno. Eksperyment taki wskazuje, że we wrzecionie mogą być generowane stosunkowo bardzo duże siły, nie dowodzi jednak, że w normalnym ruchu anafazowym takie siły są generowane. Może się nawet wydawać, że tych dużych sił nie ma, bo chromosom porusza się z prędkością, która odpowiada znacznie mniejszej sile. Zauważmy jednak, że po pierwsze, chromosomy nie są swobodne (stan taki uzyskują dopiero w zaawansowanej anafazie): w pro- i metafazie para kinetochorów jest połączona (chiasmami w mejozie I, kohezją centromerową w mitozie), a również na początku anafazy kinetochory siostrzanych lub homologicznych chromosomów nie są swobodne, poruszają się w przeciwnych kierunkach pokonując opory wynikające z zaplecienia ramion siostrzanych czy homologicznych chromosomów. Po drugie, prędkość ruchu chromosomów może nie pozostawać w żadnej prostej relacji do wielkości sił generowanych w mitozie czy mejozie; duże siły generowane w parze kinetochorów w przeciwnych kierunkach mogą być równe co do wielkości i wtedy nie ma żadnej

wypadkowej siły zdolnej powodować ruch takiej pary. Wystarczą jednak małe wahania tych sił, aby wystąpił ruch oscylacyjny, wystarczy dodanie niewielkiej dodatkowej siły do pary wzajemnie znoszących się dużych sił, aby wystąpił uchwytny ruch.

Mamy obecnie dobre podstawy empiryczne (patrz niżej), aby twierdzić, że generowanie w kinetochorach tak dużych sił, jak F_{\max} w eksperymencie z włóknem przyłożonym do chromosomu, występuje również w normalnej mitozie czy mejozie. Dzieje się to niewątpliwie w związku z naturalnymi przeszkodami ruchu kinetochorów (kohezja, chiazmy). Istnieją również dobre podstawy dla przyjęcia poglądu, że F_{\max} w tej wysokości, jaka została wyznaczona na początku anafazy, może



RYSUNEK 4. Schematy ilustrujące eksperymenty Khodiakova i wsp. [38]: A – chromosom metafazowy; B – kinetochory zaczynają się rozchodzić, a eksperymentator działa wiązką światła laserowego biegnącą w kierunku strzałki; C – bezpośrednio po przecięciu, w którym utworzył się mały jednokinetochorowy fragment chromosomowy; D – po odtworzeniu bipolarnego połączenia przez jednokinetochorowy fragment; E – układ mikrotubul przyłączonych do kinetochoru jednokinetochorowego fragmentu

być generowana również w metafazie, a nawet w końcowej fazie profazy, gdy kinetochor przyłączył pełen komplet mikrotubul [56]. Wymowne w tym względzie są badania Khodiakova [38], w których zastosowano mikrochirurgię laserową do cięcia między dwoma kinetochorami w bipolarnie zorientowanych chromosomach. Wybierano odpowiednio zorientowany (względem układu laserowego) chromosom metafazowy i gdy zaczynało się rozchodzenie kinetochorów, przepuszczano między nimi wiązkę światła laserowego tak, że otrzymywano dwa fragmenty chromosomowe, każdy z pojedynczym nieuszkodzonym kinetochorem (rys. 4). Można było w ten sposób otrzymać fragment zawierający niewiele materiału chromosomowego, ale cały kinetochor. Początkowo taki kinetochor był w połączeniu monopolarnym szybko jednak odłączał MT, co powodowało opóźnienie anafazy w komórce (o czym będzie mowa poniżej), a następnie przyłączał na nowo MT, zachowując się jak nienaruszona para kinetochorów w profazie i prometafazie. Ostatecznie ustawiał się w płaszczyźnie równikowej. Trójwymiarowa tomograficzna (elektronowo-mikroskopowa) analiza jedno-kinetochorowych fragmentów wykazała, że kinetochor przyczepiony był do MT z obu biegunów w dwu oddzielnych polach (rys. 4 E), przy czym kinetochor był silnie rozciągnięty i odkształcony, jakby w początkowej fazie rozrywania. Komórka przechodziła do anafazy, w której nienaruszone chromosomy rozdzielały się na dwa chromosomy przesuwane do biegunów, natomiast jedno-kinetochorowe fragmenty pozostawały naciągnięte w płaszczyźnie równikowej albo ulegały przeciągnięciu do jednego z biegunów. Oznacza to, że na początku anafazy nie tyle wzrasta siła ciągnąca kinetochory normalnych chromosomów do biegunów, ile następuje zwolnienie kohezji między siostrzanymi (homologicznymi) kinetochorami; duża siła jest generowana już wcześniej.

CHARAKTERYSTYKA JAKOŚCIOWA SIŁ GENEROWANYCH W KINETOCHORACH

Istnieją dwa poglądy na to, co się dzieje w kinetochorach w czasie ruchów mitotycznych:

(a) kinetochor jest pociągany przez przesuwaną się włókno kinetochorowe (patrz niżej);

(b) w kinetochorze generowane są siły przesuwaną się po kMT.

Nicklas [57] wykazał jednak w eleganckim eksperymencie, polegającym na odcięciu przybiegunowej części wrzeciona, że siły powodujące ruch P chromosomów generowane są w kinetochorach.

Badania Hymana i Mitchisona [31,32] nad kinetochorami izolowanych chromosomów wskazały, że mogą one przyłączać MT i powodować ich przesuwanie się zarówno w kierunku końców minus, jak i końców plus. (Kierunek ruchu jest

względny, a w przypadku omawianego eksperymentu izolowane chromosomy nie mogły się poruszać. Będziemy go jednak zawsze określać tak, jakby to kinetochor poruszał się względem MT). W kinetochorach izolowanych chromosomów działało więc zarówno białko motoryczne generujące siłę w kierunku końca minusowego MT (minusowy motor), jak w kierunku końca plus (plusowy motor). Prędkość ruchu w kierunku końca minus była większa niż w kierunku plus, ale tylko na początku przyłączania MT do kinetochoru. Hyman i Mitchison [31,32] wysunęli pogląd, że minusowy motor, który zaczyna działać po przyłączeniu pierwszej MT do kinetochoru, zostaje częściowo wyłączany wraz z przyłączaniem następnych MT. Zmniejszenie prędkości wynika jednak prawdopodobnie z tego, że po ulokowaniu końców MT w kinetochorze, ruchowi kinetochoru musi towarzyszyć depolimeryzacja MT.

Charakterystyka wrażliwości kinetochorów izolowanych chromosomów na analogi ATP wskazuje, że w generowaniu siły w kierunku minus bierze udział dyneina [31]. Występowanie dyneiny w obrębie wrzeciona było znane od dawna [49]. Badania immunologiczne z zastosowaniem mikroskopu elektronowego wykazały, że dyneina (cytoplazmatyczna forma) istotnie występuje we włóknistej koronie kinetochoru [64,79].

Naturalnym kandydatem na motor plusowy jest kinezyzna. Jej ciężki łańcuch, przy końcu NH_2 , ma domenę motoryczną zawierającą miejsce wiązania ATP i MT. Klasyczną kinezyzę wyizolowano z muszki owocowej. Istnieją białka wykazujące wysoki stopień homologii do tej kinezyzny w obrębie domeny motorycznej i niski poza nią; są to białka kinezyzo-podobne. Różnią się między sobą w szczególności „ogonami”, które określają specyfikę przyłączania się do różnych organelli. Choć badania wskazują na występowanie kinezyzo-podobnych białek w centromerach [77, 79, 82,83], to jednak obecnie wydaje się, że białka te raczej zabezpieczają plusowe końce MT w kinetochorze, niż funkcjonują tam jako motor [15] typu kinezyzny, który przesuwa się po powierzchni MT. Przynajmniej jedno z kinezyzo-podobnych białek kinetochorowych, CENP-E może funkcjonować jako słaby motor depolimeryzujący MT na plusowym końcu [44, 83]. Nie ulega natomiast wątpliwości, że kinezyzo-podobne białka pełnią zwykłą funkcję motoryczną poza kinetochorami we wrzecionie i jego sąsiedztwie, biorąc udział w ruchach różnych organelli w czasie mitozy, a w szczególności mitochondriów. Prawdopodobnie występują na powierzchni ramion chromosomów, o czym będzie mowa poniżej.

Badania nad ruchami kinetochorów w komórkach wskazują, że istnieją dwa stany kinetochoru ze względu na generowanie siły. W jednym z nich kinetochor generuje siłę skierowaną ku minusowemu końcowi kMT. Prawdopodobnie w tym stanie czynne jest białko motoryczne typu dyneiny, jest to więc stan generowania siły P [37]. Charakterystyka drugiego stanu, w którym kinetochor wykazuje zwykle ruch AP, nie jest ostatecznie wyjaśniona. Według niektórych badaczy [73,74] w ruchu AP generowana jest siła skierowana ku końcowi plus z udziałem białka

kinezy-no-podobnego. Jest to najprostsze wyjaśnienie fazy AP w ruchu oscylacyjnym kinetochoru w orientacji monopolarnej. Istnieje jednak możliwość, że ruch AP w tej orientacji jest powodowany przez siłę generowaną poza danym kinetochorem (patrz niżej). Istotnie, badania Khodiakova i Riedera [37] wskazują, że w przypadku bipolarnej orientacji pary kinetochorów, kinetochor oddalający się od swego bieguna nie generuje w tym czasie siły AP. Badania te, z zastosowaniem wideo-mikroskopii i laserowej mikrochirurgii, polegały na rozcinaniu centromeru w czasie jego ruchu ku jednemu z biegunów. Kinetochor zwrócony do tego bieguna kontynuował ruch, czyli w momencie rozcinania był w stanie generowania siły P, drugi zaś, którego ruch względem drugiego bieguna był typu AP, przestawał się poruszać lub zaczynał się poruszać w kierunku swego bieguna, co oznacza, że wcześniej był on ciągnięty przez siostrzany kinetochor. Jeżeli są tylko dwa stany kinetochoru ze względu na generowanie siły, to jeden z tych stanów jest stanem P, zaś drugi jest stanem neutralnym. Kinetochor w stanie neutralnym może się poruszać pod działaniem siły z zewnątrz; jest to albo siła generowana przez drugi kinetochor danej pary będący w stanie generowania siły P, albo siła odpychania biegunowego działająca na ramiona chromosomu w kierunku ku równikowi (patrz niżej).

CHARAKTERYSTYKA JAKOŚCIOWA SIŁ GENEROWANYCH WE WRZECIONIE POZA KINETOCHORAMI

Siły w hipotezie włókien ciągnących

Szeroko rozpowszechniona hipoteza włókien ciągnących chromosomy (*traction fiber hypothesis*) [63,19] przedstawiała ruchy chromosomów w podziale jądra jako wynik działania sił generowanych w MT, ale poza kinetochorami [56]. Podstawową rolę miało odgrywać pociąganie chromosomów przez włókna kinetochorowe. Siła generowana przez włókno kinetochorowe miała być proporcjonalna do jego długości. Powstały różne koncepcje generowania takiej siły: depolimeryzacja wzdłuż MT [34], rozciągnięta elastycznie otoczka włókna [65], generowanie siły wzdłuż włókna przez aktyno-miozynę [18], występowanie na powierzchni włókna cząsteczek motorycznych przesuwających włókno względem macierzy [70] lub względem biegunowych MT [26,51]. Para kinetochorów asymetrycznie rozmieszczona w prozacie miała być ciągnięta do płaszczyzny równikowej wrzeczona przez dłuższe, a więc silniejsze włókno po stronie dalszego bieguna. Ruch w anafazie A miał być wynikiem ciągnięcia rozdzielonych kinetochorów do biegunów, co w przypadku mitozy miało następować po zwolnieniu centromerowej kohezji między siostrzanymi chromatydami. Choć teoretycznie depolimeryzacja MT może stanowić motor dla ruchu kinetochoru, wykorzystując energię hydrolizy GTP zmagazynowaną w MT, towia-

domo obecnie, że nie jest to istotne źródło siły napędzającej ruchy chromosomów. Wydaje się również, że układ aktyno-miozynowy i oddziaływanie włókien kinetochorowych z macierzą lub z MT niekinetochorowymi nie odgrywa większej roli w generowaniu sił mitotycznych, choć czynniki te mogą mieć duże znaczenie dla funkcjonowania wrzeciona, a rola ich może wzrastać w szczególnych eksperymentalnych warunkach. Największa siła mitotyczna jest generowana w kinetochorze jako siła P.

Siły wypychania biegunowego

Istnieje wiele pośrednich dowodów na to, że chromosomy we wrzecionie doznają działania sił w kierunku od najbliższego bieguna, czyli sił AP generowanych poza kinetochorami [9,68].

Chromosomy w monopolarnym wrzecionie mają ramiona zwrócone od bieguna [6]. Bezkinetochorowe fragmenty chromosomów, otrzymywane za pomocą mikrochirurgii z użyciem wiązki laserowej, poruszają się w kierunku od najbliższego bieguna do równika z prędkością około $2 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ [67]. Małe fragmenty zawierające kinetochory zachowują się natomiast jak normalne chromosomy. Po przyłączeniu pierwszej MT poruszają się w kierunku do bieguna aż do osiągnięcia pewnej minimalnej odległości od niego. Odległość ta jest tym mniejsza, im mniejsza jest powierzchnia rzutu fragmentu na płaszczyznę prostopadłą do osi wrzeciona. Ponieważ ruch w kierunku do bieguna powodowany jest działaniem siły P generowanej z udziałem kinetochoru, minimalna odległość fragmentu od bieguna jest tą odległością, przy której siła skierowana do bieguna równoważy się z siłami działającymi w przeciwnym kierunku. Wynika stąd, że te ostatnie siły wzrastają ze zmniejszaniem się odległości od bieguna, a również wzrastają z rozmiarem rzutu powierzchni fragmentu prostopadłe do MT wrzeciona [67]. Siły takie nazywamy siłami wypychania biegunowego (*polar ejection forces*) (artykuły przeglądowe [66,68]). Liczba mnoga pochodzi prawdopodobnie stąd, że wypychanie zachodzi nie w jednym punkcie chromosomu, ale na całej jego powierzchni z wyjątkiem kinetochoru.

Wielkość omawianych sił jest skorelowana z gęstością MT biegunowych w danym miejscu wrzeciona [5] i spada do zera, gdy komórka poddana jest działaniu trucizn powodujących depolimeryzację MT (colcemid, nocodazol) lub stabilizację MT (taxol). Źródłem sił wypychania biegunowego może więc być nacisk rosnących MT. Istnieją jednak podstawy do tego, aby brać pod uwagę możliwość, że kinezynopodobne białka, przyczepione do powierzchni ramion chromosomów, oddziałując z MT niekinetochorowymi, generują siły skierowane ku dodatnim końcom MT [76].

Chromosomy osiągają metafazowy układ również w monopolarnych wrzecionach [40]. Najlepiej uzasadniony pogląd tłumaczący zachowanie się chromosomów w

monopolarnym wrzecionie oparty jest na zasadzie przeciwstawnego działania siły wypychania biegunowego oraz siły P działającej na kinetochor [67]. Należy jednak mieć na uwadze to, że siła P w monopolarnym wrzecionie może osiągać tylko nieznaczną wielkość, w związku z czym w bilansie wypadkowej siły wpływającej na ruch chromosomów liczą się nawet bardzo małe siły AP. Z badań nad monopolarnymi wrzecionami zarodka jeżowca, w których zastosowano nocodazol jako czynnik powodujący depolimeryzację niekinetochorowych MT wynika, że siły wypychania biegunowego generowane przez nacisk rosnących niekinetochorowych MT nie odgrywają roli dla położenia chromosomów w metafazie. Natomiast taxol oraz DO_2 – czynniki stymulujące polimeryzację tubuliny – powodowały zwiększenie odległości płytki metafazowej od bieguna [35]. Wskazuje to, że w monopolarnym wrzecionie siła generowana w związku z polimeryzacją tubuliny na końcach plus kMT ma znaczenie dla ruchu AP kinetochoru. Zapewne jest to bardzo słaba siła, może ona jednak odgrywać rolę w ruchach chromosomów, gdy brak dużych sił przeciwnie skierowanych, jakie występują w bipolarnie połączonej parze kinetochorów.

Siły rozsuwające bieguny wrzeciona

W poprzedniej części wskazano, że siły generowane w parze kinetochorów z udziałem kMT w kierunku ich końców ujemnych mogą osiągać stosunkowo dużą wielkość. Siły te, gdy działają, muszą przenosić się poprzez kMT na bieguny wrzeciona (prawo reakcji) usiłując zbliżyć je do siebie [21]. Istotnie, od dawna wiadomo było o istnieniu sił działających na bieguny do wewnątrz wrzeciona, na tej podstawie, że wrzeciono ulegało skracaniu się, gdy MT przyłączały się do kinetochorów. Siły te muszą być kompensowane przez siły działające na bieguny w kierunku przeciwnym.

Dane eksperymentalne wskazują na istnienie dwu mechanizmów rozsuwania biegunów uformowanego wrzeciona: rozpychanie [29] i ciągnięcie biegunów [1].

Jeden z pierwszych dowodów na działanie sił ciągnących bieguny w anafazie B pochodzi z obserwacji, że u *Fusarium* szybkość rozsuwania biegunów wzrasta, gdy uszkodza się centralną część wrzeciona za pomocą mikrochirurgii laserowej [1]. Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach nad komórkami ssaków [2]. W komórkach płuca traszki, w hodowli *in vitro*, bieguny wrzeciona kontynuują rozsuwanie się, gdy ich niekinetochorowe MT już nie zachodzą antyrównoległymi końcami [78]. Siły ciągnące bieguny, a generowane z udziałem MT, kinezyiny i dyneiny (i podobnych im białek) odgrywają podstawową rolę w orientacji wrzeciona mitotycznego [76], a tym samym w orientacji podziałów komórkowych.

Na istnienie sił rozpychających bieguny wskazują eksperymenty z izolowanymi wrzecionami okrzemek i drożdży, w których udało się reaktywować wydłużanie, mimo że nie było MT astralnych [13,46]. W generowaniu sił rozpychających bieguny

ważną rolę odgrywają MT zachodzące antyrównolegle między siebie. Świadczy o tym dobitnie znany eksperyment Leslie i Pickett-Heapsa [41] na wrzecionach okrzemki, gdzie kinetochorowe i niekinetochorowe MT są przestrzennie rozdzielone; naświetlenie strefy zajętej przez MT niekinetochorowe wiązką światła ultrafioletowego powodowało zapadanie się wrzeciona.

Trójwymiarowe rekonstrukcje wrzeciona na podstawie badań elektronowo-mikroskopowych drożdży [16], komórek PTK [45] i okrzemek [50] pokazują, że w czasie oddalania się biegunów w anafazie B skróceniu ulega region zachodzenia pomiędzy siebie MT niekinetochorowych. Interpretowane jest to jako skutek działania sił generowanych w tym regionie z udziałem białka motorycznego typu kinazy. Białka takie poznano na podstawie badań mutantów. Ogon takiego białka przyczepia się do MT, zaś motoryczna „głowa” oddziałując z przeciwnie skierowaną MT powoduje przesuwanie się końców dodatnich ku sobie [20].

CZEMU SŁUŻY GENEROWANIE DUŻYCH SIŁ W KINETOCHORACH; NAPRĘŻENIA MECHANICZNE WYWOŁYWANE TYMI SIŁAMI

Generowanie dużych sił we wczesnej anafazie może być uzasadnione na podstawie mechanizmu rozdzielania zaplecionych chromatyd. Do rozdzielania takich chromatyd konieczne jest przerwanie jednej z podwójnej helisy DNA, a następnie połączenie nowoutworzonych końców. Taki proces umożliwia topoizomeraza DNA typu II (topo II) [44,30] we wczesnej anafazie, gdy siostrzane chromatydy (stające się chromosomami) są przesuwane do przeciwnych biegunów wrzeciona. Zachodzi wtedy sprzężenie działalności topo II i ruchów chromosomów, w którym:

(a) lokalna prędkość „przenikania” helisy z udziałem topo II powinna być nie mniejsza niż prędkość przesuwania się jednej chromatydy względem drugiej w anafazie, bowiem siła F_{\max} , która przewyższa siłę zdolną rozerwać podwójną helisę, powodowałaby mechaniczne rozrywanie DNA, gdyby topo II nie nadążała w likwidacji naprężenia w helisach [17];

(b) siła potrzebna do rozdzielania dwu chromatyd z udziałem topo II, równa iloczynowi liczby zapleceń i siły potrzebnej do likwidacji pojedynczego zaplecenia, jest bliska F_{\max} [36].

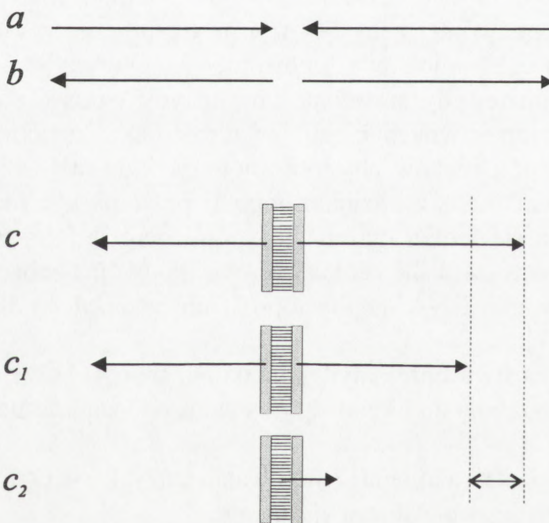
Zapewne jest wiele racji w takim uzasadnieniu generowania dużych sił przez kinetochory, ale, wydaje się, że nie jest to pełne wyjaśnienie.

Jak już wspomniano, istnieją bezpośrednie dowody eksperymentalne na to, że równie duże siły, jak F_{\max} zmierzone na początku anafazy, generowane są również wcześniej w mitozie, gdy nie dochodzi jeszcze do likwidacji zaplecenia podwójnych helisy DNA. Mamy aktualnie dobre eksperymentalne podstawy do twierdzenia, że

te duże siły generowane przez kinetochory, a przeciwnie skierowane pełnią inne jeszcze funkcje niż tylko likwidowanie zaplecenia helis DNA z udziałem topo II, wywołują naprężenie rozciągające w parach kinetochorów i w więzach łączących te pary, które zmienia chemizm kinetochorów.

Jeżeli tak duże siły jak F_{\max} działają na siostrzane (względnie homologiczne) kinetochory w kierunkach P, a kinetochory są ze sobą połączone, to przeciwnie skierowane siły ulegają kompensacji powodując powstanie naprężania rozciągającego w kinetochorach i włóknach kinetochorowych. Wiemy, że aż do anafazy, kinetochory połączone są kohezyjnie w centromerze, zaś po zaniku kohezji, istnieje jeszcze przez jakiś czas w anafazie połączenie zaplecionymi ramionami chromatyd. Motory kinetochorowe działają na podobieństwo czołgów poruszających się w przeciwnych kierunkach, ale zaczepionych między sobą. Nicklas i Koch [59] jako pierwsi zaczęli badać naprężenie rozciągające we wrzecionie mitotycznym i jego rolę w rozdzielaniu chromosomów.

Wyróżniamy naprężenia normalne, wywoływane przez siły prostopadłe do rozważanej powierzchni, i naprężenia ścinające, w których siły są styczne. Dalsze rozważania dotyczyć będą wyłącznie naprężeń normalnych. Są dwa rodzaje tych naprężeń: rozciągające i ściskające. Siły wywołujące naprężenie przedstawiamy jako dwie siły równe co do wielkości, ale skierowane przeciwnie od siebie – w przypadku naprężenia rozciągającego – lub do siebie – w przypadku naprężenia



RYSUNEK 5. Schemat ilustrujący siły wywołujące naprężenie: *a* – siły ściskające, *b* – siły rozciągające, *c* – siły działające na parę kinetochorów, z podziałem na siły rozciągające (*c*₁) i powodujące ruch (*c*₂)

ściskającego (rys. 5). Jeżeli jedną z sił potraktujemy jako siłę reakcji, to druga siła jest siłą rozciągającą albo ściskającą. Jeżeli na ciało swobodne, znajdujące się w ośrodku lepkiem, działają dwie siły przeciwnie skierowane, ale przyłożone do dwu punktów ciała tak, że nie leżą na jednej linii, to ciało najpierw doznaje obrotu, dopóki siły nie znajdą się na jednej linii, a następnie pojawia się naprężenie rozciągające lub ściskające. Jeżeli te dwie siły nie są równe co do wielkości, to siła naprężenia równa jest mniejszej z dwu sił, zaś różnica określa prędkość ruchu ciała w ośrodku (rys. 5).

Niemal zawsze na chromosom względnie bivalent działają siły

mitotyczne skierowane w przeciwnych kierunkach. Przede wszystkim są to stosunkowo duże siły P generowane w kinetochorach wywołujące w bipolarnej zorientowanej parze kinetochorów naprężenie rozciągające. Gros tych sił kompensuje się tworząc naprężenie rozciągające w kinetochorach, a tylko mała część, równa różnicy wielkości sił, niekiedy zero, porusza parę kinetochorów. Na ruch takiej pary mogą mieć wpływ dodatkowe słabe siły, takie jak siły wypychania biegunowego, które wzajemnie kompensują się tylko w pobliżu płaszczyzny równikowej. W bipolarnej orientacji, maksimum naprężenia w kinetochorach wystąpi wtedy, gdy zostanie przyłączona pełna liczba mikrotubul; jest to stan charakteryzujący metafazę albo wczesną anafazę.

W monopolarnej orientacji, przeciwnie skierowane siły nie mogą osiągnąć znacznych wielkości, bowiem jedna z sił – siła wypychania biegunowego – jest stosunkowo słaba. Gdy w profazie jeden kinetochor przyłączy pierwszą mikrotubulę i chromosom zaczyna przesuwać się ku biegunowi, działa również przeciwnie skierowana siła wypychania polarnego. Ponieważ wypadkowa sił wypychania na ogół przyłożona jest do punktu poza kinetochorem, chromosom doznaje najpierw obrotu. Siła rozciągania jest równa sile wypychania biegunowego, gdy monopolarnie przyłączony chromosom porusza się ku biegunowi (siła wypychania jest wtedy tą mniejszą siłą określającą naprężenie), albo jest równa sile P , gdy chromosom porusza się ku równikowi. Nie wiemy jednak, jak wielka jest siła P w monopolarnej orientacji w profazie z udziałem jednej MT w kinetochorze. Prawdopodobnie jest mniejsza niż F_{\max} przypadająca na jedną MT na początku anafazy.

KINETOCHORY SĄ WRAŻLIWE NA NAPRĘŻENIE, A ICH NAPRĘŻENIE KONTROLUJE METAFAZOWY PUNKT KONTROLNY CYKLU KOMÓRKOWEGO

Od dawna wiadomo, że przejście od metafazy do anafazy następuje wtedy, gdy wszystkie pary kinetochorów są przyłączone bipolarnie, co normalnie wyraża się symetrycznym układem par względem płaszczyzny równikowej [11,81]. Nawet pojedynczy chromosom opóźnia anafazę tak długo, jak długo jest przyłączony do jednego tylko bieguna [69,75]. Istnieje punkt kontrolny cyklu mitotycznego blokujący przejście do anafazy, zwany *spindle assembly checkpoint* [53] albo *chromosome distribution checkpoint* [43]. W niniejszym artykule będzie on nazywany metafazowym punktem kontrolnym, co jednak nie powinno sugerować, że jest to jedyny z punktów kontrolnych w metafazie. Metafazowy punkt kontrolny blokuje przejście do anafazy A, gdy brak właściwego przyłączenia do wrzeciona, czyli jest aktywowany negatywnie [22]. Na jakiej zasadzie sprawdzane jest właściwe przyłączenie chromosomów do wrzeciona?

Zauważmy najpierw, że tylko w kinetochorach zorientowanych bipolarnie mogą być generowane duże siły bez szybkich ruchów. W tej orientacji duże siły powodują duże naprężenie rozciągające w parze kinetochorów. Natomiast w przypadku monopolarnej orientacji, duże naprężenie nie może wystąpić. Zatem orientacja kinetochorów może być sprawdzana i korygowana na zasadzie naprężenia. Jeżeli występuje duże naprężenie (w sytuacji, gdy kinetochory są zdolne generować duże siły P), to orientacja jest bipolarna. Jeżeli dużego naprężenia nie ma, powinna nastąpić korekcja orientacji.

Wysunięto hipotezę, że metafazowy punkt kontrolny sygnalizowany jest negatywnie przez brak naprężenia w kinetochorach (brak naprężenia → nie ma przejścia do anafazy) [49,69]. Tę hipotezę potwierdzono eksperymentalnie, zastępując mitotyczne siły siłą przyłożoną za pomocą igły sterowanej mikromanipulatorem. Mianowicie, w spermatocytach u modliszki, trzy chromosomy płciowe normalnie koniugują tworząc triwalent, w którym środkowy chromosom Y połączony jest z jednym biegunem, a dwa chromosomy X z drugim biegunem. Niekiedy tworzy się biwalent i uniwalent (ten ostatni połączony tylko z jednym biegunem). Taki uniwalent powoduje znaczne opóźnienie przejścia w anafazę. Jednak jeżeli uniwalent zostanie przytrzymany igłą, aby wywołać w nim naprężenie rozciągające, anafaza następuje bez zwłoki; naprężenie sygnalizuje do punktu kontrolnego, że anafaza może się zaczynać [42]. W jaki sposób?

Kilka rodzajów danych eksperymentalnych wskazuje, że defosforylacja białek kinetochoru ma istotne znaczenie dla metafazowego punktu kontrolnego. Niektóre mutanty grzybów i muszki owocowej z zaburzoną aktywnością fosfatazy charakteryzują się zatrzymywaniem cyklu komórkowego w metafazie. Komórki ssaków wykazują zaburzenia przebiegu mitozy pod wpływem kwasu okadaioowego, który jest inhibitorem fosfatazy.

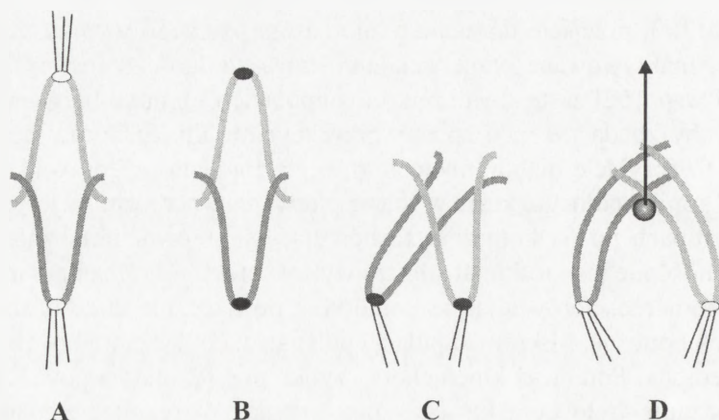
Gorbsky i Ricketts [23] zidentyfikowali w komórkach ssaków (kultura Ptk1) różnice w fosforylacji kinetochorów, w różnych stadiach kongresji, stosując przeciwciało 3F3 [14]. Przeciwciało to rozpoznaje pewne białka kinetochoru (jak również inne białka), gdy są one ufosforylowane. Białka kinetochorowe przed kongresją są wykrywalne za pomocą 3F3 znakowanego fluorochromem, dając wyraźne świecenie w mikroskopie fluorescencyjnym. Natomiast kinetochory, które zakończyły kongresję, nie wiążą przeciwciała. Jednak kinetochory chromosomów „zagubionych” w kongresji (powodujących przedłużanie metafazy) wiążą przeciwciało. Wynika z tego, że przed kongresją białka kinetochorowe są ufosforylowane, zaś w trakcie kongresji ulegają defosforylacji [23].

Chromosomy, których kinetochory siostrzanych chromatyd są połączone tylko z jednym biegunem, dają reakcję immunochemiczną z 3F3, a zarazem blokują przejście do anafazy. Taki stan trwa, dopóki nie nastąpi korekcja orientacji kinetochorów [22]. Jeżeli jednak przed korekcją wstrzyknięte zostaną do komórki

przeciwiała 3F3, przejście do anafazy nie nastąpi, z czego wynika, że białka kinetochorów, inaktywowane przeciwciałami, tracą zdolność defosforylacji [12].

Nicklas i wsp. [62] zastosowali mikromanipulację i immuno-barwienie przy pomocy 3F3, aby zbadać, w jaki sposób przyczepianie kinetochorów do wrzeciona wpływa na fosforylację białka kinetochorowego. Badania przeprowadzili na spermatocytach konika polnego, które w czasie pierwszego podziału mejotycznego występują w grupach po 64 komórek, zachowujących się synchronicznie. Mimo że synchroniczność nie jest doskonała, łatwo wykryć efekt mikromanipulacji na manipulowanej komórce, porównując tę komórkę z dostatecznie dużą liczbą komórek stanowiących kontrolę. Mikromanipulacja polegała na odłączaniu biwalentu od biegunów wrzeciona. Ponieważ kinetochory szybko przyłączają na powrót MT wrzeciona, odłączanie było co jakiś czas powtarzane. W rezultacie manipulowany biwalent, mimo że średnio w czasie mógł być połączony z jednym albo nawet z dwoma biegunami nielicznymi MT, pozostawał bez naprężenia. Gdy stan taki wywoływano na 8,6 min (średnio) lub krócej, przed wstąpieniem komórek w anafazę, zwłoki w anafazie nie było. Jeżeli wywoływano go wcześniej, zwłoka była bardzo długa. Oznacza to, że brak przyłączenia musi trwać średnio 8,6 min, aby powodowany nim sygnał zadziałał blokująco na metafazowy punkt kontrolny. Przeprowadzono również immuno-barwienie kinetochorów stosując 3F3 sprzężony z fluorochromem. Odczepione kinetochory wykazywały silną fluorescencję wtedy, gdy kinetochory niemanipulowanych biwalentów już nie świeciły. Z wcześniejszych badań [23] wiadomo było, że zanik fluorescencji spowodowany jest defosforylacją białek kinetochorów. Aby sprawdzić, czy defosforylacja jest odwracalna, odczepiano chromosomy, które osiągnęły stan metafazowy (diakineza), a których kinetochory przed odczepieniem były defosforylowane (rys. 6 A). Po co najmniej 5 minutach od odczepienia, a zawsze po 10 minutach następowała refosforylacja, czyli metafazowa defosforylacja jest odwracalna (rys. 6 B). Aby zbadać znaczenie naprężenia dla defosforylacji, odczepiano od wrzeciona biwalent w momencie, gdy uzyskał stan metafazowy. Igiełką manipulatora przytrzymywano go przez 10 minut tak, aby oba kinetochory były blisko jednego bieguna, co powodowało ich przyłączenie się do MT z tego bieguna (monopolarna orientacja) (rys. 6 C). Następnie taki biwalent wprowadzano w stan naprężenia odciągając go igłą od bieguna, z którym był połączony (rys. 6 D). Po 6 minutach trwania tego stanu następowała defosforylacja białek kinetochorów naciąganego biwalentu, podczas gdy w nienaciąganych kinetochorach w monopolarnej orientacji białka były ufosforylowane. Stanowi to bezpośredni dowód na to, że czynnikiem wywołującym defosforylację jest naprężenie kinetochorów [62].

W spermatocytach konika polnego występuje pojedynczy chromosom płciowy X. Chromosom ten w mejozie-I przyłącza się do jednego tylko bieguna, a więc jego kinetochor pozostaje nienaprężony, a mimo to nie hamuje on przejścia do anafazy. Okazuje się, że białka kinetochorowe tego chromosomu są stale defo-



RYSUNEK 6. Schemat eksperymentu Nicklas i wsp. (62) z mikromanipulacją i barwieniem kinetochorów za pomocą 3F3 w spermatocytach konika polnego: A – bivalent tuż przed anafazą, kinetochory nie wiążą 3F3 (ich białka uległy defosforylacji), co zaznaczono niewypełnieniem elips symbolizujących kinetochory; B – bivalent odłączony mikrochirurgicznie od biegunów wrzeciona, kinetochory wiążą 3F3 (białka ponownie ufosforylowane), co zaznaczono wypełnieniem elips symbolizujących kinetochory; C – bivalent przysunięty igiełką mikromanipulatora do jednego z biegunów, tak że oba kinetochory przyłączają mikrotubule z tego bieguna (połączenie monopolarne); białka kinetochoru ufosforylowane; D – bivalent jak w C, ale naciągany igłą mikromanipulatora w kierunku od bieguna (strzałka), białka defosforylowane

sforylowane, nic więc dziwnego, że chromosom X nie jest dostrzegany przez metafazowy punkt kontrolny [62].

Podobne mikromanipulacyjne i immunocytochemiczne badania jak na spermatocytach konika polnego przeprowadzono na spermatocytach modliszki [43], o których wiadomo było z wcześniejszych badań [42], że metafazowy punkt kontrolny przejścia do anafazy jest wrażliwy na naprężenie kinetochorów. Potwierdzono wniosek, że naprężenie przyłożone igłą mikromanipulatora powoduje defosforylację białek kinetochorowych [43,58].

Jak już wspomniano, w spermatocytach modliszki występują trzy chromosomy płciowe $2X + Y$. Tworzą one triwalent, w którym Y znajduje się w środku i jest połączony z jednym biegunem, zaś dwa chromosomy X są połączone z drugim biegunem. U modliszki białka kinetochorów z chromosomów płciowych są w profazie ufosforylowane (inaczej niż u konika polnego). W metafazie, w triwalencie prawidłowo zaczepionym we wrzecionie, kinetochory są defosforylowane. Niekiedy jednak zdarza się, że jeden z chromosomów X występuje jako uniwalent i jego kinetochor pozostaje ufosforylowany, mimo że stan pozostałych chromosomów jest normalny dla metafazy. Wtedy przejście do anafazy jest zablokowane [42]. Takie przypadki stanowią naturalny eksperyment, w którym brak naprężenia w kinetochorze i spowodowany tym brak defosforylacji, stanowi negatywny sygnał dla metafazowego punktu kontrolnego.

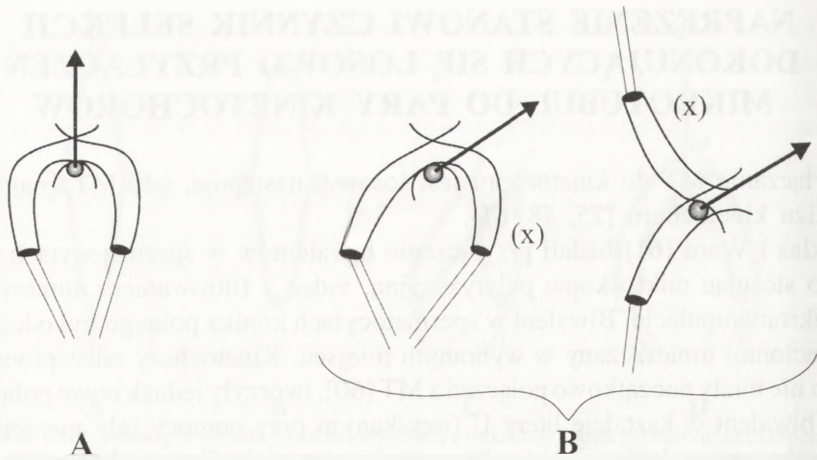
NAPRĘŻENIE STANOWI CZYNNIK SELEKCJI DOKONUJĄCYCH SIĘ LOSOWO PRZYŁĄCZEŃ MIKROTUBUL DO PARY KINETOCHORÓW

Przyłączanie MT do kinetochoru jest losowe; następuje, gdy MT znajdzie się w pobliżu kinetochoru [25, 48, 61].

Nicklas i Ward [61] badali przyłączanie biwalentów w spermatocytach konika polnego stosując mikroskopię polaryzacyjną, video z filtrowaniem numerycznym oraz mikromanipulację. Biwalent w spermatocytach konika polnego był odłączony od wrzeciona i umieszczany w wybranym miejscu. Kinetochory odłączonego biwalentu nie miały początkowo połączeń z MT [60], tworzyły jednak nowe połączenia. Jeżeli biwalent w kształcie litery U (uzyskany przy pomocy igły manipulatora) z kinetochorami na końcach U (z chiasmami w części środkowej) był umieszczany w pobliżu bieguna, tak aby kinetochory były do niego zwrócone, to przyłączał MT z tegoż bieguna obu kinetochorami (monopolarne połączenie). Takie przyłączenie było nietrwałe. Jeżeli jednak w monopolarnie połączonym biwalencie wywołano naprężenie odciągając biwalent igłą mikromanipulatora od bieguna i naprężenie to było symetryczne względem obu kinetochorów, to monopolarne połączenie pozostawało trwałe tak długo, jak długo biwalent był naprężony (rys. 7 A). Bezpośrednio po zwolnieniu naprężenia połączenie było monopolarne, ale o pewnym czasie jeden z kinetochorów był przyłączony do MT z drugiego bieguna. Oznacza to, że w tym czasie musiało nastąpić zwolnienie poprzedniego przyłączenia i utworzenie nowego. Jeżeli przyłożone naprężenie było silnie asymetryczne (ze względu na umieszczenie igły i kierunek pociągania, rys. 7 B), to słabo naciągany kinetochor tracił poprzednie przyłączenie i tworzył nowe z MT drugiego bieguna jeszcze w trakcie naprężania, zaś silniej naprężony kinetochor trwał w pierwotnym przyłączeniu (rys. 7 C) [4,61]. Nie ulega więc wątpliwości, że występuje nie tylko przyłączanie kinetochorów do MT, ale również proces odwrotny oraz że naprężenie stabilizuje przyłączenie.

Kinetochor nie ma żadnej predyspozycji do MT z któregoś z biegunów. Świadczą o tym wspomniane już badania nad zachowaniem się fragmentów chromosomów, z których każdy ma tylko jeden kinetochor [38]. Taki pojedynczy kinetochor jest ostatecznie przyłączony do dwu wiązek MT, każda z innego bieguna, przy czym końce MT z obu wiązek nie są poprzeczpiane do kinetochoru na chybił-trafił, ale tworzą dwie oddzielne domeny na powierzchni kinetochoru (rys. 4 E) [38]. Trudno wyobrazić sobie, że te domeny mogły utworzyć się inaczej jak na zasadzie losowego przyłączania MT z obu biegunów i odłączania selekcyjonowanego na tej zasadzie, że przyłączenie zwiększające naprężenie rozciągające było trwalsze.

Jak już o tym była mowa, chromosom, którego kinetochor przyłączy w profazie pierwszą MT, przesuwa się w kierunku bieguna ze stosunkowo dużą prędkością.



RYSUNEK 7. Schemat eksperymentu Nicklas i Warda [61] z zastosowaniem mikromanipulacji do biwalentu w spermatocytach konika połnego i sprawdzaniu trwałości połączenia: A – biwalent w połączeniu monopolarnym naciągany igiełką w kierunku od bieguna (połączenie trwałe w czasie naciągania); B – jak w A, ale z asymetrią naciągania; słabiej naciągnięty kinetochor (x) odłącza się od bieguna, z którym był pierwotnie połączony i przyłącza się do drugiego bieguna

Z poprzednich rozważań wynika, że jest to możliwe z punktu widzenia wielkości siły P generowanej w oddziaływaniu kinetochoru z pojedynczą MT. Duża prędkość jest wtedy tym bardziej możliwa, bowiem kinetochor jest przyłączony do boku MT i ruch kinetochoru nie jest ograniczany szybkością depolimeryzacji MT, jak to ma miejsce, gdy końce MT znajdują się w kinetochorze. Chromosom po przyłączeniu pierwszej MT zatrzymuje się przed dotarciem do bieguna, bowiem siły P generowanej w kinetochorze przeciwstawiają się siły wypychania polarnego. W miarę, jak chromosom zbliża się do bieguna, siła ta rośnie i chromosom musi zatrzymać się, co oznacza, że siły wypychania biegunowego dorównują sile P. Wynika stąd, że mimo monopolarnej orientacji w kinetochorze może powstać pewne naprężenie rozciągające. To naprężenie może stabilizować monopolarne przyłączenie pierwszej MT do kinetochoru. Drugi kinetochor danej pary skierowany jest wtedy ku biegunowi przeciwnemu. Istnieje więc duża szansa, że przyczepi on MT z tego bieguna. Gdy to nastąpi, kinetochory rozważanego chromosomu są w początkowym połączeniu bipolarnym. Prawdopodobieństwo przyłączenia dalszych MT, tak że ta początkowa bipolarna orientacja ulega wzmocnieniu, jest zwiększone przez postępującą kondensację chromatyny. Skracaniu się ramion chromosomów towarzyszy pogłębianie się centromerowego przewężenia, które zmniejsza kąt widzenia kinetochoru; zagłębienie centromerowe z kinetochorem na dnie jest otwarte od strony jednego tylko bieguna i przyłączane MT pochodzą głównie z tego bieguna [61,59].

LITERATURA

- [1] AIST JR, BERNS MW. Mechanics of chromosome separation during mitosis of *Fusarium (Fungi imperfecti)*: new evidence from ultrastructural and laser microbeam experiments. *J Cell Biol* 1981; **91**: 446–458.
- [2] AIST JR, LIANG H, BERNS MW. Astral and spindle forces in mitotic PtK₂ cells. A laser microbeam study. *J Cell Sci* 1993; **104**: 1207–1216.
- [3] ALEXANDER SP, RIEDER CL. Chromosome motion during attachment to the vertebrate spindle: initial saltatory-like behavior of chromosomes and a quantitative analysis of force production by nascent kinetochore fibers. *J Cell Biol* 1991; **113**: 805–815.
- [4] AULT JG, NICKLAS RB. Tension, microtubule rearrangements, and the proper distribution of chromosomes in mitosis. *Chromosoma* 1989; **98**: 33–39.
- [5] AULT JG, DeMARCO AJ, SALMON ED, RIEDER CL. Studies on the ejection properties of asters: astral microtubules turnover influences the oscillatory behavior and positioning of mono-oriented chromosomes. *J Cell Sci* 1991; **99**: 701–710.
- [6] BAJER AS. Functional autonomy of monopolar spindle and evidence for oscillatory movement in mitosis. *J Cell Biol* 1982; **93**: 33–48.
- [7] BARDHAN A. Sister chromatid cohesion during meiosis: Differential mechanisms for arms and centromere coherence. *Current Sci* 1997; **72**: 376–382.
- [8] BICKEL SE, ORR-WEAVER TL. Holding chromatids together to ensure they go their separate ways. *BioEssays* 1996; **18**: 293–300.
- [9] BLASKIN TI, CANDE WZ. The structure and function of the mitotic spindle in flowering plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1990; **41**: 277–315.
- [10] BRINKLEY BR, STUBBLEFIELD E. The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell *in vitro*. *Chromosoma (Berl.)* 1996; **19**: 28–43.
- [11] CALLAN HG, JACOBS PA. The meiotic process in *Mantis religiosa* L males. *J Gene* 1957; **55**: 200–217.
- [12] CAMPBELL MS, GORBSKY GJ. Microinjection of mitotic cells with the 3F3/2 antiphosphoepitope antibody delays the onset of anaphase. *J Cell Biol* 1995; **129**: 1195–1204.
- [13] CANDE WZ, McDONALD KL. *In vitro* reactivation of anaphase spindle elongation using isolated diatom spindles. *Nature (Lond)*. 1995; **316**: 168–170.
- [14] CYERT MS, SCHERSON T, KIRSCHNER MW. Monoclonal antibodies specific for thiophosphorylated proteins recognizes *Xenopus* MPF. *Dev Biol* 1988; **129**: 209–216.
- [15] DESAI A, MITCHISON TJ. A new role for motor proteins as couplers in depolymerizing microtubules. *J Cell Biol* 1995; **128**: 1–4.
- [16] DING R, McDONALD KL, MCINTOSH JR. Three-dimensional reconstruction and analysis of mitotic spindle from the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* 1993; **120**: 141–151.
- [17] DUPLANTIER B, JANNIK G, SIKORAV J-L. Anaphase chromatid motion: involvement of type II topoisomerases. *Biophys J* 1995; **69**: 1596–1605.
- [18] FORER A. Do anaphase chromosomes chew their way to the pole or are they pulled by actin? *J Cell Sci* 1988; **91**: 449–453.
- [19] FUGE H. Traction fibres in chromosome movement: the pros and cons. *Biol Cell* 1989; **66**: 209–213.
- [20] FULLER MT, WILSON PG. Force and counterforce in the mitotic spindle. *Cell* 1992; **71**: 547–550.
- [21] GAGLIO T, DIONNE MA, COMPTON DA. Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. *J Cell Biol* 1997; **138**: 1055–1066.
- [22] GORBSKY GJ. Kinetochores, microtubules and the metaphase checkpoint. *Trends Cell Biol* 1995; **5**: 143–148.

- [23] GORBSKY GJ, RICKETTS WA. Differential expression of a phosphoepitope at the kinetochores of moving chromosomes. *J Cell Biol* 1993; **122**: 1311–1321.
- [24] HARTWELL LH, WEINERT TA. Checkpoints controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; **246**: 629–634.
- [25] HAYDEN JH, BOWSER SS, RIEDER CI. Kinetochores capture astral microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1039–1045.
- [26] HAYS TS, WISE D, SALMON ED. Traction force on a kinetochore at metaphase acts as a linear function of kinetochore fiber length. *J Cell Biol* 1982; **93**: 374–382.
- [27] HAYS TS, SALMON ED. Poleward force at the kinetochore in metaphase depends on the number of kinetochore microtubules. *J Cell Biol* 1990; **110**: 391–404.
- [28] HEALD R, TOURNEBIZE R, HABERMANN A, KARSENTI E, HYMAN A. Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J Cell Biol* 1997; **138**: 615–628.
- [29] HOGAN CJ, CANDE WZ. Antiparallel microtubule interactions: spindle formation and anaphase B. *Cell Motil Cytoskel* 1990; **16**: 99–103.
- [30] HOLM C. Coming undone: how to entangle a chromosome. *Cell* 1994; **77**: 955–957.
- [31] HYMAN AA, MITCHISON TJ. Two different microtubule-based motor activities with opposite polarities in kinetochores. *Nature (Lond.)* 1991a; **351**: 206–211.
- [32] HYMAN AA, MITCHISON TJ. Regulation of the direction of chromosome movement. *Cold Spring Harbor Sympo Quant Biol* 1991b; **56**: 745–750.
- [33] HYMAN AA, MITCHISON TJ. Molecular basis of chromosome movement. *Curr Opin Struct Biol* 1992; **2**: 275–279.
- [34] INOUE S. Cell division and the mitotic spindle. *J Cell Biol* 1981; **91**: 131s–147s.
- [35] ITO K, MASUDA M, FUJIWARA K, SATO H. Do astral microtubules play a role in metaphase chromosome positioning? *Biol Cell* 1994; **82**: 95–102.
- [36] JANNIK G, DUPLANTIER B, SIKORAV JL. Forces on chromosomal DNA during anaphase. *Biophys J* 1996; **71**: 451–465.
- [37] KHODIAKOV A, RIEDER CL. Kinetochores moving away from their associated pole do not exert a significant pushing force on the chromosome. *J Cell Biol* 1996; **135**: 315–327.
- [38] KHODJAKOV A, COLE RW, McEVEN BF, BUTTLE KF, RIEDER CL. The chromosome fragments possessing only one kinetochore can congress to the spindle equator. *J Cell Biol* 1997; **136**: 229–240.
- [39] KURIYAMA R, NISLOW C. Molecular components of the mitotic spindle. *BioEssays* 1992; **14**: 81–88.
- [40] LESLIE RJ. Chromosome attain a metaphase position on half-spindles in the absense of an opposing spindle pole. *J Cell Sci* 1992; **103**: 125–130.
- [41] LESLIE RJ, PICKETT-HEAPS JD. *J Cell Biol* 1983; **96**: 548–561.
- [42] LI X, NICKLAS RB. Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature (Lond.)* 1995; **373**: 630–632.
- [43] LI X, NICKLAS RB. Tension-sensitive kinetochore phosphorylation and the chromosome distribution checkpoint in praying mantid spermatocytes. *J Cell Sci* 1997; **110**: 537–546.
- [44] LOMBILLO VA, STEWART RJ, McINTOSH R. Minus-end-directed motion of kinesin-coated microspheres driven by microtubule depolymerization. *Nature (Lond.)* 1995; **373**: 161–164.
- [45] MASTRONARDE DN, McDONALD KL, DING R, McINTOSH JR. Interpolar spindle microtubules in PTK cells. *J Cell Biol* 1993; **123**: 1475–1489.
- [46] MASUDA H, HIRANO T, YAMAGIDA M, CANDE WZ. *In vitro* reactivation of spindle elongation in fission yeast muc2 mutant cells. *J Cell Biol* 1990; **110**: 417–425.

- [47] McEWEN BF, ARENA JT, FRANK J, RIEDER CL. Structure of the colcemid treated PtK kinetochore over plate as determined by high voltage electron microscopic tomography. *J Cell Biol* 1993; **120**: 301–312.
- [48] McEVAN BF, HEAGLE AB, CASSELS GO, BUTTLE KF, RIEDER CL. Kinetochore fiber maturation in PtK₁ cells and its implications for the mechanisms of chromosome congression and anaphase onset. *J Cell Biol* 1997; **137**: 1567–1580.
- [49] McINTOSH JR. Structural and mechanical control of mitotic progression. *Cold Spring Harbor Sympo Quant Biol* 1991; **56**: 613–619.
- [50] McINTOSH JR, McDONALD KL, EDWARDS MK, ROSS BM. Three-dimensional structure of the central mitotic spindle of *Diatoma vulgare*. *J Cell Biol* 1979; **83**: 428–442.
- [51] McINTOSH JR, PFARR CM Mitotic motors. *J Cell Biol* 1991; **115**: 577–586.
- [52] MITCHISON TJ, SALMON ED. Poleward kinetochore fiber movement occurs during both metaphase and anaphase-A in newt lung cell mitosis. *J Cell Biol* 1992; **119**: 569–582.
- [53] MURRAY A Cell cycle-checkpoints. *Curr. Opinion Cell Biol* 1994; **6**: 872–876.
- [54] NIKLAS RB Chromosome velocity during mitosis as functions of size and position. *J Cell Biol* 1965; **25**: 119–135.
- [55] NICKLAS RB. Measurement of the force produced by the mitotic spindle in anaphase. *J Cell Biol* 1983; **97**: 542–548.
- [56] NIKLAS RB The forces that move chromosomes in mitosis. *Annu Rev Biophys Chem* 1988; **17**: 431–449.
- [57] NICKLAS RB. The motor for poleward chromosome movement in anaphase is in or near the kinetochore. *J Cell Biol* 1989; **109**: 2245–2255.
- [58] NICKLAS RB. How cells get the right chromosomes. *Science* 1997; **275**: 632–637.
- [59] NICKLAS RB, KOCH CA. Chromosome micromanipulations III. Spindle fiber tension and the reorientation of mal-oriented chromosomes. *J Cell Biol* 1969; **43**: 40–50.
- [60] NICKLAS RB, KUBAI DF. Microtubules, chromosome movement, and reorientation after chromosome are detached from the spindle by micromanipulation. *Chromosoma (Berl.)* 1985; **92**: 313–324.
- [61] NICKLAS RB, WARD SC. Elements of error correction in mitosis; microtubule capture, release and tension. *J Cell Biol* 1994; **126**: 1241–1253.
- [62] NICKLAS RB, WARD SC, GORBSKY GJ. Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *J Cell Biol* 1995; **130**: 929–939.
- [63] ÖSTERGREN G. The mechanism of co-orientation in bivalents and multivalents. The theory of orientation by pulling. *Hereditas* 1951; **37**: 85–156.
- [64] PFARR CM, COUE M, GRISSOM PM, HAYS TS, PORTER ME, MCINTOSH JR. Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis. *Nature (Lond.)* 1990; **345**: 263–265.
- [65] PICKETT-HEAPS JD. Mitotic mechanisms: an alternative view. *Trends Biochem Sci* 1986; **11**: 504–508.
- [66] RIEDER CL. Mitosis: towards a molecular understanding of chromosome behavior. *Curr Opin Cell Biol* 1991; **3**: 59–66.
- [67] RIEDER CL, DAVISON A, JENSEN C, CASSIMERIS L, SALMON ED. Oscillatory movements of monooriented chromosomes, and their position relative to the spindle pole, result from ejection properties of the aster and half spindle. *J Cell Biol* 1986; **103**: 581–591.
- [68] RIEDER CL, SALMON ED. Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *J Cell Biol* 1994; **124**: 223–233.
- [69] RIEDER CL, SCHULTZ A, COLE R, SLUDER G. Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J Cell Biol* 1994; **127**: 1301–1310.
- [70] SAWIN KE, LeGUELLEC K, PHILLIPPE M, MITCHISON TJ. Mitotic spindle organization by plus-end-directed microtubule motor. *Nature (Lond.)* 1992; **359**: 540–543.

- [71] SAWIN KE, ENDOW SA. Meiosis, mitosis and microtubule motors. *BioEssays* 1993; **15**: 399–407.
- [72] SHELBY RD, VAFA O, SULLIVAN KF. Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *J Cell Biol* 1997; **136**: 501–513.
- [73] SKIBBENS RV, SKEEN VP, SALMON ED. Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: a push-pull mechanism. *J Cell Biol* 1993; **122**: 859–875.
- [74] SKIBBENS RV, RIEDER CL, SALMON ED. Kinetochore motility after severing between sister centromeres using laser microsurgery: evidence that kinetochore directional instability and position is regulated by tension. *J Cell Sci* 1995; **108**: 2537–2548.
- [75] SLUDER GF, MILLER J, THOMPSON EA, WOLF DE. Feedback control of the metaphase-anaphase transition in sea urchin zygotes: role of maloriented chromosomes. *J Cell Biol* 1994; **126**: 189–198.
- [76] THEURKAUF WE, HAWLEY RS. Meiotic spindle assembly in *Drosophila* females: behavior of nonexchange chromosomes and the effects of mutations in the nod kinesin-like protein. *J Cell Biol* 1992; **116**: 1167–1180.
- [77] WALCZAK CE, MITCHISON TJ, DESAI A. XKCM1: a *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell* 1996; **84**: 37–47.
- [78] WATERS JC, COLE RW, RIEDER CL. The force-producing mechanism for centrosome separation during spindle formation in vertebrates is intrinsic to each aster. *J Cell Biol* 1993; **122**: 361–372.
- [79] WORDEMAN L, MITCHISON TJ. Identification and partial characterization for mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J Cell Biol* 1995; **128**: 95–105.
- [80] ZINKOWSKI RP, MEYNEJ, BRINKLEY BR. The centromere-kinetochore complex: a repeat subunit model. *J Cell Biol* 1991; **113**: 1091–1110.
- [81] ZIRKLE RE. Ultraviolet-microbeam irradiation of newt-cell cytoplasm: spindle destruction, false anaphase, and delay of true anaphase. *Radiation Res* 1970; **41**: 516–537.
- [82] YEN TJ, LI G, SCHAAR BT, SZILAK I, CLEVELAND DV. CENT-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis. *Nature (Lond.)* 1992; **359**: 536–539.
- [83] YAO X, ANDERSON KL, CLEVELAND DW. The microtubule-dependent motor centromere-associated protein E (CENP-E) is an integral component of kinetochore corona fibers that link centromeres to spindle microtubules. *J Cell Biol* 1997; **139**: 435–447.

Redaktor prowadzący – S. Biliński

Otrzymano: 10.01.1998 r.

Przyjęto: 10.03.1998 r.

Adres autora: ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

EFEKTY STRESU OKSYDACYJNEGO U DROŻDŻY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

THE EFFECTS OF OXIDATIVE STRESS ON YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Witold JAKUBOWSKI

Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie: Drożdż *Saccharomyces cerevisiae*, podobnie jak inne organizmy wykorzystujące tlen w procesach metabolicznych, narażone są na niekorzystne działanie ubocznych produktów tych reakcji – reaktywnych form tlenu (RFT). W mechanizmach ochronnych przed skutkami wzmożonego powstawania RFT, które określa się jako stres oksydacyjny, wyodrębnia się dwie linie obrony – nieenzymatyczną i enzymatyczną. W pierwszej linii główną rolę odgrywa glutation, natomiast w drugiej wyróżnić można dwie grupy: enzymy wykorzystujące glutation (peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa i transferaza glutationowa) oraz enzymy nie związane z tym trójpeptydem (dysmutaza i katalaza). RFT w komórce oddziałują na szereg czynników transkrypcyjnych, które powodują wzmożoną syntezę enzymów zapobiegających niszcącemu działaniu reakcji wolnorodnikowych. Stałej obecności RFT w komórce towarzyszy podwyższenie progu toksyczności powstające w wyniku reakcji adaptacyjnej. U drożdży taka adaptacja do stresu oksydacyjnego następuje również w wyniku działania innych rodzajów stresów – termicznego i osmotycznego oraz podczas przejścia komórek w fazę stacjonarną.

Słowa kluczowe: drożdże, *S. cerevisiae*, stres oksydacyjny, reaktywne formy tlenu.

Summary: Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, as many other organisms depending on oxygen in their metabolic processes, are exposed to noxious action of side products of those reactions – reactive oxygen species (ROS). Two ways of defence against the effects of intensive production of ROS (so called oxidative stress) are distinguished: enzymatic and nonenzymatic. Glutathione plays the main role in the nonenzymatic path defence. ROS affect a number of transcription factors, which results in increased synthesis of enzymes preventing from destructive action of oxygen metabolites. The permanent presence of ROS in a cell is accompanied by increased tolerance which is a result of adaptation. The adaptation to the oxidative stress in baker's yeast may also be the effect of other kinds of stress: heat or osmotic shock or entering the stationary phase.

Key word: yeast, *S. cerevisiae*, oxidative stress, reactive oxygen species.

WSTĘP

Tlen jest doskonałym przykładem substancji mającej podwójne zarówno dodatnie, jak i negatywne działanie na żywe organizmy. Tlen jest niezbędny do życia organizmów wykorzystujących go w procesie oddychania, jednakże podczas tego procesu wytwarzane są substancje szkodliwe, które reagując niespecyficycznie ze składnikami komórki powodują powstawanie uszkodzeń. Odpowiedzialne za te procesy są tzw. reaktywne formy tlenu – RFT (ang. *reactive oxygen species* – ROS), do których zalicza się: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet -}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2) oraz rodnik wodorotlenowy (OH^{\bullet}) (tab. 1). Dodatkowo mogą tworzyć się nadtlenni różnych innych substancji, np. nadtlenni lipidowe (LOO^{\bullet}). Ich pochodzenie jest zarówno egzogenne, jak i endogenne. Wewnątrz komórki mogą one powstawać wskutek zewnętrznych czynników fizycznych: promieniowania jonizującego i ultrafioletowego, a także ultradźwięków. Szereg związków chemicznych, np. parakwat, menadion czy ozon, uczestniczy w reakcjach wytwarzających RFT (rys. 1).

Organizmy żywe wytwarzają reaktywne formy tlenu także podczas przemian fizjologicznych. Głównym źródłem RFT w komórce, powstających jako metabolity, są mitochondria. Zużywają one około 90% całego tlenu wykorzystywanego w komórce, z czego 1–2% podlega przemianie do reaktywnych form tlenu (tzw. przeciek jednoelektronowy) [61]. Niepoślednią rolę w wytwarzaniu RFT odgrywiają reakcje autooksydacji, w tym reakcja samoutlenienia oksyhemoglobiny (reakcja I) [13].



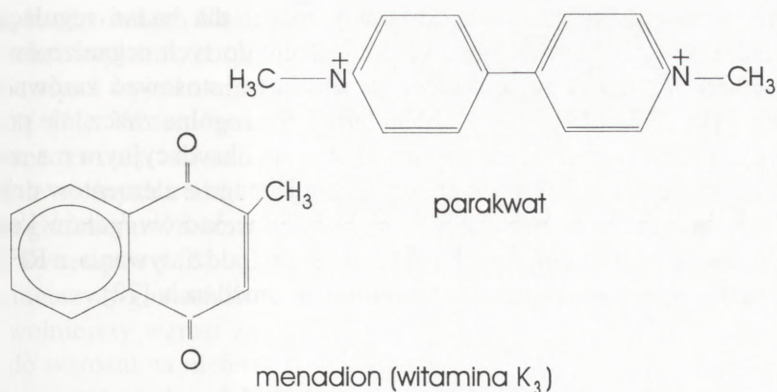
Także steroidogeneza i β -oksydacja kwasów tłuszczowych może prowadzić do powstawania aktywnych form tlenu. W rezultacie wszystkie organizmy aerobiotyczne są w sposób ciągły wystawione na działanie RFT. Stres oksydacyjny wiąże się z uszkodzeniami struktur komórkowych: peroksydacją lipidów w błonach, zmianami

w białkach prowadzącymi do utraty funkcji biologicznych, rozkładem cukrów i niszczeniem struktury kwasów nukleinowych [67].

Obecnie wiele procesów niekorzystnych dla organizmów żywych: starzenie się, programowaną śmierć komórki, powstawanie komórek nowotworowych, chorobę Alzheimera, artretyzm, choroby serca, jak również toksyczność leków tłumaczy się reakcjami wolnorodnikowymi [4, 14, 32, 39, 57]. Organizmy, siłą rzeczy, wykształciły szereg mecha-

TABELA 1. Wybór najważniejszych reaktywnych form tlenu

Nazwa	Struktura
Anionorodnik ponadtlenkowy	$O_2^{\bullet -}$
Nadtlenek wodoru	H_2O_2
Rodnik wodorotlenowy	OH^{\bullet}
Rodnik wodoronadtlenowy	OH_2^{\bullet}
Ozon	O_3
Tlenek azotu	NO^{\bullet}
Nadtlenoazotyn	$O=N-OO^{\bullet}$



RYSUNEK 1. Struktury menadionu i parakwatu – najczęściej używanych związków generujących anionorodnik ponadtlenkowy

nizmów obronnych przed toksycznym działaniem RFT. Pośród nich można wyróżnić enzymy, takie jak: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i peroksydaza glutationowa i systemy antyoksydacyjne, takie jak: tiole [1, 3, 6, 85], witaminy C i E [70, 74]. Właściwości przeciwutleniające ma także część aminokwasów [3, 71].

Nie należy jednak zapominać, że RFT mogą odgrywać także pozytywną rolę. Ich wytwarzanie jest niezbędne podczas obronnych reakcji fagocytów. Aktywnie produkowane reaktywne formy tlenu niszczą pochłonięte mikroorganizmy, a proces wzmożonego powstawania RFT w fagocytach określa się jako wybuch oddechowy (ang. *respiratory burst*) [4, 8, 38, 46]. Zauważono również indukcję przez RFT genów, takich jak *C-FOS*, *C-MYC*,

C-JUN i β -*ACTIN*, które kodują czynniki transkrypcyjne regulujące procesy życiowe komórki – wzrost, różnicowanie i rozwój [2]. Niskie stężenia reaktywnych form tlenu mogą także odgrywać rolę przekaźnika drugiego rzędu u roślin [9].

W licznych badaniach nad skutkami stresu oksydacyjnego stosuje się bakterie gramujemne – *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* [20, 24]. W organizmach bakteryjnych H₂O₂ powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego OxyR, odpowiedzialnego za ekspresję dziewięciu genów, których produkty wymagane są do obrony przed stresem oksydacyjnym wywoływanym przez H₂O₂ [73]. U *E. coli* anionorodnik ponadtlenkowy dodatkowo wpływa przez oddziaływanie z produktami genów *saxR* i *saxS* [21] na wzmożoną ekspresję genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową, dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową i enzym naprawiający DNA – endonukleazę IV [19].

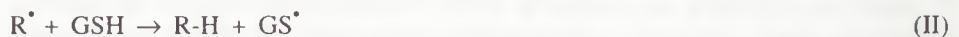
W komórkach eukariotycznych w odpowiedzi na stres oksydacyjny obserwowana jest zwiększona produkcja szeregu enzymów: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej. Wykazano także aktywację niektórych czynników transkrypcyjnych (np. NF- κ B, kompleks Fos-Jun) [22, 66].

Drożdże *S. cerevisiae* stanowią doskonały model dla badań regulacji genów w odpowiedzi na stres oksydacyjny. W odniesieniu do tych organizmów w przeciwieństwie do wyższych eukariontów, można łatwo stosować zarówno analizę genetyczną, jak i techniki biologii molekularnej. Szczególne znaczenie pod względem dokładnej charakterystyki obrony przed stresem oksydacyjnym ma możliwość zastosowania szczepów defektywnych względem jednego z elementów ochronnych [26]. Możliwe jest także wprowadzanie, przy użyciu wektorów, genów kodujących dodatkowe składniki linii obronnych przed skutkami oddziaływania z RFT, w tym także substancji nie występujących naturalnie w drożdżach [72].

OBRONA NIEENZYMATYCZNA

Systemy nieenzymatyczne chroniące komórkę przed stresem oksydacyjnym mają stosunkowo małą efektywność w porównaniu z enzymami opisanymi w następnym rozdziale. Zdecydowanie najlepiej poznanym i spełniający największą rolę jest glutation (GSH) [6, 19, 62]. Jest to trójpeptyd, γ -glutamyl-cysteino-glicyna, powszechny praktycznie we wszystkich komórkach. W komórkach drożdży, podobnie jak w innych komórkach eukariotycznych, występuje on w wysokich stężeniach – 1–10 mmol/l. Funkcja, jaką spełnia w komórce, związana jest z obecnością wolnej grupy -SH w formie zredukowanej (GSH). Drugą występującą formą tego związku jest glutation utleniony (dwusulfid glutationu, GSSG), będący wynikiem reakcji redoks pomiędzy grupą tiolową a oksydantami. Utlenianie GSH może zachodzić nieenzymatycznie, chociaż w obecności peroksydazy glutationowej reakcja ta przebiega znacznie efektywniej.

Glutation, będąc zmiataczem wolnych rodników, zapobiega powstawaniu uszkodzeń wywołanych przez te reaktywne cząstki (reakcje II i III).



Jeśli jednak takowe uszkodzenia powstaną i wytworzone zostaną wolne rodniki białek, glutation może doprowadzić do ich naprawy, ulegając przekształceniu do formy wolnorodnikowej (reakcje IV i V).



Niestety naprawa taka nie zawsze jest skuteczna, ponieważ w efekcie przyłączenia wodoru powstać może cząsteczka różniąca się stereochemicznie od cząsteczki wyjściowej.

Kolejną bardzo ważną funkcją glutationu jest tworzenie S-koniugatów z różnego rodzaju ksenobiotykami, co prowadzi do ich inaktywacji i obniżenia toksyczności (poza nielicznymi wyjątkami, takimi jak menadion, którego koniugaty mają większą toksyczność [7]). W ten sposób, przez transport S-koniugatów glutationu mogą być usuwane związki szkodliwe dla komórek, w tym także związki indukujące powstawanie wolnych rodników [7, 60].

Synteza glutationu w komórkach drożdży, podobnie do wszystkich eukariontów, przebiega dwuetapowo [6]. Badania nad mutantami z zaburzoną w wyniku nie-doboru syntetazy γ -glutamylcysteinowej (*GSH1*) biosyntezą glutationu pokazały znacznie wolniejszy wzrost zmodyfikowanych szczepów oraz dodatkowo ich niezdolność do wzrostu na niefermentowalnym źródle węgla, co oznacza niemożność prowadzenia przez te komórki efektywnego oddychania mitochondrialnego [44]. Sugeruje to znaczną rolę, jaką odgrywa glutation dla ochrony komórki przed RFT, w szczególności w mitochondrium, gdzie powstaje ich znaczna ilość. Należy przy tym pamiętać, że w mitochondrium znajduje się około 10% glutationu komórki, a całkowite utlenienie mitochondrialnego GSH może być niebezpieczne, gdyż błony mitochondrialne nie mają zdolności aktywnego transportu utlenionego glutationu, w przeciwieństwie do błony plazmatycznej [6].

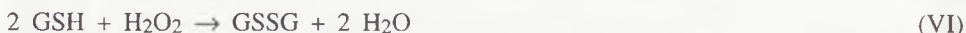
Następną klasę antyoksydantów stanowią metalotioneiny. Są to małe białka bogate w reszty cysteinowe, lecz nie wytwarzające wewnętrznych mostków dwusulfidowych, mające zdolność do wiązania wielu różnorodnych jonów metali [33]. Metalotioneiny odgrywają więc rolę ochronną wiążąc jony metali ciężkich (kadm, rtęć), ale równocześnie są magazynami metali wykorzystywanych w procesach fizjologicznych (miedź, cynk). Wolne grupy -SH, a także obecność atomów metali pozwalają metalotioneinom na szybką reakcję z aktywnymi formami tlenu. Metalotioneina drożdży kodowana jest przez gen *CUP1*. Badania prowadzone na zmutowanych szczepach nie wytwarzających Cu/ZnSOD pozwoliły potwierdzić rolę metalotioneiny jako przeciwutleniacza. Doświadczenia te pokazały nadekspresję metalotioneiny w komórkach niechronionych przez dysmutazę w stosunku do komórek szczepu wyjściowego [75]. Stwierdzono również, że gen *CUP1* jest aktywowany przez ekspozycję komórek na promieniowanie jonizujące, a także na chemiczne czynniki powodujące powstawanie reaktywnych form tlenu, takich jak: parakwat, menadion, adriamycyna, bleomycyna, daunorubicyna, paracetamol [33, 51].

OBRONA ENZYMATYCZNA

Komórkowa obrona przed skutkami wywołanymi przez reaktywne formy tlenu oparta jest na reakcjach enzymatycznych (tab. 3). W najlepiej przebadanych pod

tym względem organizmach bakteryjnych *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* obserwowano w obecności RFT wzmożoną syntezę ponad 30 białek głównie enzymatycznych [16].

Z omówionym już glutationem związane są trzy enzymy: peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa i transferaza glutationowa [7, 19, 62]. Peroksydaza (E.C. 1.11.1.9) jest indukowana przez H_2O_2 i nadtlarki organiczne. Enzym ten zawiera selen i katalizuje reakcję powstawania dwusulfidu glutationowego (reakcja VI).

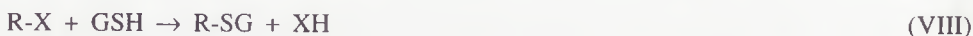


Zwiększenie ilości tego enzymu można uznać za przystosowanie się komórek drożdży do warunków środowiska, następuje ono bowiem przy zmianie warunków hodowli z beztlenowych na tlenowe [27, 36]. U drożdży, u których za pomocą technik inżynierii genetycznej podniesiono poziom peroksydazy, wykazano zwiększenie oporności na RFT i związki indukujące stres oksydacyjny.

Enzymem współdziałającym z peroksydazą jest reduktaza glutationowa (E.C. 1.6.4.2). Nie jest to enzym uczestniczący w bezpośredniej ochronie komórki przed RFT, ale odtwarzając zredukowaną formę glutationu (reakcja VII) jego działanie zwiększa potencjał obronny oraz zapobiega powstawaniu uszkodzeń białek w wyniku reakcji z GSSG.



Pośrednio więc obrona przed RFT uzależniona jest także od enzymów produkujących NADPH – dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (E.C. 1.1.1.49) i dehydrogenazy izocytrynianowej (E.C. 1.1.1.42). Należałoby jeszcze zaznaczyć, że traktowanie komórek *S. cerevisiae* subletalnymi stężeniami H_2O_2 powoduje zwiększoną produkcję reduktazy glutationowej i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, co wskazuje na możliwość adaptacyjnego wzrostu ekspresji odpowiednich genów [36, 56]. Ostatnim enzymem bezpośrednio związanym z GSH jest transferaza glutationowa (E.C. 3.1.2.7) katalizująca sprzężanie glutationu z różnymi związkami elektrofilowymi (reakcja VIII).



Produktem są S-koniugaty glutationu, o których była już mowa wcześniej.

Kolejnym białkiem wchodzącym w skład enzymatycznego systemu obrony przed RFT jest dysmutaza ponadtlenkowa (E.C. 1.15.1.1) (SOD – ang. *superoxide dismutase*). Wyróżnić można, zależnie od atomu metalu znajdującego się w centrum aktywnym, kilka typów dysmutazy. Jest to grupa enzymów katalizujących reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego (reakcja IX).

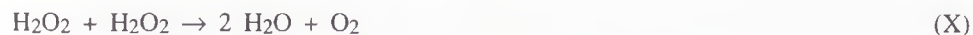


U drożdży zostały opisane dwa typy SOD. MnSOD, dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca atom manganu, występuje w matriks mitochondrialnej i jest tetramerem podjednostek o masie cząsteczkowej około 20 kDa. Kodowana jest przez jądrowy gen *SOD2*. Proponowana dla niej rola to ochrona mitochondriów przed O_2^\bullet , generowanym podczas przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy [87]. Dla MnSOD obserwowano również silną represję w obecności wysokich stężeń glukozy w pożywce (ponad 10%) [7, 31].

Cu/ZnSOD – dysmutaza miedziowo-cynkowa występuje w cytoplazmie wszystkich organizmów eukariotycznych, a jej obecność stwierdzono także w peroksy-somach [30]. Jest to pierwszy odkryty enzym katalizujący reakcję z wolnymi rodnikami. Kodowany przez gen *SOD1* enzym zbudowany jest z dwu podjednostek o masie cząsteczkowej 16 kDa. Każda z podjednostek zawiera 8 domen o strukturze β i spięta jest mostkiem dwusiarczkowym, w przeciwieństwie do MnSOD, która takich mostków nie ma.

Cu/ZnSOD jest głównym enzymem chroniącym komórkę przed anionorodnikami ponadtlenkowymi, a o jego doniosłości świadczą badania szczepów z defektem Cu/ZnSOD. Mutacje takie prowadzą do wzrostu wrażliwości komórek drożdży na warunki stresu oksydacyjnego, a wrażliwość ta jest większa niż w przypadku defektu genu *SOD2* [11, 26, 41].

Innym enzymem o znaczącej roli w obronie przed aktywnymi formami tlenu u *S. cerevisiae*, ale również u wszystkich eukariontów jest katalaza (E.C. 1.11.1.6). Enzym będący hemoproteiną katalizuje reakcję dysproporcjonowania nadtlenu wodoru (reakcja X)



U *S. cerevisiae* występują dwa typy katalazy – katalaza A (atypowa, peroksy-somalna) i katalaza T (typowa, cytoplazmatyczna), a kodowane są one przez geny, odpowiednio, *CTA1* i *CTT1* [34]. Katalaza jest tetramerem złożonym z podjednostek o masie cząsteczkowej ok. 60 kDa. Białko to pozwala organizmowi kontrolować poziom H_2O_2 zapobiegając akumulacji tego związku w komórce. Aktywność katalazy A jest ściśle skorelowana z obecnością oksydazy acyloCoA generującej nadtlenek wodoru w procesie β -oksydacji kwasów tłuszczowych, a zwiększona ilość kwasów tłuszczowych może powodować jej indukcję. Aktywność obu typów katalaz, A i T, wzrasta wraz ze wzrostem ilości H_2O_2 w komórce, a badania z użyciem mutantów defektywnych ujawniają większą wrażliwość komórek zmodyfikowanych na obecność H_2O_2 w stosunku do dzikich.

Dotychczas do końca niewyjaśniona pozostaje rola tioredoksyny. Ten niewielki enzym, masa cząsteczkowa ok. 12 kDa, zawiera w centrum aktywnym dwie reszty cysteinowe. U *S. cerevisiae* kodowany jest przez dwa geny *TRX1* i *TRX2* [28, 54]. Delecja jednego lub obu tych genów nie jest dla drożdży letalna, jakkolwiek mutanty takie są niezwykle wrażliwe na obecność H_2O_2 i stosunkowo niskie stężenia nadtlenu wodoru mogą być dla takich komórek śmiertelne [45]. Tioredoksyna odpowiada prawdopodobnie za naprawę uszkodzonych oksydacyjnie białek. Powoduje ona redukcję mostków dwusulfidowych powstałych na skutek utlenienia grup -SH w białkach przez reaktywne formy tlenu.

Pod wpływem stresu oksydacyjnego drożdże syntetyzują jeszcze jedno białko – przeciwutleniacz tiolospecyficzny – TSA – (ang. *thiol-specific antioxidant*), którego poziom wzrasta ponad dwukrotnie w odpowiedzi na obecność 95% O_2 oraz po dodaniu jonów Fe^{+3} lub 2-merkaptoetanolu. Białko to jest dotąd słabo poznane, gdyż nie określono jednoznacznie jego roli w komórce [15, 40]. Białka typu TSA odkryto u wielu oddalonych od siebie systematycznie organizmów, np. w komórkach mózgu szczura i u bakterii, takich jak *Clostridium pasteurianum* lub *Mycobacterium avium*. Sekwencja tego białka nie wykazuje znaczącej homologii z żadnym z głównych enzymów ochronnych [15]. Dla TSA sugeruje się rolę peroksydazy tioredoksyny. Proponowana równocześnie rola TSA jako chelatora jonów metali nie została dotychczas jednoznacznie potwierdzona [90].

ADAPTACJA DO STRESU

W komórkach pozostających w ciągłym kontakcie z czynnikiem dla nich niekorzystnym, zarówno chemicznym jak i fizycznym, dochodzi do podwyższenia progu toksyczności dla danego czynnika (tab. 2). Zależność taką obserwowano

TABELA 2. Przegląd czynników powodujących stres komórkowy u drożdży *S. cerevisiae*

Czynniki stresogenne dla komórek drożdży

Wysoka temperatura
 Niska temperatura
 Reaktywne formy tlenu
 Jony metali ciężkich
 Wysoka lub niska osmolalność
 Wysokie lub niskie pH
 Wysokie stężenie etanolu
 Czynniki wywołujące uszkodzenia DNA
 Głodzenie (azotowe i węglowe)
 Wsuszenie

w wielu laboratoriach także w stosunku do tlenu. Komórki drożdży, znajdujące się w logarytmicznej fazie wzrostu, utrzymywały w warunkach tlenowych podwyższoną aktywność mechanizmów obronnych, w stosunku do komórek z hodowli beztlenowych, co w efekcie dawało wspomniany, wyższy poziom oporności. Takie zmiany w metabolizmie organizmów określamy jako adaptację do warunków stresowych [18, 25–26, 36, 82]. Użycie cykloheksimidu, równocześnie z działaniem

TABELA 3. Białka zaangażowane w obronę przed stresem oksydacyjnym u *S. cerevisiae*

Białka	Gen(y)
Białka o aktywności enzymatycznej	
Peroksydaza glutationowa	GPX
Reduktaza glutationowa	
Transferaza glutationowa	
Dysmutaza ponadtlenkowa	Cu/ZnSOD MnSOD
	SOD1 SOD2
Katalaza A	CTA1
Katalaza T	CTT1
Tioredoksyna	TRX1, TRX2
Przeciwutleniacz tiolospecyficzny	TSA1
Pozostałe zaangażowane białka	
Metalotioneina	CUP1
Czynniki transkrypcyjne	ACE1, ACE2, YAP1, YAP2, HAP1, MAP1, OSR
Białka szoku cieplnego	HSP150, HSP84, HSP70, HSP26, HSP12, HSF1

warunków stresujących, powodowało zahamowanie procesu adaptacyjnego, co wskazuje na konieczność syntezy nowych białek [18, 55].

Mechanizm lub mechanizmy, które powodują przystosowanie do stresu oksydacyjnego, jak również rodzaj indukowanych białek, pomimo intensywnej badań w wielu pracowniach wciąż pozostają nie w pełni wyjaśnione. Znacznie lepiej poznana jest odpowiedź na stres cieplny i powstające w jego efekcie białka szoku termicznego (Hsp).

U *S. cerevisiae* stwierdzono istnienie dwóch dróg prowadzących do adaptacji do zwiększonej ilości RFT. Pierwszą indukuje obecność H_2O_2 , natomiast druga uruchamiana jest w wyniku kontaktu komórek ze związkami, takimi jak menadion. Menadion jest szeroko stosowanym związkiem powodującym generowanie anionorodników ponadtlenkowych w komórce, a toksyczność jego wykazać można używając mutantów *S. cerevisiae* z delecją genu *SOD1*. Odpowiedź na zwiększoną ilość H_2O_2 w komórce jest prawdopodobnie uwarunkowana innym mechanizmem, a według niektórych autorów związana jest ona z syntezą aż 21 różnych białek [36]. Dodatkowo, przy równoczesnej obecności menadionu i H_2O_2 obserwowano podwyższenie poziomu tolerancji na nadtlenuk wodoru. Podwyższenia progu toksyczności dla menadionu w obecności H_2O_2 nie udało się dotychczas potwierdzić. Elektroforetyczna analiza białek syntetyzowanych w odpowiedzi na oba czynniki wykazała, że powstają różne klasy białek w odpowiedzi na oddzielne działanie

menadionu i H_2O_2 (rys. 3). Obserwowane były także różnice dla białek syntetyzowanych w przypadku równoczesnego podania obu tych związków. Część z tych białek podlega ekspresji także przy innych rodzajach stresu, a funkcja niektórych z nich jest nie wyjaśniona.

Adaptacja do stresu oksydacyjnego powoduje aktywację genów kodujących enzymy o antyoksydacyjnej funkcji. U drożdży obserwowano wzrost aktywności tych enzymów będący następstwem podwyższonego stężenia H_2O_2 lub/i O_2^{\bullet} . Nie wykazano jednakże bezpośredniego wpływu RFT na wzrost transkrypcji genów, takich jak: *CTA1*, *CTT1*, *SOD2* lub *SOD1*. Efekt indukcji transkrypcji wywoływał jednak nadtlenek wodoru na gen *SSA1*, który koduje drożdżową izoformę białka Hsp70 [25, 41]. H_2O_2 i O_2^{\bullet} powodują u drożdży podniesienie poziomu glutationu, prawdopodobnie wywołując wzmożone wytwarzanie syntetazy glutationu. Aktywacja genu *GSH1* jest możliwą adaptacją komórek do stresu oksydacyjnego [26].

Bezpośredni wpływ RFT na biosyntezę obserwowano dla białek identyfikowanych jako czynniki transkrypcyjne. Regulują one transkrypcję genów, których produkty tworzą enzymatyczną linię obrony przed stresem oksydacyjnym. Wszystkie te czynniki (Ace1, Hap1, Mac1) są metaloproteinami i równocześnie są zaangażowane w kontrolę poziomu jonów metali w *S. cerevisiae*. Wiadomo, że geny *SOD1* i *CUP1* są regulowane przez czynniki Ace1 i Mac1. Ten ostatni odgrywa rolę w regulacji transkrypcji genów indukowanych przez jony żelaza i miedzi [29, 42]. Pełna rola tych czynników w odpowiedzi adaptacyjnej na stres oksydacyjny pozostaje ciągle niewyjaśniona.

Szczególną uwagę należałoby zwrócić na osobną grupę czynników transkrypcyjnych: Yap1 i Yap2, których budowa i spełniana funkcja jest różna od wcześniej opisanych. Wykazano, że Yap1 i Yap2 są homologami c-jun z AP-1 ssaków [72]. Do rodziny tych czynników należy także Gcn4 [12, 45], który jest regulatorem genów biosyntezy aminokwasów. Mutanty z delecją jednego z genów, *YAP1* lub *YAP2*, są wrażliwsze na oksydanty, głównie na H_2O_2 [40]. Na podstawie tego faktu, a także kilku wymienionych niżej można przypisywać produktom tych genów rolę w regulacji indukowanej przez H_2O_2 adaptacyjnej odpowiedzi na stres oksydacyjny. Równocześnie nie wykazano efektu czynników *YAP1* i *YAP2* w regulacji adaptacji do zwiększonej ilości O_2^{\bullet} . Oporność w fazie stacjonarnej oraz w przypadku oddychania komórkowego drożdży w odniesieniu do O_2^{\bullet} pozostaje nie zmieniona przy delecji *YAP1* i *YAP2*, co pozostaje w zgodzie z faktem, że żaden z obu tych genów nie jest niezbędny do normalnego wzrostu [64]. Jednakże, wysoki poziom ekspresji *YAP1* w komórce powoduje wzrost odporności na takie toksyczne czynniki, jak cykloheksimid, jony kadmu, chelatory Zn^{2+} i Fe^{2+} . Prace z mutantami o nieaktywnym Yap1 pokazały redukcję aktywności enzymów o działaniu antyoksydacyjnym [64]. Dodatkowym potwierdzeniem tej zależności były doświadczenia, w których wykorzystano plazmidy do zwielokrotnienia ilości kopii *YAP1*, co powodowało wzrost, aczkolwiek niewielki, aktywności tych właśnie enzymów (SOD,

GPX, G-6-P D) i podwyższenie całkowitego poziomu glutationu [64]. Rezultaty te sugerują, że białko Yap1 może odgrywać rolę w obronie komórki przed RFT. Aktywność Yap1 jest regulowana przez fosforylację, lecz mimo teoretycznie określonych miejsc mogących jej podlegać nie znane są miejsca fosforylowane *in vivo*. Ponadto wstępna analiza mutantów z utratą 11 C-końcowych aminokwasów sugeruje, że czynnik Yap1 regulowany jest podobnie jak c-Jun. Delecja fragmentu C-terminalnego powoduje utratę zdolności stymulacji transkrypcyjnej przez H_2O_2 oraz dwuamid. U wszystkich białek tej grupy wykazano wysoką homologię w regionie C-końcowym i istnienie fragmentów bogatych w cysteinę, tworzących prawdopodobnie miejsca przyłączania jonów metali. Jako główny cel dla czynnika Yap1 określono region promotorowy *TRX2* [45], ale zauważono równocześnie, że Yap1 łączy się z regionami promotorowymi *GSH1* i *SSA1* [89]. Sprawę regulacji zaciemniają obserwacje wskazujące na indukcję genów *GSH1*, *TRX2* i *SSA1* u drożdży *S. cerevisiae* przez oksydanty wobec braku Yap1. W przeciwieństwie do *SSA1* i *TRX2* ekspresja *GSH1* jest dużo silniej aktywowana przez O_2^{\bullet} niż przez H_2O_2 , a przy indukcji *GSH1* przez anionorodnik ponadtlenkowy obecność czynnika Yap1 nie jest wymagana [72]. Zauważono również, że Yap1 nie jest niezbędny przy indukcji genu *GSH1* przez O_2^{\bullet} [72]. Rola drugiego z czynników – Yap2, w regulacji adaptacyjnej odpowiedzi na stres oksydacyjny nie jest znana, jednakże prowadzone eksperymenty wykazały u mutantów defektywnych pod względem tego czynnika występowanie podwyższonej wrażliwości na oksydanty. Niedawno odkryty czynnik Cad1 został zidentyfikowany jako homolog Yap2; jest on zdolny do nadawania oporności w obecności kadmu, a także niektórych leków [12, 88]. Dla wcześniej wspomnianego czynnika Gcn4 wykazano jeszcze jedną funkcję. Jest on zaangażowany w odpowiedź na uszkodzenia DNA u *S. cerevisiae* wywołane promieniowaniem UV, co odpowiada funkcji spełnianej przez kompleks AP-1 u ssaków [23]. Kolejnym czynnikiem należącym do tej grupy jest odkryty u *Schizosaccharomyces pombe* czynnik Pap1. Ma on wysoką homologię do Yap1, a obecny w wysokiej liczbie kopii może nadawać oporność na toksyczny inhibitor kinaz – staurosporynę [77]. Yap1 jest także proponowanym czynnikiem regulującym transkrypcję niedawno odkrytego genu *OSR*. Z kolei produkt *OSR* wpływa na indukcję *GSH1*, co związane jest z poziomem glutationu w komórce [43]. Gen *OSR* (ang. *oxidative stress resistance*) ma wysoką homologię z genem *ZRC1* kodującym białko zwiększające oporność na obecność w środowisku cynku [43].

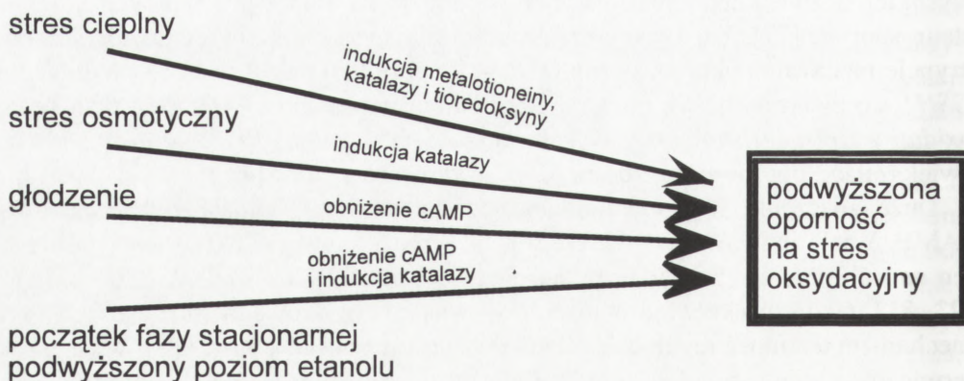
Duże znaczenie w regulacji odpowiedzi na poziom RFT mają zmiany poziomu cAMP. Wiele indukowanych stresem genów może podlegać aktywacji właśnie w ten sposób. Pośród nich wlicza się obecnie geny *CTT1*, *SSA3*, *HSP26* i *HSP12* [23, 81]. Geny te aktywuje obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, a mechanizm ten może regulować odpowiedź na stres oksydacyjny, jak również szok termiczny i stres wywołany głodzeniem węglowym lub azotowym, oraz wejście komórek w stacjonarną fazę wzrostu. Mutant *Cyr1*, mający fizjologicznie niski

poziom cAMP w wyniku defektu cykazy adenylowej, jest niewrażliwy na całą gamę różnorodnych czynników – głodzenie, podwyższenie temperatury i oksydanty [35, 68] (rys. 2).

ADAPTACJA DO STRESU OKSYDACYJNEGO INDUKOWANA PRZEZ INNE RODZAJE STRESU

Ekspozycja komórek na określony typ stresu prowadzi często do podwyższenia tolerancji na czynniki stresujące innego rodzaju. Zjawisko powstawania ochrony krzyżowej (ang. *cross protection*) [49] wskazuje na możliwość pokrywania się pewnych etapów odpowiedzi komórkowej na różne od siebie niekorzystne czynniki (rys. 2).

Prawdopodobnie najpełniej opisaną reakcją na warunki stresowe są zmiany wywołane przez podwyższoną temperaturę [49, 84]. Stres termiczny powoduje indukcję syntezy całej gamy białek szoku termicznego (ang. *heat shock proteins* – Hsps). Wzmoczoną produkcję białek Hsp obserwuje się również w stresie różnym od cieplnego. Aktywację genów kodujących białka Hsp obserwowano u bakterii *E. coli* w wyniku podawania substancji toksycznych [78]. Również ekspozycja komórek ssaków na jony metali ciężkich, RFT oraz analogi aminokwasów prowadzi do syntezy Hsp. Wzmoczona ekspresja genów kodujących Hsp jest charakterystyczna w wielu stanach chorobowych człowieka [53]. W przypadku drożdży warunki stresowe, takie jak: ekspozycja na etanol, obecność inhibitorów syntezy białka, stres osmotyczny, niedobór źródeł węgla lub azotu, jak również wejście komórek w fazę stacjonarną, mogą prowadzić do zwiększonej syntezy białek zaangażowanych w odpowiedź na stres termiczny [58, 79]. Jednak nie wszystkie białka klasy Hsp



RYSUNEK 2. Mechanizm powstawania ochrony krzyżowej

są indukowane przez każdy z wymienionych czynników, co sugeruje oddziaływanie, przynajmniej częściowo, na niezależne drogi odpowiedzi.

Opisana została zwiększona oporność na stres oksydacyjny wywołana preinkubacją w podwyższonej temperaturze. Komórki *S. cerevisiae* hodowane w 23°C, a przeniesione do temperatury 37°C wykazywały, oprócz zmian typowych dla stresu termicznego, podwyższony próg tolerancji dla toksycznego działania RFT, co świadczy o wspólnych elementach odpowiedzi na te rodzaje stresu [48–49]. Równocześnie nie udało się dotychczas wykazać znaczącego wzrostu termotolerancji u drożdży wywołanego obecnością H₂O₂ lub/i O₂^{*}.

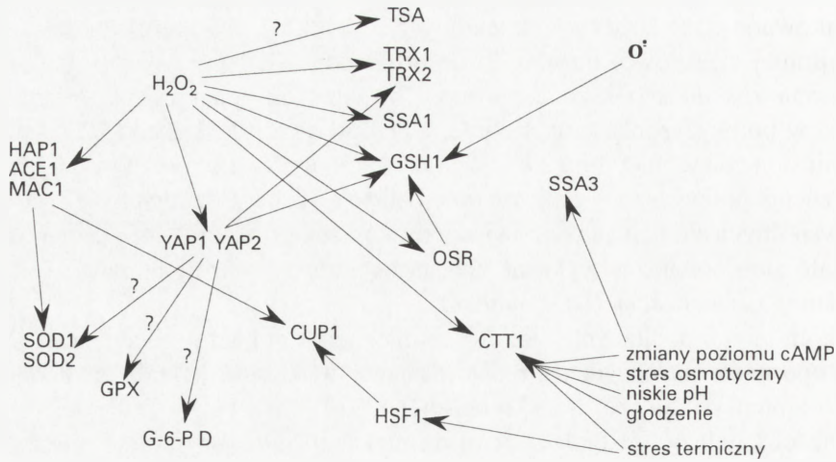
W komórkach poddanych szokowi termicznemu dokładny mechanizm powstawania oporności na oksydanty nie jest znany, wykazano jednak, że dochodzi w nich do zintensyfikowanej transkrypcji genu *CTT1* [10–11]. Równoczesny wzrost aktywności katalazy T i białek szoku termicznego może wyjaśniać obserwowaną oporność.

W efekcie działania stresu cieplnego obserwowano wzmożoną syntezę także innego białka chroniącego przed RFT – metalotioneiny. Gen *CUP1* indukowany jest przez czynnik transkrypcyjny Hsf1, który powstaje w odpowiedzi na stres termiczny oraz w efekcie głodzenia glukozowego [76]. *CUP1* zawiera w kompleksie promotorowym liczne tzw. pięści miedziowe (ang. *copper fist*) wykorzystywane przez czynniki Ace1 i Ace2 podczas regulacji odpowiedzi na obecność metali. Zaangażowanie Hsf1 w syntezę metalotioneiny wykryto dzięki obserwacji, że mutacja czynnika Hsf1 powodowała ogólne podwyższenie transkrypcji metalotioneiny. Prawdopodobnie mutacje te powodują wzrost powinowactwa Hsf1 do promotora *CUP1* [76].

Białkiem, dla którego także wykazano podwójną regulację syntezy, jest tioredoksyna, której aktywność wzrasta w komórkach pod wpływem stresu oksydacyjnego oraz stresu termicznego [37].

Innym przykładem ochrony krzyżowej jest sprzężenie drogi HOG (ang. *high osmolarity glycerol response*) z podwyższoną tolerancją na RFT. Drogę przekazywania sygnału HOG opisano dla genów *PBS2* i *HOG1*, kodujących kinazy z rodziny MAP. Mutacje tej drogi prowadzą do całkowitego zniesienia indukcji odpowiedzi komórkowej na stres osmotyczny, w czym pośredniczy sekwencja *STRE* (ang. *stress response elements*). Oprócz stresu osmotycznego *STRE* jest aktywowana podczas głodzenia, ekspozycji na RFT lub podwyższoną temperaturę, w niskim pH oraz w obecności etanolu. Wszystkie te czynniki prowadzą do indukcji genu katalazy cytoplazmatycznej – *CTT1* [10–11, 50, 52, 66]. Enzym ten ma znaczącą rolę w ochronie przed RFT, ale jego synteza towarzyszy także zwiększeniu termotolerancji i osmotolerancji [84]. Lista genów kontrolowanych przez *STRE* zawiera dodatkowo *DDR2*, *HSP12*, *TPS2*, *GSY2*, *GPH1* [63].

Komórki drożdży będące w późnej fazie logarytmicznej lub w fazie stacjonarnej (G₀) charakteryzuje ciekawa właściwość – zwiększona oporność na wiele z wy-



RYSUNEK 3. Zależności aktywacji poszczególnych genów uczestniczących w reakcjach obronnych przeciwko reaktywnym formom tlenu (szczegóły w tekście)

mienionych stresów [14, 47, 49, 80]. Obserwowano, że podwyższenie oporności na stres jest związane z jego działaniem jeszcze w fazie logarytmicznej. Jednak stopień oporności w fazie stacjonarnej jest wyższy niż indukowana odpowiedź adaptacyjna w fazie logarytmicznej. Także fakt, że w fazie G_0 komórki wykazują oporność na wiele różnych czynników stresogennych, sugeruje indukcję odmiennego mechanizmu odpowiedzi [39]. Zbieżne obserwacje były wykonane dla termotolerancji wywołanej szokiem termicznym, gdzie oporność podczas fazy stacjonarnej była rozciągnięta na czas dłuższy niż w wypadku indukcji podczas fazy wzrostu logarytmicznego [80]. Oporność drożdży na szok oksydacyjny wykazywała podobną zależność. Jakkolwiek precyzyjny mechanizm oporności na oksydanty generowanej w tych warunkach nie jest dokładnie znany, obserwowano jednak zmiany ekspresji genów kodujących antyoksydanty. Wzrastała synteza składników mitochondrialnego łańcucha oddechowego, a także synteza katalazy T i MnSOD [83, 85]. Także transkrypcja różnych białek szoku termicznego kodowanych przez geny *HSP150*, *HSP84*, *HSP70*, *HSP26*, *HSP12* była intensywniejsza [49].

PODSUMOWANIE

Badania nad adaptacją do stresu oksydacyjnego u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wykazują ogromną różnorodność możliwych dróg odpowiedzi komórkowej. Są one w wielu miejscach zbieżne z reakcjami na inne toksyczne czynniki i niekorzystne warunki, jak przytaczane tu sprzężenie z odpowiedzią charakterystyczną dla szoku termicznego lub osmotycznego.

Widać też, że reaktywne formy tlenu indukują syntezę całej gamy czynników transkrypcyjnych, co świadczyć może o wielokrotnym dublowaniu systemów chroniących komórkę.

Komórki *S. cerevisiae* stanowią jeden z głównych modeli komórki eukariotycznej w badaniach biologii molekularnej i odkrycia związane z zabezpieczeniami przed niekorzystnymi wpływami metabolitów tlenu będą niewątpliwie odnoszone do pozostałych eukariontów, gdzie dodatkowo te złożone zależności będą komplikowane przez aspekty związane z oddziaływaniami między komórkami w organizmach wielokomórkowych. Pamiętać należy również o hipotezie G. Barja [5], że w organizmach tlenowych reaktywne formy tlenu są niezbędnymi „normalnymi” metabolitami, a ich powstawanie i usuwanie utrzymuje stan równowagi dynamicznej między pro- i antyoksydantami.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AKANMU D, CECCHINI R, ARUOMA OI, HALLIWELL B. The antioxidant action of ergothioneine. *Arch Biochem Biophys* 1991; **188**: 10–16.
- [2] AMSTAD PA, KRUPITZA G, CERUTTI PA. Mechanism of c-fos induction by active oxygen. *Cancer Res* 1992; **52**: 3952–3960.
- [3] ARUOMA O.I., HALLIWELL B., HOEY B.M., BUTLER J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 1988; **256**: 251–255.
- [4] BAGILINI M, THELAN M. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. Harcourt Brace Jordanovich, London, UK 1991.
- [5] BARJA G. Ascorbic acid and aging. *Subcell Biochem* 1996; **25**: 157–188.
- [6] BARTOSZ G. Metabolizm glutationu. *Post Biochemii* 1993; **39**: 32–38.
- [7] BARTOSZ G. Pompa S-koniugatów glutationu. *Curr Topics Biophys* 1994; **18** (supp.): 31–45.
- [8] BARTOSZ G. Druga twarz tlenu. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 1995; 207–212.
- [9] BARTOSZ G. Oxidative stress in plants. *Acta Physiol Plant* 1997; **19**: 47–64.
- [10] BILIŃSKI T, KRAWIEC Z, LICZMAŃSKI A, LITWIŃSKA J. Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction *in vivo*? *Biochem Biophys Res Comm* 1985; **130**: 533–539.
- [11] BILIŃSKI T, KRAWIEC Z, LITWIŃSKA J, BŁASZCZYŃSKI M. Oxy-Radicals. in: Molecular Biology and Pathology, Alan R Liss Inc., USA, 1988; 109–124.
- [12] BOSSIER P, FERNANDES L, ROCHA D, RODRIGUES-POUSADA C. Overexpression of YAP2, coding for a new yAP protein, and YAP1 in *Saccharomyces cerevisiae* alleviates growth inhibition caused by 1,10-phenanthroline. *J Biol Chem* 1993; **268**: 23640–23645.
- [13] CARTER DE. Oxidation-reduction reactions of metal ions. *Environm Health Perspec* 1995; **103**: 17–19.
- [14] CERUTTI PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 198; **5227**: 375–381.
- [15] CHAEHZ, RHEE SG. A thiol-specific antioxidant and sequence homology to various proteins of unknown function. *BioFactors* 1994; **4**: 177–180.
- [16] CHRISTMAN MF, MORGAN RW, JACOBSON FS, AMES BN. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 1985; **41**: 753–762.
- [17] COHEN G, RAPATZ W, RUIS H. Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *Eur J Biochem* 1988; **176**: 159–163.

- [18] COLLINSON LP, DAWES IW. Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J Gen Microbiol* 1992; **138**: 329–335.
- [19] DELEVE LD, KAPLOWITZ N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmac Ther* 1991; **52**: 287–305.
- [20] DEMPLE B. Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Ann Rev Genet* 1991; **25**: 315–317.
- [21] DEMPLE B, AMABILE-CUERAS CF. Redox redox: the control of oxidative stress responses. *Cell* 1991; **67**: 837–839.
- [22] DEVARY Y, GOTTLIEB RA, LAU LF, KARIN M. Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 2804–2811.
- [23] ENGELBERG D, KLEIN C, MARTINETTO H, STRUHL K, KARIN M. The UV response involving the Ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. *Cell* 1994; **77**: 381–390.
- [24] FARR SB, KOGOMA T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* 1991; **55**: 561–585.
- [25] FLATTERY-OBRIEN J, COLLINSON LP, DAWES JW. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J Gen Microbiol* 1993; **139**: 501–507.
- [26] FORTUNIAK A, JAKUBOWSKI W, BILINSKI T, BARTOSZ G. Lack of evidence of oxidative damage in antioxidant-deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Mol Biol Internat* 1996; **38**: 1271–1276.
- [27] GALIAZZO F, SCHIESSER A, ROTILIO G. Glutathione peroxidase in yeast. Presence of the enzyme and induction by oxidative conditions. *Biochem Biophys Res Comm* 1987; **147**: 1200–1205.
- [28] GAN ZR. Yeast thioredoxin genes. *J Biol Chem* 1991; **266**: 1692–1696.
- [29] GRALLA EB, THIELE DJ, SILAR P, VALENTINE JS. ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8558–8562.
- [30] GRALLA EB, VALENTINE JS. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu, Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J Bacteriol* 1991; **173**: 1200–1205.
- [31] GUIDOT DM, MCCORD JM, WRIGHT RM, REPINE JE. Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation *in vivo*. *J Biol Chem* 1993; **268**: 26699–26703.
- [32] HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; **186**: 1–85.
- [33] HAMER DH. Metallothionein. *Ann Rev Biochem* 1986; **55**: 913–951.
- [34] HARTIG A, RUIS H. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T. *Eur J Biochem* 1986; **160**: 487–490.
- [35] IIDA H. Multistress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* is generated by insertion of retrotransposon Ty into the 5' coding region of the adenylate cyclase gene. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 5555–5560.
- [36] IZAWA S, INOUE Y, KIMURA A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 1993; **368**: 73–76.
- [37] JACQUIER-SARLIN MR, POLLA BS. Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin. *Biochem J* 1996; **318**: 187–193.
- [38] JAKÓBISIAK M. *Immunologia*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 1995; 210–225.
- [39] JAMIESON DJ. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol* 1992; **174**: 6678–6681.

- [40] JAMIESON DJ. The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Report* 1995; **1**: 89–95.
- [41] JAMIESON DJ, RIVERS SJ, STEPHAN DWS. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology* 1994; **140**: 3277–3283.
- [42] UNGMANN J, REINS HA, LEE J, ROMEO ARH, KOSMAN D, JENTSCH S. MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J* 1993; **12**: 5051–5056.
- [43] KABAYASHI S, MIYABE S, IZAWA S, INOUE Y, KIMURA A. Correlation of the OSR/ZRCI gene product and the intracellular glutathione levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Appl Biochem* 1996; **23**: 3–3.
- [44] KISTLER M, SUMMER KH, ECKARDT F. Isolation of glutathione-deficient mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res* 1986; **173**: 117–120.
- [45] KUGE S, JONES N. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J* 1994; **13**: 655–664.
- [46] LILIUS EM, MARNILA P. Photon emission of phagocytes in relation to stress and disease. *Experientia* 1992; **48**: 1082–1091.
- [47] LONGO VD, GRALLA EB, VALENTINE JS. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species *in vivo*. *J Biol Chem* 1996; **271**: 12275–12280.
- [48] MAGER HM, DE KRUIJFF AJJ. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev* 1995; **59**: 506–531.
- [49] MAGER WH, FERREIRA PM. Stress response of yeast. *Biochem J* 1993; **290**: 1–13.
- [50] MARCHLER G, SCHÜLLER CH, ADAM G, RUIS H. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J* 1993; **12**: 1997–2003.
- [51] MARTINEZ-CAYUELA M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochem* 1995; **77**: 147–161.
- [52] MARTINEZ-PASTOR MT, MARCHLER G, SCHÜLLER CH, MARCHLER-BRAUER A, RUIS H, ESTRUCH FH. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* 1996; **15**: 2227–2235.
- [53] MORIMOTO RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993; **259**: 1409–1410.
- [54] MULLEREGD. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J Biol Chem* 1991; **266**: 9194–9202.
- [55] OBERLEY TD, SCHULZTZ JL, LI N, OBERLEY LW. Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Rad Biol Medicine* 1995; **19**: 53–56.
- [56] PANDOLFI PP, SONATI F, RIVI R, MASON P, GROSVELD F, LUZZATTO L. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J* 1995; **14**: 5209–5215.
- [57] PIERCE GB, PARCHMENT RE, LEWYLLYN AL. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differen* 1991; **46**: 181–186.
- [58] PLESSET J, PALM C, MCLAUGHLIN CS. Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Comm* 1982; **108**: 1340–1345.
- [59] PRAEKELT UM, MEACOCK PA. HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol Gen Genet* 1990; **223**: 97–106.
- [60] PUŁASKI Ł, BARTOSZ G. Transport of bimane-S-glutathione in human erythrocytes. *Bioch Biophys Acta* 1995; **1268**: 279–784.

- [61] RICHTER CH, GOGRAZDZE V, LAFFRACHI R, SCHLAPBACH R, SCHWEIZER M, SURER M, WALTER P, YAFFEE M. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochem Biophys Acta* 1995; **1271**: 67–74.
- [62] ROSS D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmac Ther* 1988; **37**: 231–249.
- [63] RUIS H, SCHÜLLER CH. Stress signaling in yeast. *BioEssays* 1995; **17**: 959–965.
- [64] SCHNELL N, KREMS B, ENTIAN KD. The PARI (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr Genet* 1992; **21**: 269–273.
- [65] SCHRECK R, RIEBER P, BAEUERLE PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; **10**: 2247–2258.
- [66] SCHÜLLER CH, BREWSTER JL, ALEXANDER MR, GUSTIN MC, RUIS H. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J* 1994; **13**: 4382–4389.
- [67] SHIGENAGA MK, HAGEN TM, AMES BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 10771–10778.
- [68] SHIN DY, MATSUMOTO K, IIDA H, UNO I, ISHIKAWA T. Heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in cyclic AMP-dependent protein phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 244–250.
- [69] SILAR P, BUTLER G, THELE DJ. Heat shock transcription factor activates transcription of the yeast metallothionein gene. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 1232–1238.
- [70] STADTMAN ER. Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am J Clin Nutr* 1991; **54**: 1125S–1128S.
- [71] STADTMAN ER, BERLETT BS. Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J Biol Chem* 1991; **266**: 17201–17211.
- [72] STEPHEN DWS, RIVERS SL, JAMIESON DJ. The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec Microbiol* 1995; **16**: 415–423.
- [73] STORZ G, TARTAGLIA LA, FARR SB, AMES BN. Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends Genet* 1990; **6**: 363–368.
- [74] TAKENAKA Y, MIKI M, YASUDA H, MINO M. The effect of alpha-tocopherol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols induced by free radicals generated in different sites. *Arch Biochem Biophys* 1991; **285**: 344–350.
- [75] TAMAI KT, GRALLA EB, ELLERBY LM, VALLENTINE JS. Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8013–8017.
- [76] TAMAI KT, LIU X, SILAR P, SOSINOWSKI T, THIELE DJ. Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 8155–8165.
- [77] TODA T, SHIMANUKI M, YANAGIDA M. Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev* 1991; **5**: 60–73.
- [78] VAN DYK TK, MAJARIAN WR, KONSTANTINOV KB, YOUNG R.M., DHURJATI PS, LAROSSA RA. Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Appl Environ Microbiol* 1994; **60**: 1414–1420.
- [79] VARELA JCS, VAN-BEEKVELT C, PLANTA RJ, MANGER WH. Osmostress-induced changes in yeast gene expression. *Mol Microbiol* 1992; **6**: 2183–2190.
- [80] WATSON K. Microbiol stress proteins. *Adv Micro Physiol* 1990; **31**: 183–223.

- [81] WERNER-WASHBURNE M, BECKER J, KOSIC-SMITHERS J, CRAIG EA. Yeast Hsp70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *J Bacteriol* 1989; **171**: 2680–2688.
- [82] WERNER-WASHBURNE M., BRAUN E., JOHNSTON G.S., SINGER R.A. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 1993; **57**: 383–401.
- [83] WESTERBEEK-MARRES CA, MOORE MM, AUTOR AP. Regulation of manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. The role of respiratory chain activity. *Eur J Biochem* 1988; **174**: 611–620.
- [84] WIESER R, ADAM G, WAGNER A, SCHÜLLER CH, MARCHLER G, RUIS H, KRAWIEC Z, BILIŃSKI T. Heat shock factor-independent heat control of transcription of the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1991; **266**: 12406–12411.
- [85] WINKLER BS. *In vitro* oxidation of ascorbic acid and its prevention by GSH. *Biochem Biophys Acta* 1987; **925**: 258–264.
- [86] WINKLER H, ADAM G, MATTES E, SCHANZ M, RUIS H. Co-ordinate control of synthesis of mitochondrial and non-mitochondrial hemoproteins: a binding site for the HAP1 (CYP1) protein in the UAS region of the yeast catalase T gene (CTT1). *EMBO J* 1988; **7**: 1799–1804.
- [87] WONG GHW. Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial MnSOD. *Biochem Biophys Acta* 1995; **1271**: 205–209.
- [88] WU AL, WEMMIE JA, EDGINGTON NP, GOEBL M, GUEVARA JL, MOYE-ROWLEY WS. Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J Biol Chem* 1993; **268**: 18850–18858.
- [89] WU AL, MOYE-ROWLEY WS. GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 5832–5839.
- [90] YIM MB, CHAE HZ, RHEE SG, CHOCK PB, STADTMAN ER. On the protective mechanism of the thiol-specific antioxidant enzyme against the oxidative damage of biomacromolecules. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1621–1626.

Redaktor prowadzący – J. Michejda.

Otrzymano: 09.11.1997 r.

Przyjęto: 10.03.1998 r.

Adres autora: ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

**CYTOTOKSYCZNE RYBONUKLEAZY
O SZCZEGÓLNYM DZIAŁANIU BIOLOGICZNYM
(RYSBAZY): RYSBAZY ZWIERZĘCE I LUDZKIE**

**CYTOTOXIC RIBONUCLEASES WITH SPECIAL BIOLOGICAL
ACTIONS (RISBASES): ANIMAL AND HUMAN RISBASES**

Adam SOBKOWIAK, Andrzej WIERZBICKI, Wiesław H. TRZECIAK

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Poznaniu

Streszczenie: Rysbazy są to rybonukleazy o specjalnym działaniu biologicznym. W niniejszym artykule omówiono budowę, mechanizm działania i funkcję niektórych Rysbaz zwierzęcych i ludzkich. Neurotoksyny granulocytów (EDN i ECP) chronią przed pasożytami i wykazują aktywność przeciwnowotworową podobnie jak onkonaza z *Rana pipiens*. Nieznany jest sposób zabijania komórek przez onkonazę – przypuszczalnie hydrolizuje ona rRNA. Rybonukleaza z nasienia byka (BS-RN-aza) jest homodimerem o bardzo skutecznym działaniu przeciwnowotworowym. Angiogenina jest homologiem trzustkowej RN-azy A i pobudza proliferację naczyń krwionośnych. Przez chemiczne sprzężenie RN-az z przeciwciałami lub fuzję genu RN-azy z genami przeciwciał otrzymuje się immunotoksyny, o wybiórczej cytotoksyczności w stosunku do komórek.

Słowa kluczowe: rysbazy, rybonukleazy, angiogeneza, cytotoksyny, immunotoksyny, czynniki przeciwnowotworowe.

Summary: Risbases are ribonucleases with special biological actions. Structure, mechanism of action and functions of some animal and human Risbases were described. Eosinophil-derived neurotoxins (EDN and ECP) are host defense proteins against parasites and may express anticancer activity like onconase from *Rana pipiens*. How onconase kills cells is unknown – perhaps it degrades rRNA. Bovine seminal ribonuclease (BS-RNase) is a homodimeric enzyme with a highly effective antitumor action. Angiogenin is homologous to pancreatic RNase A and it displays angiogenic activity. Chemically coupling of RNases to antibodies or fusing RNase genes with the antibodies genes produces immunotoxins with specific cell-type cytotoxicity.

Key words: risbases, ribonucleases, angiogenesis, cytotoxines, immunotoxines, anti-tumor agents.

WSTĘP

W ostatnich latach dowiedziono, że wiele białek czynnych biologicznie wykazuje aktywność rybonukleolityczną. D' Alessio zaproponował dla nich nazwę RISBASES (*ribonucleases with special biological actions*) [14]. W poprzednim artykule omówiono Rysbazy pochodzenia bakteryjnego, grzybowego i roślinnego [80]. W tej części przedstawiono budowę i działanie ludzkich i zwierzęcych czynników zaliczanych do rysbaz, z których większość, z wyjątkiem angiogeniny, ma aktywność cytotoksyczną. Pełnią one różnorakie funkcje i charakteryzują się działaniem immunosupresyjnym, przeciwnowotworowym, antywirusowym i neurotoksycznym. Biorą też udział w niszczeniu pasożytów i indukują tworzenie naczyń krwionośnych (tab. 1). Wszystkie te białka należą do nadrodziny RN-azy A, a ich wspólną cechą jest podobna budowa i zbliżona względna masa cząsteczkowa oraz zdolność hydrolizy rybosomalnego RNA, która decyduje o cytotoksyczności tych białek.

Rysbazy wzbudzają duże zainteresowanie biologów i lekarzy, gdyż wykorzystując ich właściwości, konstruuje się immunotoksyny i chimery białek, zawierające aktywne biologicznie cząsteczki różnych rysbaz. Wytworzenie ich może przebiegać drogą chemicznego połączenia przeciwciała z toksyną lub też przez fuzję genów kodujących syntezę tych białek. Tak otrzymane cząsteczki wykazują specyficzną cytotoksyczność i mogą być stosowane w terapii różnych chorób, głównie nowotworów.

Celem artykułu jest przedstawienie najnowszych badań dotyczących struktury i działania najważniejszych rysbaz, ze szczególnym uwzględnieniem ich cytotoksycznego działania.

RYBONUKLEAZY EDN I ECP Z ZIARNISTOŚCI GRANULOCYTÓW KWASOCHŁONNYCH

W roku 1933 Gordon wykonał doświadczenie, w którym wstrzyknięto do mózgu zwierząt wyciąg z węzłów chłonnych chorych z mięsakiem Hodgkina. Po tym zabiegu zaobserwowano objawy neurotoksyczne: osłabienie koordynacji i nie zborność ruchową (ataksję), sztywność mięśni i porażenie kończyn, prowadzące nieuchronnie do śmierci zwierząt w ciągu kilku do kilkudziesięciu dni. W obrazie mikroskopowym obserwowano gwałtowny zanik komórek Purkiniego w warstwie zwojowej kory mózdzku i zmiany gąbczaste w moście i rdzeniu przedłużonym [83]. Zjawisko to zostało nazwane efektem Gordona. Znacznie później okazało się, że opisane objawy były spowodowane nie, jak wcześniej sądzono, przez nieznaną patogen obecny w węzłach chłonnych chorych, lecz przez *eosinophil-derived neurotoxin* (EDN) i białko zasadowe – *eosinophil cationic protein* (ECP), które okazały się RN-azami obecnymi w ziarnistościach granulocytów kwa-

TABELA 1. Niektóre właściwości, działanie i możliwe zastosowania Rysbaz w medycynie

Rysbaza	Występowania	Działanie	Budowa	Względna m. cząsteczkowa kD	Specyficzność substratowa	Aktywność w porównaniu z RNazą A	Możliwe zastosowanie
EDN	ziarnistości granulocytów kwasochłonnych	niszczenie pasożytów i bakterii aktywność przeciwo-wotworowa	134 AA glikoproteina	ok. 15,5	18S, 28S, 5S, 5,8 S rRNA tRNA	1	–
ECP	ziarnistości granulocytów kwasochłonnych	niszczenie pasożytów i bakterii aktywność przeciwo-wotworowa	133 AA glikoproteina	ok. 18,5	odcinki poli-pirymidynowe w RNA, poli U poli C	0,01	–
Onko-naza	jaja i zarodki zab	?	104 AA	ok. 12	18S, 28S, rRNA	0,01	leczenie nowotworów, immunotoksyny, aktywność anty HIV-1
BS-RN-aza	nasienie bydłce	immunosupresja	150 AA 2 formy dimerów 2 wiązania disiarczkowe	ok. 16	18S, 28S, rRNA, dsRNA słabo 5S, 5,8S rRNA, tRNA	–	immunosupresja leczenie nowotworów, immunotoksyny, aktywność anty HIV-1
Angio-genina	surowica ssaków	proliferyacja naczyń krwionośnych, wydzielanie prostaglandyn	123 AA	ok. 14	18S, 28S tRNA, mRNA	0,0001	immunotoksyny

sochłonnych [26, 53, 57, 72, 83]. W warunkach fizjologicznych ziarnistości te są uwalniane w miejscu kontaktu eozynofila i komórki docelowej.

Zjawiskiem analogicznym do efektu opisanego przez Gordona, a obserwowanym u ludzi są objawy neurologiczne, towarzyszące hipereozynofilii [72]. Eozynofilia jest prawdopodobnie także jednym z powodów uszkodzeń mięśnia sercowego, gdyż w martwych fragmentach tkanki, głównie wsierdzia i w ścianach naczyń włosowatych, stwierdzono ziarnistości pochodzące z granulocytów kwasochłonnych [26].

Rysbazy EDN i ECP wykazują ok. 35% homologii z sekwencją RN-azy A i 67% wzajemnej homologii ich sekwencji aminokwasowej. EDN, o względnej masie cząsteczkowej 15,5 kD, zawiera 134 aminokwasy, podczas gdy ECP, o względnej masie cząsteczkowej 18,5 kD, zawiera 133 aminokwasy [57, 83] (tab. 1). Geny kodujące EDN (RNS2) i ECP (RNS3) występują u wszystkich naczelnych i mają podobną strukturę. U człowieka zlokalizowane są w chromosomie 14 w paśmie q24–q31 i nie zawierają intronów [39].

Aktywność rybonukleolityczna EDN jest podobna do aktywności RN-azy A i około 100 razy wyższa niż aktywność ECP. EDN jest identyczna z „niewydzielniczą” RN-azą z wątroby [72] i śledziony oraz RNazą występującą w moczu [83]. ECP występuje w dwóch postaciach różniących się stopniem glikozylacji i wydajnie hydrolizuje tylko syntetyczne poli U i poli C, a w naturalnym RNA rozpoznaje sekwencje polipirymidynowe [71].

Badania *in vitro* wykazały, że ECP w stężeniu 10^{-7} M niszczy przywry *Schistosoma mansoni* [26], a także nicienie *Brugia pahangi* i *Brugia malayi*. Zarówno ECP, jak i EDN biorą udział w zwalczaniu larw włośnia krętego (*Trichinella spiralis*) [27], przy czym ECP jest skuteczne w mniejszych stężeniach niż EDN. Wyniki badań wskazują, że rysbazy te mają podobne działanie *in vivo*. Powierzchnia pasożytów z rodziny *Brugia* jest obdarzona silnym ładunkiem ujemnym, co przypuszczalnie ułatwia wiązanie dodatnio naładowanego ECP. Działanie omawianych RN-az jest specyficzne, gdyż RN-aza A, pomimo wyższej aktywności enzymatycznej, nie wykazuje działania toksycznego wobec tych pasożytów.

Interesujący jest fakt, że do skutecznego działania ECP nie jest jednak konieczna aktywność rybonukleolityczna, gdyż dodanie inhibitora RNazy nie chroniło pasożytów przed jego działaniem [27]. Wyjaśnia to niżej przedstawiony mechanizm działania ECP. Białko to tworzy pory w błonie cytoplazmatycznej komórki docelowej, co doprowadza do jej trwałej depolaryzacji, przy czym zdolność do wytwarzania porów jest niezależna od składu lipidowego błony. Kanały powstają w błonie zbudowanej z mieszaniny fosfolipidów, z samej fosfatydyloetanoloaminy lub fosfatydylocholiny oraz cholesterolu. Wykazano także, że pory te przepuszczają jony jedno- (K^+ , Na^+ , Cl^-) i dwuwartościowe (Ca^{+2} , Mg^{+2} , $EGTA^-$), a także sacharozę i glukozaminę. Ponadto ECP, poprzez oddziaływanie z błoną cytoplazmatyczną, ułatwia wnikanie EDN do komórki docelowej [57].

ONKONAZA

Onkonaza (*onconase*, Pannon, P-30 protein), występująca w oocytach i zarodkach żaby *Rana pipiens*, jest rysbazą o właściwościach neurotoksycznych i przeciwnowotworowych. Funkcja biologiczna i mechanizm działania tego białka są jak dotychczas słabo poznane [3] (tab. 1). Podobnie jak EDN i ECP oraz w podobnych stężeniach wywołuje ona efekt Gordona. W odróżnieniu od EDN i ECP aktywność neurotoksyczna onkonazy jest ściśle związana z jej aktywnością rybonukleolityczną [53].

Rozwój komórek licznych linii ustalonych nowotworów, m.in. białaczki HL-60, nowotworu A-253 (wywodzącego się z ślinianki podżuchwowej) i gruczolaka jelita grubego Colo320 CM, w obecności onkonazy zostają zatrzymane w fazie G_1 cyklu

komórkowego [3]. Wzrost fibroblastów, keratynocytów i limfocytów z krwi obwodowej był zakłócony tylko w nieznacznym stopniu w szerokim zakresie stężeń stosowanych do zwalczania komórek nowotworowych. W badaniach klinicznych nie stwierdzono powikłań neurologicznych podczas leczenia nowotworów przy dożylnym podawaniu onkonazy (w stężeniu $960 \mu\text{g}/\text{m}^2$ powierzchni ciała) [53].

Onkonaza jest białkiem o względnej masie cząsteczkowej ok. 12 kD, należącym do nadrodziny RN-azy A i w którym podobnie jak w RN-azie A obecne są cztery wiązania disiarczkowe, z których trzy są podobnie zlokalizowane jak w cząsteczce RN-azy A, a jedno w położeniu charakterystycznym dla onkonazy. W porównaniu do RN-azy A, w cząsteczce onkonazy zachowane są obszary hydrofobowe i wszystkie aminokwasy tworzące centrum katalityczne [3, 53]. Obecność metioniny na N-końcu zmniejsza aktywność przeciwnowotworową onkonazy [2]. Sekwencja aminokwasowa tego białka wykazuje 33% homologii do sekwencji białek EDN i ECP oraz 30% podobieństwa do RN-azy A [3].

Dowiedziano, że onkonaza wiąże się z zewnętrzną powierzchnią błony cytoplazmatycznej komórek ssaków, a w komórkach białaczkowych linii H9 hamuje prawie całkowicie replikację wirusa HIV-1. Sądzi się, że cząsteczki wirusa przekraczając błonę komórkową przenoszą onkonazę do wnętrza komórki, gdzie degraduje ona RNA, hamując tym samym replikację wirusa.

Onkonaza jest stosowana w badaniach klinicznych do terapii zakażeń wirusowych i odpornych na leczenie cytostatykami nowotworów, takich jak: nowotwory trzustki, rak sutka i niektóre typy nowotworów płuc [9, 23].

Podobne właściwości jak onkonaza wykazują lektyny izolowane z żab *Rana japonica* i *Rana catesbiana*, wykazujące pomiędzy sobą 80% homologii sekwencji aminokwasowej i znaczną homologię do RN-azy A [14, 83]. Wiążą one specyficznie glikoproteiny zawierające kwas sialowy, które występują na powierzchni błony cytoplazmatycznej wielu komórek nowotworowych [83]. Sekwencje aminokwasowe białek onkonazy i lektyny z *R. catesbiana* są w 53% zgodne. Sądzi się, że efekt cytotoksyczny onkonazy polega na następujących po sobie etapach, to jest: wiązaniu się z receptorami błonowymi, internalizacji i unieczynnieniu rybosomów przez hydrolizę rRNA.

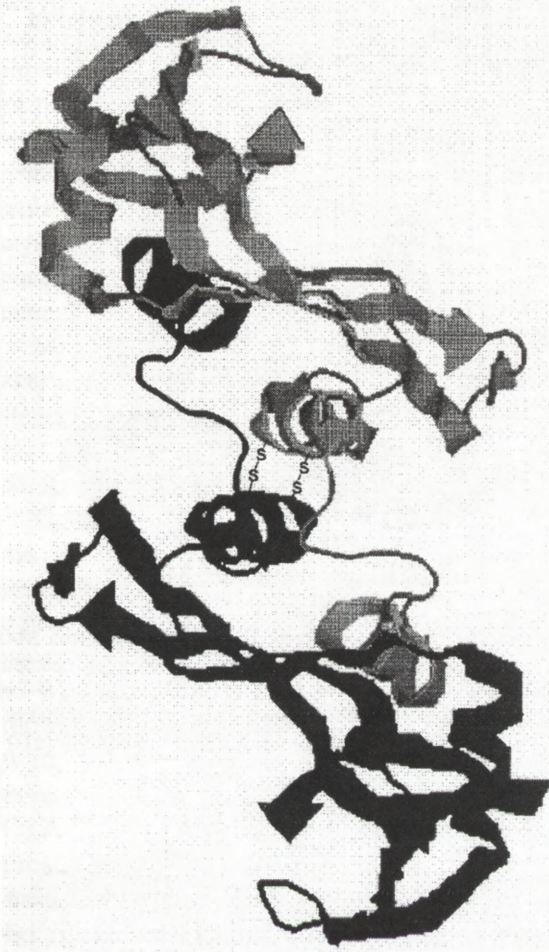
RN-aza Z NASIENIA BYKA (BS-RN-aza)

BS-RN-aza (*bovine seminal-RNase*) [EC 3.1.27.5], wyizolowana z nasienia byka (*Bos taurus*), występuje tylko u tego gatunku, aczkolwiek homologiczne geny stwierdzono w komórkach jelenia, żyrafy i owcy [31]. Białko to syntetyzowane jest w pęcherzykach nasiennych, a w nasieniu występuje w stężeniu do 1,5 mg/ml, co stanowi 3% całkowitej zawartości białka w nasieniu [30].

BS-RNaza wykazuje działanie przeciwnowotworowe i immunosupresyjne oraz hamuje spermatogenezę [12, 34, 35, 40, 43]. Powoduje m.in. bardzo znaczne zahamowanie wzrostu komórek linii ustalonej 3T3 fibroblastów mysich, transformowanych wirusem SV40, nie wpływając na komórki nietransformowane [60]. Stwierdzono, że enzym ten hamuje proliferację komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego indukowanych wirusem MSV – *murine sarcoma virus*, przenoszącym onkogen v-ki-ras (m.in. komórek nabłonka tarczycy i płuc) oraz działa *in vivo* na szczury z przeszczepialnym nowotworem wywołującym przerzuty do płuc. W organizmach myszy, którym przeszczepiono nowotwór płuc Lewisa, BS-RN-aza w dawce 20 $\mu\text{g/g}$ wagi ciała w 66% hamowała rozwój nowotworu i powstawanie przerzutów [35]. Sądzi się, że toksyczność BS-RN-azy wobec komórek nowotworowych może być spowodowana niższą ekspresją w tych komórkach naturalnego inhibitora RN-azy [51].

Względna masa cząsteczkowa BS-RN-azy wynosi ok. 16 kD, a jej cząsteczka zawiera 150 aminokwasów. Jako jedyna RN-aza należąca do nadrodziny RN-azy A, występuje w postaci dimeru (tab. 1). Taką strukturę dimeru zapewniają dwa wiązania disiarczkowe (Cys-31 i Cys-32) oraz wiązania hydrofobowe [30, 31, 32, 56]. Monomery tego enzymu wykazują 80% homologii sekwencji aminokwasowej z RN-azą A i podobną strukturę przestrzenną. Okazało się, iż działanie biologiczne wykazuje tylko struktura dimeryczna tego białka [40, 84].

Dimery BS-RNazy występują w dwóch formach molekularnych: $M \times M$ i $M = M$. W formie $M \times M$ N-końcowe, α -helikalne fragmenty o długości 17 aminokwasów są ułożone w taki sposób, że centrum katalityczne składa się z części pochodzących z obu podjednostek [2, 32, 33, 44, 51, 56] (rys. 1). W postaci $M = M$ centrum katalityczne zbudowane jest w całości z aminokwasów tworzących tę samą podjednostkę. Obie formy są w stanie równowagi dynamicznej w proporcji $M \times M : M = M$ jak 2 : 1 [12, 30, 31, 32, 51, 56]. Opisane zjawisko ma duże znaczenie biologiczne, bowiem silnie redukujące środowisko cytozolu powoduje redukcję wiązań disiarczkowych, nie powodując jednak redukcji wiązań wewnątrzcząsteczkowych [31]. W takim środowisku forma $M = M$ rozpada się na monomery, które są szybko inaktywowane przez występujący we wnętrzu komórek inhibitor RN-az, który nie hamuje jednak aktywności form dimerycznych. Forma $M \times M$ przyjmuje strukturę dimeru NCD (*noncovalent dimer*) utrzymywaną przez oddziaływania niekowalencyjne pomiędzy wzajemnie wymienionymi fragmentami N-końcowymi [32, 51, 56] (rys. 2). Forma $M \times M$ odznacza się większą cytotoxycznością niż forma $M = M$ [12], a jej aktywność jest modyfikowana kooperatywnie przez substrat [56]. Enzym ten wykazuje największe powinowactwo do 28S i 18S rRNA, słabiej natomiast działa na 5S, 5.8S i tRNA. Równoczesne zastosowanie kwasu retinowego stukrotnie wzmacnia cytotoxyczne działanie BS-RN-azy [81]. Podobnie jak w przypadku onkonazy, obecność metioniny na N-końcu (w pozycji -1) powoduje zmniejszenie aktywności przeciwnowotworowej tego białka [2].

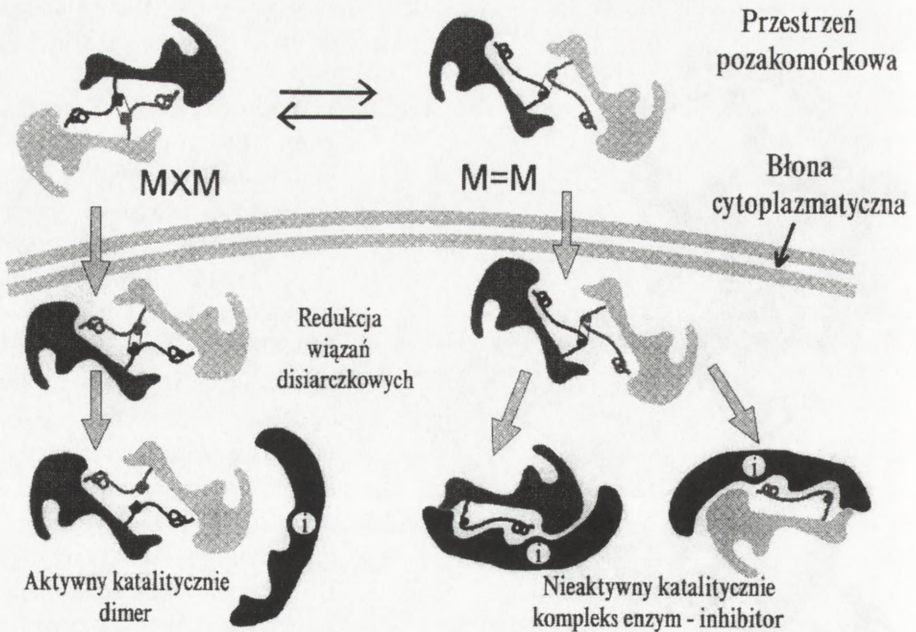


RYSUNEK 1. Struktura homodimeru BS-RN-azy: Poszczególne podjednostki rozrózniono odcieniem, regiony o strukturze α -heliksu i β -harmonijki zaznaczono wstęgą, regiony o strukturze nieregularnej zaznaczono linią ciągłą. W centrum cząsteczki dimeru znajdują się dwa wiązania disiarczkowe (wg bazy danych SWISS-PROT, zmodyfikowano)

BS-RN-aza wiąże się specyficznie z receptorami, które występują licznie w macierzy pozakomórkowej [40]. Komórki nowotworowe rosnące w zawiesinie wiążą bardzo niewielkie ilości tego enzymu i stąd są odporne na jego toksyczne działanie, podczas gdy komórki rosnące w postaci jednokomórkowej warstwy wiążą BS-RN-azę i są przez to białko niszczone. Równocześnie stwierdzono, że komórki nietransformowane również wiążą i wchłaniają BS-RN-azę, jednak w tym przypadku nie wykazuje ona toksycznego działania [40]. BS-RN-aza w postaci dimeru może przenikać dwuwarstwę lipidową, po czym wnika do aparatu Golgiego [81], powodując agregację pęcherzyków fosfolipidowych i stabilizuje ich strukturę [32, 37].

Enzym ten niszczy plemniki w kanalikach nasiennych, nie naruszając jednakże spermatogonii i innych komórek nabłonka plemnikotwórczego i stąd wstrzyknięty dojrzałym samcom szczura powoduje przejściową bezpłodność. Wykazano także, że właściwości immunosupresyjne nasienia zanikają po dodaniu przeciwciał skierowanych przeciwko BS-RN-azie. BS-RN-aza jest cytotoksyczna wobec komórek

zakazonych HIV-1 [84]. Interferon γ , w stężeniu fizjologicznym, powoduje zwiększenie aktywności S-RN-azy wobec dwuniciowego RNA. Ponieważ taki RNA występuje w cyklu rozwojowym wielu wirusów, może to mieć związek z przeciwwirusowym działaniem interferonu.



RYSUNEK 2. Wzajemne przemiany form molekularnych BS-RN-azy. Poza komórką forma $M \times M$ pozostaje w równowadze z formą $M = M$. Obie formy przechodzą przez błonę komórkową, gdzie następuje redukcja wiązań disiarczkowych. W przypadku homodimeru typu $M \times M$ (z wzajemną wymianą N-końców) jego struktura jest zachowana wewnątrz komórki, co zabezpiecza cząsteczkę białka przed inaktywacją przez inhibitor cytoplazmatyczny. Dysocjacja formy $M = M$ umożliwia wiązanie inhibitora (i)

ANGIOGENINA

Angiogenina jest jednym z wielu znanych czynników mogących wywołać angiogenezę m.in. podczas rozwoju zarodkowego, owulacji, implantacji, laktacji, odtworzenia tkanek po zranieniu i stanach zapalnych, a także podczas wzrostu nowotworów [11, 13, 83]. Podobnie działają m.in. TGF β – *transforming growth factor β* , TNF – *tumor necrosis factor*, VEGF – *vascular endothelial growth factor*, FGF – *fibroblast growth factor*.

Ludzka angiogenina, po raz pierwszy wyizolowana z hodowli komórek linii nowotworowej HT-29 (nowotwór okrężnicy), jest białkiem zbudowanym z 123 aminokwasów [1] (tab. 1). Obecność angiogeniny została stwierdzona także w surowicy krwi, fibroblastach i wątrobie [13, 48, 65]. Białko to wykazuje ok. 35% homologii sekwencji aminokwasów z RN-azą A i prawie niezmienioną strukturę centrum katalitycznego [1, 13]. Angiogeniny u różnych gatunków zwierząt mają bardzo podobną strukturę, a homologia sekwencji aminokwasowej angiogenin: mysiej, króliczej, wieprzowej i bydłowej w porównaniu do białka ludzkiego wynosi

odpowiednio: 75%, 73%, 66%, 65% [83]. Aminokwasy w pozycjach od 8 do 21 decydują o specyficzności oddziaływania angiogeniny z substratami, ligandami lub receptorami. Sekwencja aminokwasowa tego regionu białka, w dotychczas poznanych angiogeninach jest wysoce konserwatywna [11]. Wymiana tych aminokwasów na homologiczny region RN-azy A powoduje zmianę właściwości biologicznych tego białka, prowadząc np. do dziesięciokrotnego zwiększenia zdolności wywoływania angiogenezy, nie wpływając równocześnie na aktywność enzymatyczną wobec większości substratów (18S i 28S rRNA, tRNA). Tak zmieniona angiogenina wykazuje ok. 30 razy mniejszą zdolność hamowania biosyntezy białka *in vitro*, podczas gdy RN-aza A, pozbawiona tego fragmentu aminokwasowego, nie ujawnia zmian swoich właściwości katalitycznych [11].

Mimo że aktywność enzymatyczna angiogeniny jest 10^5 – 10^6 razy niższa od aktywności RN-azy A [11], to jej efekt biologiczny ujawnia się już w małym stężeniu [11, 65]. Angiogenina hydrolizuje wszystkie badane rodzaje RNA (tRNA, 18S i 28S rRNA, mRNA), aczkolwiek w literaturze przedmiotu zwraca się uwagę na specyficzność hydrolizy rRNA [11] i tRNA [65].

Gen angiogeniny znajduje się w chromosomie 14 w paśmie q11–q13 [79] i nie zawiera intronów. Występują w nim trzy powtórzone sekwencje Alu. Interesujące jest to, że rearanżacja genów w tym regionie chromosomu jest często obserwowana u ludzi chorych na *ataxia teleangiectasia*, u których stwierdza się nietypowy rozrost naczyń krwionośnych oraz defekty immunologiczne i neurologiczne [79].

Wykazano, że angiogenina indukuje powstawanie naczyń krwionośnych w kosmówce omoczniowej (*chorioallantoic*) zarodków kurczęcia i w rogówce oka szczura w stężeniach porównywalnych do tych, które wywołują inne czynniki angiogenezy *in vitro* [14]. Angiogenina w śródbłonku naczyń krwionośnych aktywuje fosfolipazę C i A₂, indukuje powstawanie fosfatydyloinozytoli, diacylogliceroli oraz wydzielanie prostacyklin [8]. Ponieważ maksymalna stymulacja komórek śródbłonka do wydzielania prostacyklin ujawnia się poniżej stężenia angiogeniny we krwi, etapem ograniczającym działanie tego białka wydaje się być ekspresja receptora [8]. Regulacja wydzielania prostacyklin w komórkach jest mechanizmem zabezpieczającym naczynia krwionośne przed odkładaniem się na ich wewnętrznych powierzchniach płytek krwi. Dowiedziono w badaniach *in vitro*, że angiogenina wykazuje działanie immunosupresyjne, hamuje namnażanie ludzkich limfocytów stymulowanych przez hemoaglutyninę, konkawalinę A i allogeniczne limfocyty [8, 11].

Ustalono, że angiogenina nie wpływa na wzrost komórek linii nowotworów ludzkich [13], zarodków krowy i myszy oraz na spermatogenezę u myszy. W hodowli komórkowej, unieruchomiona na podłożu stałym, powoduje przyleganie i rozwój komórek śródbłonka i fibroblastów [70]. Jak wykazano w doświadczeniach *in vitro*, komórki wymagające do wzrostu adhezji produkują większe ilości angiogeniny [48]. Angiogenina wiąże się z macierzą pozakomórkową (ECM), z którą w warunkach prawidłowych nie ma kontaktu jako białko osocza krwi. Z tego względu przypuszcza

się, że białko to bierze udział w naprawie uszkodzeń naczyń krwionośnych, powodując adhezję i migrację komórek [70].

Angiogenina dociera do komórki docelowej dzięki endocytozie, a następnie, podobnie jak niektóre inne czynniki angiogenezy, gromadzi się w jąderku [13, 49]. Białkiem wiążącym angiogeninę jest α -aktyna [28, 49]. Angiogenina indukuje polimeryzację aktyny w stężeniach niższych od optymalnego dla polimeryzacji spontanicznej, co w konsekwencji może spowodować zmianę kształtu, migrację, proliferację i różnicowanie komórki. Wynikiem tych zmian może być wytworzenie naczynia włosowatego. Reorganizację pozakomórkowej aktyny w śródbłonku rogówki obserwowano podczas tworzenia i wzrostu naczyń [13, 28]. Angiogenina oddziałuje ze specyficznym receptorem przez inną domenę białka (aminokwasy 8 do 21) [11, 79] niż ta, która stanowi centrum katalityczne (aminokwasy 60 do 68) [1, 8, 49, 61]. Prawdopodobnie w wyniku tego oddziaływania cząsteczka angiogeniny tak zmienia swą konformację (przemieszczenie Gln-117 w położenie podobne do występującego w centrum katalitycznym RN-azy A), że jej aktywność enzymatyczna wzrasta od 2 do 40 razy. Może to mieć duże znaczenie w mechanizmie jej działania [1], gdyż wykazano, że efekt biologiczny tego białka jest ściśle związany z jego aktywnością rybonukleolityczną [11, 13, 61, 65, 66].

Duże zainteresowanie angiogeniną wynika z jej równoczesnej aktywności rybonukleolitycznej i immunosupresyjnej, ponieważ obie te aktywności mogą współdziałać w rozwoju nowotworów [43].

IMMUNOTOKSYNY I ICH ZASTOSOWANIE

Immunotoksyny są to białka powstałe w wyniku połączenia *in vitro* przeciwciała z białkiem o właściwościach toksycznych. Działanie takie wykazują rysbazy pochodzące z mikroorganizmów i roślin [80], a także rysbazy zwierzęce, związane ze specyficznymi przeciwciałami [16, 52, 63, 64, 83].

Chociaż naturalnie występujące RN-azy m. in. trichosantyna, bryodyna i TAP 29 [80] są wykorzystywane do zwalczania infekcji wirusowych, w tym wirusem HIV-1 [78], to największe nadzieje budzi możliwość konstruowania sztucznych immunotoksyn i chimer białek cytotoksycznych, działających wybiórczo na komórki nowotworowe. Białka cytotoksyczne działają katalitycznie, a nie stechiometrycznie i wymagają do swego działania internalizacji. Właściwości te powinny zapewnić przeżycie komórek zdrowych, nawet położonych blisko skupiska komórek nowotworowych. Tego warunku nie spełniają np. przeciwciała z przyłączonymi izotopami promieniotwórczymi lub powierzchniowo czynnymi związkami cytotoxicznymi [63].

Immunotoksyny mogą być wytworzone poprzez chemiczne połączenie przeciwciała i toksyny (np. monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciw transferynie

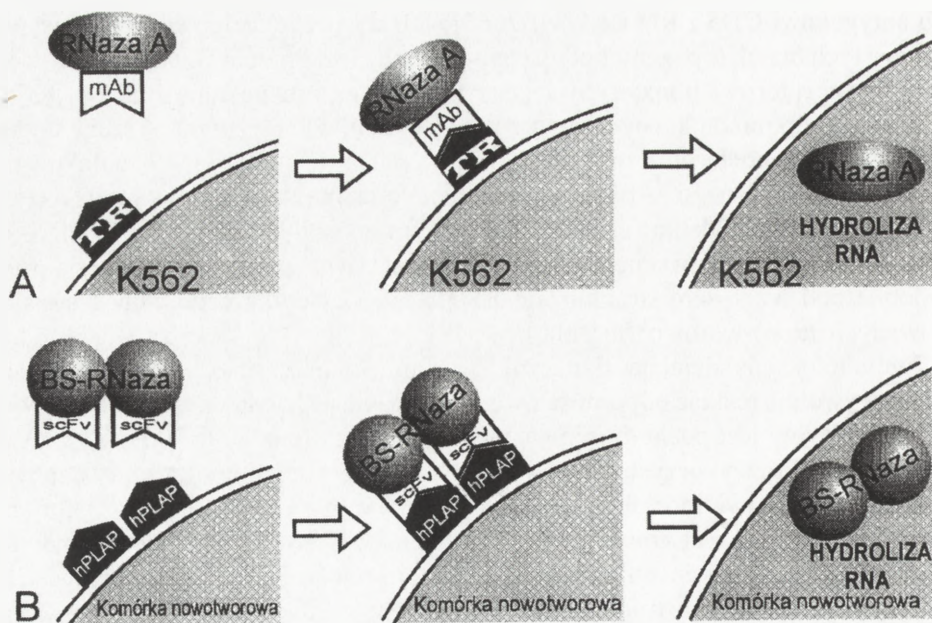
lub antygenowi CD5 i RN-azy A [52, 63]) lub też przez fuzję genów kodujących syntezę tych białek (np. genu kodującego łańcuch ciężki przeciwciała skierowanego przeciw receptorowi transferyny i genu kodującego angiogelinę [62, 63, 83]).

Niektóre immunotoksyny wytworzone metodami chemicznymi okazały się nieaktywne, gdyż połączenie toksyny z przeciwciałem prowadziło do zablokowania centrum katalicznego. Aby tego uniknąć, skonstruowano homologi RN-azy A zawierające dwie dodatkowe reszty cysteiny w tym samym miejscu co BS-RN-aza (Cys-31 i Cys-32). Powstałe białko tworzyło aktywne katalicznie homodimery, podobne pod względem struktury do BS-RNazy i cytotoksyczne wobec transformowanych nowotworowo fibroblastów [18].

Immunotoksyny działają skutecznie w warunkach *in vitro*, natomiast *in vivo* często wywołują reakcje odpornościowe, szczególnie jeśli jedna z części składowych immunotoksyny jest pochodzenia bakteryjnego lub roślinnego [63]. Powikłań tych można uniknąć wykorzystując ludzką RN-azę A i jej homologi, występujące w warunkach prawidłowych w płynach ustrojowych [52, 62, 63, 83]. Jednym z takich przykładów jest immunotoksyna złożona z RN-azy A i przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw receptorom transferyny lub antygenowi CD5 limfocytów T. Tak konstruowane białka okazały się toksyczne wyłącznie wobec komórek mających na swej powierzchni odpowiedni receptor. Immunotoksyny, zawierające przeciwciała przeciw receptorowi transferyny, były toksyczne tylko wobec ludzkich komórek K562, U251 i Jurkat [52, 63, 83] (rys. 3 A). Równie toksyczna dla komórek K562 okazała się RN-aza A połączona z transferyną.

Wytworzenie immunotoksyn poprzez fuzję genów w niektórych przypadkach nie dało oczekiwanych wyników. Uzyskiwano niski poziom ekspresji tych genów przypuszczalnie spowodowany selekcją komórek produkujących małe ilości immunotoksyny lub eliminacją komórek, które produkowały większe ilości toksyny. Metodą fuzji genów skonstruowano silną toksynę przechodzącą przez błony komórek docelowych. Toksyna ta składa się z barnazy (RN-azy z *Bacillus amyloliquefaciens*) i części egzotoksyny PE (z *Pseudomonas aeruginosa*) [83]. Za pomocą fuzji genu kodującego syntezę przeciwciała przeciw fosfatazie alkalicznej z genem BS-RN-azy, skonstruowano immunotoksynę skierowaną przeciw komórkom mającym na swej powierzchni łożyskową fosfatazę alkaliczną (rys. 3 B). Stwarza to możliwość wykorzystania tego białka w celach terapeutycznych, gdyż enzym ten ulega ekspresji w komórkach wielu linii nowotworów gonad [16].

Jedna z firm farmaceutycznych opatentowała technologię produkcji cytotoksyn opartą na zmodyfikowanym genie rysbazy – geloniny (*gelonin*, RIP I otrzymanej z nasion rośliny *Gelonium multiflorum*). Reszty cysteiny w otrzymanym w ten sposób analogu geloniny, umożliwiały wiązanie się z białkiem rozpoznającym specyficzny receptor. W tym samym patencie zastrzeżono również zmodyfikowane sekwencje genów momordyny (*momordin*) I i II oraz RIP z jęczmienia (*barley ribosome-inactivating protein* – BRIP) i immunotoksyny zbudowanej



RYSUNEK 3. Schemat działania chimer cytotoksycznych rybonukleaz (*cytotoxic ribonuclease chimeras*, CRCs) i immunotoksyn: A – Działanie CRCs uzyskanych drogą chemicznego połączenia wiązaniem disiarczkowym. Otrzymane białko 454A12-RN-aza zbudowane jest z przeciwciała monoklonalnego (mAb) 454A12, skierowanego przeciw receptorom ludzkiej transferyny (TR) i RN-azy A. Receptor transferyny występuje w komórkach nowotworowych K562 (*human erythroleukemia-derived cell line*), U251 (*human glioblastoma*) i Jurkat (*human leukemia T cell line*). B – Działanie immunotoksyny otrzymanej drogą fuzji genów kodujących przeciwciało (scFv – *single-chain antibody*) uzyskane z IgG H17E2, skierowane przeciw antygenowi ludzkiej zasadowej fosfatazy łożyskowej (hPLAP) i genu RN-azy z nasienia byka (BS-RN-azy). Otrzymane białko scFv-BSRN-aza występuje w formie dimeru. Ekspresja zasadowej fosfatazy łożyskowej następuje w ludzkich nowotworach jajników i jąder. Uzyskane w ten sposób białka cytotoksyczne łączą się z antygenami na powierzchni komórek docelowych, w nieznanym dotychczas sposób wnikają do cytozolu i przypuszczalnie hydrolizując RNA, doprowadzają do śmierci komórek

z GLIOMAB-H – przeciwciała skierowanego przeciw glejakowi, czerniakowi złośliwemu i nowotworowi nadnerczy. Immunotoksyna ta zawiera przeciwciało o 100% homologii do ludzkiej sekwencji aminokwasowej przeciwciała i jest już stosowana w terapii (informacja bieżąca – patent).

W ostatnich latach prowadzono intensywne badania immunotoksyn (których składnikiem była często gelonina [5, 20, 29, 75]), wykazujących wybiórcze działanie na komórki nowotworowe [15, 41, 42, 69]. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że immunotoksyny te w przyszłości mogłyby być zastosowane w leczeniu gruczolakoraka płuc [69], białaczki szpikowej [54, 82], chłoniaka [54] lub czerniaka złośliwego [59]. Połączenie geloniny z monoklonalnym przeciwciałem skierowanym przeciw glikoproteinie gp 240, występującej na powierzchni większości komórek

czerniaka, niszczy komórki tego nowotworu [50]. Podobnie gelonina, połączona z przeciwciałem rozpoznającym antygen CD33, stanowi potencjalny lek w terapii białaczki szpikowej [45]. Z kolei przeciwciało 15A8 połączone z geloniną może być w przyszłości zastosowane w terapii raka sutka [58]. Badania *in vitro* potwierdzają wybiórczą cytotoksyczność połączeń geloniny z interleukiną 2 w stosunku do komórek wykazujących ekspresję receptora tej interleukiny [46].

Wyniki badań wskazują też na możliwość zastosowania immunotoksyn zawierających geloninę w leczeniu innych schorzeń, takich jak np. zapalenia nerek o podłożu autoimmunizacyjnym [47], malarii [73] i niszczeniu komórek zainfekowanych cytomegalowirusem [4]. Skonstruowano immunotoksyny złożone z przeciwciała skierowanego przeciw komórkom T i geloniny bądź rycyny [7, 24] oraz geloniny i przeciwciała skierowanego przeciw alfa-fetoproteinie [42], a także połączenia geloniny z innymi przeciwciałami [6, 19].

Obecnie rozpoczęto badania nad tworzeniem hormonotoksyn. W skład tych białek wchodzi gelonina i owcza lutropina (oLH) [67, 68]. Takie połączenia mogłyby być w przyszłości stosowane do niszczenia specyficznych komórek docelowych w gonadach [38].

Skonstruowano również immunotoksyny, w których skład wchodzi łańcuch A rycyny i różne przeciwciała np. przeciw ludzkim limfocytom [10], które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób wywołanych nadmierną proliferacją limfocytów [55, 85]. Bada się także immunotoksyny zawierające łańcuch A rycyny i przeciwciało RFT5 z nadzieją ich zastosowania w terapii chłoniaka Hodgkina [22], przeciwciało N901 testowane w leczeniu raka płuc [17, 36] lub przeciwciało CD7 sprawdzane w terapii ostrej białaczki limfocytarnej [77]. W terapii białaczki może też znaleźć zastosowanie nowa klasa białek cytotoksycznych uzyskanych dzięki połączeniu łańcucha B rycyny z interleukiną-2 [25].

Immunotoksyna złożona z łańcucha A rycyny i przeciwciała 4197X hamuje podziały ludzkich komórek nabłonka soczewki oka *in vitro*. W przyszłości, być może, znajdzie zastosowanie w zapobieganiu powikłaniom po operacyjnym leczeniu zaćmy [74].

Do leczenia miastena Gravis skonstruowano immunotoksyny składające się z receptora acetylocholino połączonego z łańcuchem A rycyny lub z izotopem jodu [^{125}I]. Próby laboratoryjne *in vitro* i *in vivo* na szczurach zakończyły się powodzeniem, a obecnie prowadzone są wstępne badania nad ewentualnym klinicznym zastosowaniem tych immunotoksyn [21, 76].

Prowadzone są także prace nad wykorzystaniem rysbaz – rycyny i EDN w wytworzeniu immunotoksyn drugiej generacji – otrzymanych w wyniku fuzji zmutowanych genów toksyn i przeciwciała. Celem tych badań jest uzyskanie dużej specyficzności ich działania. Już obecnie trwają próby ich wykorzystania przy przeszczepach szpiku kostnego i w zwalczaniu nowotworów mózgu [84].

UWAGI KOŃCOWE

Omówione rysbazy występujące w organizmach ludzkim i zwierzęcych mają właściwości neurotoksyczne, angiogeniczne, immunosupresyjne, antywirusowe i ochraniające organizm przed pasożytami. Jednak cechą wspólną prawie wszystkich rysbaz jest ich cytotoksyczność, która jest wynikiem ich aktywności rybonukleolitycznej. Właściwości te mogą być w przyszłości wykorzystane do zwalczania nowotworów, komórek zainfekowanych wirusami oraz w leczeniu innych chorób.

Szczególnie zastosowanie rysbaz w tworzeniu immunotoksyn i innych białek chimerycznych, selektywnie niszczących komórki może mieć w przyszłości duże znaczenie w medycynie.

W ostatnich latach poszukuje się nowych substancji aktywnych biologicznie o cechach rysbaz, które wykazują działanie cytotoksyczne i mogą być zastosowane jako składniki immunotoksyn. Trwają też badania nad modyfikacją znanych już rysbaz, które pozwolą na uzyskanie białek o lepszych właściwościach terapeutycznych.

LITERATURA

- [1] ACHARYA KR, SHAPIRO R, ALLEN SC, RIORDAN JF, VALLEE BL. Crystal structure of human angiogenin reveals the structural basis for its functional divergence from ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2915–2919.
- [2] ADINOLFI BS, CAFARO V, DALESSIO G, DI DONATO A. Full antitumor action of recombinant seminal ribonuclease depends on the removal of its N-terminal methionine. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; **213**: 525–532.
- [3] ARDELT W, MIKULSKI SM, SHOGEN K. Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. *J Biol Chem* 1991; **266**: 245–251.
- [4] BARNETT BB, SMEE DF, MALEK SM, SIDWELL R W. Selective cytotoxicity towards cytomegalovirus-infected cells by immunotoxins consisting of gelonin linked to anti-cytomegalovirus antibody. *Antiviral Res* 1995; **28**: 93–100.
- [5] BERNHARD SL, BETTER M, FISHWILD DM, LANE JA, ORME AE, GARRISON DA, BIRR CA, LEI SP, CARROLL SF. Cysteine analogs of recombinant barley ribosome inactivating protein from antibody conjugates with enhanced stability and potency *in vitro*. *Bioconjug Chem* 1994; **5**: 126–132.
- [6] BETTER M, BERNHARD SL, FISHWILD DM, NOLAN PA, BAUER RJ, KUNG AH, CARROLL SF. Gelonin analogs with engineered cysteine residues from antibody immunconjugates with unique properties. *J Biol Chem* 1994; **269**: 9644–9650.
- [7] BETTER M. T-cell-targeted immunofusion protein from *E. coli*. *Ann N Y Acad Sci* 1996; **782**: 544–554.
- [8] BICKNELL R, VALLEE BL. Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5961–5965.
- [9] BOHORFOUSH AG. Internet 1997; Adres: <http://www.grand-rounds.com/3no3Onconase.html>

- [10] BOLOGNESI A, TAZZARI PL, TASSI C, GROMO G, GOBBI M, STIRPE F. A comparison of anti-lymphocyte immunotoxins containing different ribosome-inactivating proteins and antibodies. *Clin Exp Immunol* 1992; **89**: 341–346.
- [11] BOND M D, VALLEE BL. Replacement of residues 8–22 of angiogenin with 7–21 of RNase A selectively affects protein synthesis inhibition and angiogenesis. *Biochemistry* 1990; **29**: 3341–3349.
- [12] CAFARO V, DE LORENZO C, PICCOLI R, BRACALE A, MASTRONICOLA MR, DI DONATO A, DALESSIO G. The antitumor action of seminalribonuclease and its quaternary conformations. *FEBS Lett* 1995; **359**: 31–34.
- [13] COCKERILL GW, GAMBLE JR, VADAS MA. Angiogenesis: Models and modulators. *Int Rev Cytol* 1995; **159**: 113–160.
- [14] DALESSIO G. New and cryptic biological messages from RNases. *Trends Cell Biol* 1993; **3**: 106–109.
- [15] DELPRINO L, GIACOMOTTI M, DOSIO F, BRUSA P, CERUTI M, GROSA G, CATTEL L. Toxin-targeted design for anticancer therapy. II: Preparation and biological comparison of different chemically linked gelonin-antibody conjugates. *J Pharm Sci* 1993; **82**: 699–704.
- [16] DEONARIAN MP, EPENETOS AA. Targeting phosphodiesterases as a strategy for killing tumor cells. *Cell Biophysics* 1994; **24/25**: 249–257.
- [17] DERBYSHIRE EJ, de LEIJ L, WAWRZYNCZAK EJ. Refinement of an indirect immunotoxin assay of monoclonal antibodies recognising the human small cell lung cancer cluster 2 antigen. *Br J Cancer* 1993; **67**: 1242–1247.
- [18] DI DONATO A, CAFARO V, DALESSIO G. Ribonuclease A can be transformed into a dimeric ribonuclease with antitumor activity. *J Biol Chem* 1994; **269**: 17394–17396.
- [19] DOSIO F, BRUSA P, DELPRINO L, GROSA G, CERUTI M, CATTEL L. A new approach in the synthesis of immunotoxins: ribosome inactivating protein noncovalently bound to monoclonal antibody. *J Pharm Sci* 1994; **83**: 206–211.
- [20] DOSIO F, BRUSA P, CROSASSO P, FRUTTERO C, CATTEL L, BOLOGNESI A. Synthesis of different immunotoxins composed by ribosome inactivating proteins non-covalently bound to monoclonal antibody. *Farmaco* 1996; **51**: 477–482.
- [21] DRACHMAN D B. Myasthenia Gravis. *New England J Med*. 1994; **330**: 1797–1810.
- [22] ENGERT A, DIEHL V, SCHNELL R, RADSZUHN A, HATWIG M T, DRILLICH S, SCHON G, BOHLEN H, TESCH H, HANSMANN ML, BARTH S, SCHINDLER J, GHETIE V, UHR J, VITETTA E. A phase-I study of an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in patients with refractory Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; **89**: 403–410.
- [23] FALKNER R J & COMP. Internet 1997; Adres: <http://www.streetnet.com/research/falkner/accel.html#comp>.
- [24] FISHWILD DM, WU HM, CARROLL SF, BERNHARD SL. Characterization of the increased cytotoxicity of gelonin anti-T cell immunoconjugates compared with ricin A chain immunoconjugates. *Clin Exp Immunol* 1994; **97**: 10–18.
- [25] FRANKEL AE, FU T, BURBAGE C, CHANDLER J, WILLINGHAM MC, TAGGE EP. IL2 fused to lectin-deficient ricin is toxic to human leukemia cells expressing the IL2 receptor. *Leukemia* 1997; **11**: 22–30.
- [26] GLEICH GJ, ADOLPHSON CR. The eosinophilic leucocyte: Structure and function. *Adv Immunol* 1986; **39**: 177–253.
- [27] HAMANN KJ, GLEICH GJ, CHECKEL JL, LOEGERING DA, McCALL JW, BARKER RL. *In vitro* killing of microfilariae of *Brugia phangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. *J Immunol* 1990; **144**: 3166–3173.
- [28] HU G-F, STRYDOM DJ, FETT JW, RIORDAN JF, VALLEE BL. Actin is a binding protein for angiogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 1217–1221.

- [29] JOUVENCEAU A, BILLARD JM, LAMOUR Y, DUTAR P. Potentiation of glutamatergic EPSPs in rat CA1 hippocampal neurons after selective cholinergic denervation by 192 IgG-saporin. *Synapse* 1997; **26**: 292–300.
- [30] KIM J-S, RAINES RT. A misfolded but active dimer of bovine seminal ribonuclease. *Eur J Biochem* 1994; **224**: 109–114.
- [31] KIM J-S, SOUČEK J, MATOUSEK J, RAINES R T. Structural basis for the biological activities of bovine seminal ribonuclease. *J Biol Chem* 1995; **270**: 10525–10530.
- [32] KIM J-S, SOUČEK J, MATOUSEK J, RAINES RT. Mechanism of ribonuclease cytotoxicity. *J Biol Chem* 1995; **270**: 31097–31102.
- [33] KIM J-S, SOUČEK J, MATOUSEK J, RAINES RT. Catalytic activity of bovine seminal ribonuclease is essential for its immunosuppressive and other biological activities. *Biochem J* 1995; **308**: 547–550.
- [34] LACCETTI P, PORTELLA G, MASTRONICOLA MR, RUSSO A, PICCOLI R, DALESSIO G, VECCHIO G. *In vivo* and *in vitro* growth-inhibitory effect of bovine seminal ribonuclease on a system of rat thyroid epithelial transformed cells and tumors. *Cancer Res* 1992; **52**: 4582–4586.
- [35] LACCETTI P, SPALLETTI-CERNIA D, PORTELLA G, DE CORATO P, DALESSIO G, VECCHIO G. Seminal ribonuclease inhibits tumor growth and reduces the metastatic potential of Lewis lung carcinoma. *Cancer Res* 1994; **54**: 4253–4256.
- [36] LYNCH TJ Jr, LAMBERT JM, CORAL F, SHEFNER J, WEN P, BLATTLER WA, COLLINSON AR, ARINIELLO PD, BRAMAN G, COOK S, ESSELTINE D, ELIAS A, SKARIN A, RITZ J. Immunotoxin therapy of small cell lung cancer: a phase I study of N901-blocked ricin. *J Clin Oncol* 1997; **15**: 723–734.
- [37] MANCHEO JM, GASSET M, OADERRA M, GAVILANES JG, DALESSIO G. Bovine seminal ribonuclease destabilizes negatively charged membranes. *Biochem Biophys Res Comm* 1994; **199**: 119–124.
- [38] MARCIL J, RAVINDRANATH N, SAIRAM MR. Cytotoxic activity of lurupin-gelonin conjugate in mouse Leydig tumor cells: potentiation of the hormonotoxin activity by different drugs. *Mol Cell Endocrinol* 1993; **92**: 83–90.
- [39] MASTRIANNI DM, EDDY RL, ROSENBERG HF, CORRETTE SE, SHOWS TB, TENEN DG, ACKERMAN SJ. Localization of the human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (Lysophospholipase) gene (CLC) to chromosome 19 and the human Ribonuclease 2 (Eosinophil-Derived Neuro-toxin) and Ribonuclease 3 (Eosinophil Cationic Protein) genes (RNS2 and RNS3) to chromosome 14. *Genomics* 1992; **13**: 240–242.
- [40] MASTRONICOLA MR, PICCOLI R, DALESSIO G. Key extracellular and intracellular steps in the antitumor action of seminal ribonuclease. *Eur J Biochem* 1995; **230**: 242–249.
- [41] MASUDA K, TAKAHASHI K, HIRANO K, TAKAGISHI Y. Selective antitumor effect of thioether-linked immunotoxins composed of gelonin and monoclonal antibody to alpha-fetoprotein or its F(ab)2 fragment. *Tumour Biol* 1994; **15**: 175–183.
- [42] MASUDA K, TAKAHASHI K, NAGATA S, HIRANO K, TAKAGISHI Y. Immunotoxins composed of monoclonal antibody to alpha-fetoprotein and gelonin as a potent hepatoma-targeted drug delivery system. *J Drug Target* 1994; **2**: 323–331.
- [43] MATOUSEK J, SOUCEK J, RIHA J, ZANKEL TR, BENNER SA. Immunosuppressive activity of angiogenin in comparison with bovine seminal ribonuclease and pancreatic ribonuclease. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1995; **112**: 235–241.
- [44] MAZZARELLA L, VITAGLIANO L, ZAGARI A. Swapping structural determinants of ribonucleases: An energetic analysis of the hinge peptide 16–22. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 3799–3803.
- [45] MCGRAW KJ, ROSENBLUM MG, CHEUNG L, SCHEINBERG DA. Characterization of murine and humanized anti-CD33, gelonin immunotoxins reactive against myeloid leukemias. *Cancer Immunol Immunother* 1994; **39**: 367–374.

- [46] McINTYRE GD, SCOTT CF Jr, RITZ J, BLATTLER WA, LAMBERT JM. Preparation and characterization of interleukin-2-gelonin conjugates made using different cross-linking reagents. *Bioconjug Chem* 1994; **5**: 88–97.
- [47] MISQUITH S, SUROLIA A. *In vivo* treatment of Heymanns Nephritis using a cytotoxic protein-toxin conjugate. *FEBS Lett* 1995; **373**: 151–154.
- [48] MOENNER M, GUSSE M, HATZI E, BADET J. The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a biological function not only related to angiogenesis. *Eur J Biochem* 1994; **226**: 483–490.
- [49] MOROIANU J, RIORDAN J. Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1677–1681.
- [50] MUJOO K, CHEUNG L, MURRAY JL, ROSENBLUM MG. Pharmacokinetics, tissue distribution, and *in vivo* antitumor effects of the antimelanoma immunotoxin ZME-gelonin. *Cancer Immunol Immunother* 1995; **40**: 339–345.
- [51] MURTHY BS, DE LORENZO C, PICCOLI R, DALESSIO G, SIRDESHMUKH R. Effects of protein RNase inhibitor and substrate on the quaternary structures of bovine seminal RNase. *Biochemistry* 1996; **35**: 3880–3885.
- [52] NEWTON DL, ILERCIL O, LASKE DW, OLDFIELD E, RYBAK SM, YOULE RJ. Cytotoxic ribonuclease chimeras. *J Biol Chem* 1992; **267**: 19572–19578.
- [53] NEWTON DL, WALBRIDGE S, MIKULSKI SM, ARDELT W, SHOGEN K, ACKERMAN SJ, RYBAK SM, YOULE RJ. Toxicity of an antitumor to Purkinje neurons. *J Neuroscience* 1994; **14**: 538–544.
- [54] OBOYLE KP, COLLETTI D, MAZUREK C, WANG Y, RAY SK, DIAMOND B, ROSENBLUM MG, EPSTEIN AL, SHOCHAT D, DUTCHER JP, et al. Potentiation of antiproliferative effects of monoclonal antibody Lym-1 and immunconjugate Lym-1-gelonin on human Burkitts lymphoma cells with gamma-interferon and tumor necrosis factor. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1995; **18**: 221–230.
- [55] PAUZA ME, DOUMBIA SO, PANNELL CA. Construction and characterization of human CD7-specific single-chain Fv immunotoxins. *J Immunol* 1997; **158**: 3259–3269.
- [56] PICCOLI R, TAMBURRINI M, PICCIALI G, DI DONATO A, PARENTE A, DALESSIO G. The dual-mode quaternary structure of seminal RNase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 1870–1874.
- [57] ROSENBERG HF, TENEN DG, ACKERMAN SJ. Molecular cloning of the human eosinophil-derived neurotoxin: A member of the ribonuclease gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 4460–4464.
- [58] ROSENBLUM MG, ZUCKERMAN JE, MARKS JW, ROTBEIN J, ALLEN WR. A gelonin-containing immunotoxin directed against human breast carcinoma. *Mol Biother* 1992; **4**: 122–129.
- [59] ROSENBLUM MG, CHEUNG L, KIM SK, MUJOOK, DONATONJ, MURRAY JL. Cellular resistance to the antimelanoma immunotoxin ZME-gelonin and strategies to target resistant cells. *Cancer Immunol Immunother* 1996; **42**: 115–121.
- [60] RUSSO N, DE NIGRIS M, DI DONATO A, DALESSIO G. Expression of native dimers of bovine seminal ribonuclease in a eucaryotic cell system. *FEBS Letters* 1993; **318**: 242–244.
- [61] RUSSO N, SHAPIRO R, ACHARYA KR, RIORDAN JF, VALLEE BL. Role of glutamine-117 in the ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2920–2924.
- [62] RYBAK SM, HOOGENBOOM HR, MEADE HM, RAUS JCM, SCHWARTZ D, YOULE RJ. Humanization of immunotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 3165–3169.
- [63] RYBAK SM, HOOGENBOOM HR, NEWTON DL, RAUS JCM, YOULE RJ. Rational immunotherapy with ribonuclease chimeras. *Cell Biophysics* 1992; **21**: 121–138.
- [64] SANTANCHE S, BELLELLI A, BRUNORI M. The unusual stability of saporin, a candidate for the synthesis of immunotoxins. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **234**: 129–132.

- [65] SAXENA SK, RYBAK SM, DAVEY RT, YOULE RJ, ACKERMAN EJ. Angiogenin is a cytotoxic, tRNA-specific ribonuclease in the RNase A superfamily. *J Biol Chem* 1992; **267**: 21982–21986.
- [66] SHAPIRO R, VALLEE BL. Identification of functional arginines in human angiogenin by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 1992; **31**: 12477–12485.
- [67] SINGH V, CURTISS R. Disulfide linked alpha oLH-gelonin conjugate failed to recombine with beta oLH subunit to generate bioeffective hormonotoxin. *Mol Cell Biochem* 1993; **120**: 95–102.
- [68] SINGH V, CURTISS R. Hormonotoxins: the role of positive charge of lysine residue on the immunological, biological and cytotoxic properties of ovine lutropin-S-S-gelonin conjugates. *Mol Cell Biochem* 1994; **130**: 91–101.
- [69] SNIDER JM, BUSHNELL LJ, CHEN LC, LANZA LA. c-erbB-2/p185-directed therapy in human lung adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg* 1996; **62**: 1454–1459.
- [70] SONCIN F. Angiogenin supports endothelial and fibroblast cell adhesion. *Cell Biol* 1992; **89**: 2232–2236.
- [71] SORRENTINO S, GLITZ DG. Ribonuclease activity and substrate preference of human eosinophil cationic protein (ECP). *FEBS Lett* 1991; **288**: 23–26.
- [72] SORRENTINO S, GLITZ DG, HAMANN KJ, LOEGERING DA, CHECKEL JL, GLEICH GJ. Eosinophil-derived neurotoxin and human liver ribonuclease. Identity of structure and linkage of neurotoxicity to nuclease activity. *J Biol Chem* 1992; **267**: 14859–14865.
- [73] SUROLIA N, MISQUITH S. Cell surface receptor directed targeting of toxin to human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett* 1996; **396**: 57–61.
- [74] TARSIO JF, KELLEHER PJ, TARSIO M, EMERY JM, LAM DM. Inhibition of cell proliferation on lens capsules by 4197X-ricin A immunconjugate. *J Cataract Refract Surg* 1997; **23**: 260–266.
- [75] TARENZI A, BOLOGNESI A, PASQUALUCCI L, FLENGHI L, PILERI S, STEIN H, KADIN M, BIGERNA B, POLITO L, TAZZARI PL, MARTELLI MF, STIRPE F, FALINI B. Anti-CD30 (BER=H2) immunotoxins containing the type-I ribosome-inactivating proteins momordin and PAP-S (pokeweed antiviral protein from seeds) display powerful antitumour activity against CD30+ tumour cells *in vitro* and in SCID mice. *Br J Haematol* 1996; **92**: 872–879.
- [76] URBATSCH IL, STERZ RK, PEPPER K, TROMMER WE. Antigen-specific therapy of experimental myasthenia Gravis with acetylcholine receptor-gelonin conjugates *in vivo*. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 776–779.
- [77] VALLERA DA, BURNS LJ, FRANKEL AE, SICHENEDER AR, GUNTHER R, GAJL-PE-CZALSKA K, PENNELL CA, KERSEY JH. Laboratory preparation of a deglycosylated ricin toxin A chain containing immunotoxin directed against a CD7 T lineage differentiation antigen for phase I human clinical studies involving T cell malignancies. *J Immunol Methods* 1996; **197**: 69–83.
- [78] WACHINGER M, SAMTLEBEN R, GERHAUSER C, WAGNER H, ERFLE V. Bryodin, a single-chain ribosome-inactivating protein, selectively inhibits the growth of HIV-1-infected cells and reduces HIV-1 production. *Res Exp Med. (Berl)* 1993; **193**: 1–12.
- [79] WEREMOWICZ S, FOX EA, MORTON CC, VALLEE BL. Localization of the human angiogenin gene to chromosome band 14q11, proximal to the T cell receptor alpha/delta locus. *Am J Hum Genet* 1990; **47**: 973–981.
- [80] WIERZBICKI A, SOBKOWIAK A, TRZECIAK W H. Cytotoksyczne rybonukleazy o szczególnym działaniu biologicznym (Rysbazy): Rysbazy drobnoustrojów i roślin. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 51–62.
- [81] WU Y-N, SAXENA SK, ARDELT W, GADINA M, MIKULSKI SM, DE LORENZO C, DALESSIO G, YOULE RJ. A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases. *J Biol Chem* 1995; **270**: 17476–17481.

- [82] XU Y, XU Q, ROSENBLUM MG, SCHEINBERG DA. Antileukemic activity of recombinant humanized M195-gelonin immunotoxin in nude mice. *Leukemia* 1996; **10**: 321–326.
- [83] YOULE RJ, NEWTON D, WU Y-N, GADINA M, RYBAK SM. Cytotoxic ribonucleases and chimeras in cancer therapy. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1993; **10**: 1–28.
- [84] YOULE RJ, WU Y-N, MIKULSKI SM, SHOGEN K, HAMILTON RS, NEWTON D, DALESSIO G, GRAVELL M. RNase inhibition of human immunodeficiency virus infection of H9 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6012–6016.
- [85] ZANGEMEISTER-WITTKE U, LEHMANN HP, WAIBEL R, WAWRZYNCZAK EJ, STAHEL RA. Action of a CD24-specific deglycosylated ricin-A-chain immunotoxin in conventional and novel models of small-cell-lung-cancer xenograft. *Int J Cancer* 1993; **53**: 521–528.

Redaktor prowadzący – M. Olszewska

Otrzymano: 29.11.1997 r.

Przyjęto: 14.01.1998 r.

Adres autora: ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań

PATOLOGIA MOLEKULARNA CHOROBY CHARCOT-MARIE-TOOTH*

THE MOLECULAR PATHOLOGY OF CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE

Andrzej Maciej KOCHAŃSKI

Katedra i Zakład Genetyki Medycznej
Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Choroba Charcot-Marie-Tooth (CMT) jest najczęstszą polineuropatią genetycznie uwarunkowaną. W przeciwieństwie do stosunkowo jednorodnego obrazu klinicznego podłoże molekularne choroby Charcot-Marie-Tooth jest bardzo złożone. Choroba dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący, autosomalny recesywny oraz jako cecha sprzężona z chromosomem X. Obecnie znane są trzy geny odpowiedzialne za fenotyp choroby CMT. W pracy została omówiona patologia molekularna choroby CMT począwszy od genów przez białka i ich funkcje, a skończywszy na efekcie fenotypowym.

Słowa kluczowe: choroba Charcot-Marie-Tooth, DNA, rekombinacja, mutacje punktowe.

Summary: Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is the most common hereditary neuropathy. Contrary to the relatively homogenous clinical picture, molecular basis of Charcot-Marie-Tooth disease seems to be more compound. CMT may segregate as an autosomal dominant, X linked or autosomal recessive trait. Molecular genetic analyses have revealed some disease causing mechanisms that involve large DNA rearrangements and single point mutations. These molecular mechanisms lead to the poor function of myelin crucial proteins. This paper describes molecular pathology of Charcot-Marie-Tooth disease from a DNA level to the clinic.

Key words: DNA, point mutations, CMT disease, recombination.

WSTĘP

Choroba Charcot-Marie-Tooth (CMT) [8,13,39] jest najczęstszą dziedziczną polineuropatią (1 na 2500 urodzeń). Klinika choroby w przeciwieństwie do bardzo

*Pracę wykonano w ramach studium doktoranckiego

złożonego podłoża molekularnego wydaje się być stosunkowo jednorodna. Składają się na nią zaniki mięśni kończyn dolnych, w szczególności dotyczą one mięśni strzałkowych oraz mięśni stóp. Do zaników mięśniowych kończyny dolnej dołączają zaniki mięśni rąk. U podłoża zaników leży upośledzenie przewodnictwa impulsu w nerwach obwodowych.

W zależności od podtypu choroby CMT dołączają się dodatkowe objawy kliniczne. I tak do objawów rzadszych należą: porażenie nerwu przeponowego, skolioza, zaburzenia rytmu serca, zaburzenia motoryki przewodu pokarmowego. Wiek wystąpienia pierwszych objawów może być różny. W najczęstszym podtypie-CMT1A choroba zaczyna się w pierwszych dwóch dekadach życia. W podtypach związanych z mutacjami punktowymi CMT1B, CMT1C, CMTX przebieg bywa bardzo ciężki, a początek choroby przypada na wczesne dzieciństwo. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie złożonego podłoża molekularnego choroby CMT, począwszy od wielkiej duplikacji (1,5 mln par zasad), a skończywszy na mutacjach punktowych genów: PMP22, PO, Cx32.

KLASYFIKACJA CHOROBY CHARCOT-MARIE-TOOTH

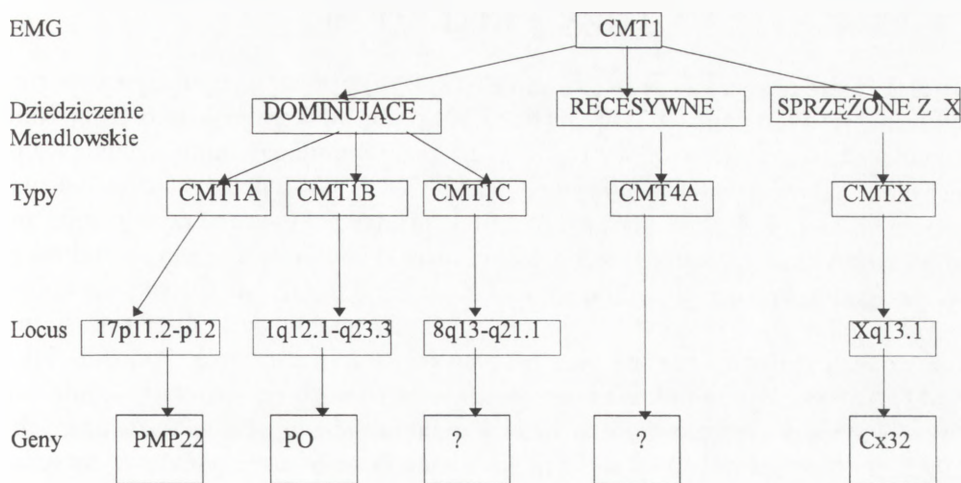
Choroba CMT jest heterogenna genetycznie, dziedziczy się autosomalnie dominująco, autosomalnie recesywnie oraz jako cecha sprzężona z chromosomem X. Typ autosomalny dominujący (CMT1) jest najczęstszy i dzieli się na podtypy: CMT1A, CMT1B oraz CMT1C.

Podtyp CMT1A jest najczęściej spotykaną formą choroby i jest sprzężony z chromosomem 17 (17p11.2p12) [25,29,46]. Podtyp CMT1B jest sprzężony z chromosomem 1 (1q21.2q23) [6], a podtyp CMT1C nie jest sprzężony ani z chromosomem 1, ani z 17 [7]. Wyróżnia się również typ CMT2, który dzieli się na dwa podtypy CMT2A-locus 1p35p36[3,4] oraz CMT2B-locus 3q[22]. Forma autosomalna recesywna (CMT4A) jest stosunkowo rzadka i jest sprzężona z chromosomem 8 (8q13q21.1) [2]. Typ CMTX jest sprzężony z chromosomem X (Xq13.1) [14].

Klasyfikacja choroby CMT nie jest zamknięta, gdyż wciąż odkrywano nowe loci sprzężone z CMT.

PODŁOŻE MOLEKULARNE TYPU CMT1A

W typie pierwszym, najczęstszym, określanym jako CMT1A dochodzi do duplikacji odcinka DNA znajdującego się w krótkim ramieniu chromosomu 17 w regionie p11.2-p.12 [26]. Wielkość duplikacji w tym regionie wynosi około 3 mln par zasad. Odcinek DNA podlegający duplikacji jest zawarty między sekwencjami mikrosatelitarnymi występującymi zarówno proksymalnie, jak i dystalnie w stosunku do niego. Homologia między sekwencjami występującymi proksymalnie i dystalnie



RYSUNEK 1. Klasyfikacja choroby Charcot-Marie-Tooth, skróty: EMG – badanie elektromiograficzne, CMT – choroba Charcot-Marie-Tooth, PMP22 – Peripheral Myelin Protein 22, PO – protein zero, Cx32 – gen koneksyny 32

w stosunku do regionu duplikacji wynosi 90% [20,31,35]. Do duplikacji wielkości 3 mln par zasad w 17p dochodzi w czasie profazy I podziału mejotycznego, natomiast w homologicznym chromosomie 17 dochodzi do delecji w tym samym locus [19,33]. W zduplikowanym regionie zmapowano gen o nazwie PMP22. Gen PMP22 [34,36] koduje białko o tej samej nazwie. Białko PMP22 [28, 42,44,47,48] stanowi 2–3% zawartości białkowej osłonek mielinowych w obwodowym układzie nerwowym. PMP22 ulega ekspresji w wielu tkankach. Obecnie przypisuje się dwie oddzielne funkcje białku PMP22. Pierwsza to rola PMP22 w rozwoju embrionalnym – m RNA białka PMP22 pojawia się w zarodku mysim w tkankach pochodzenia ektodermalnego, mezodermalnego i entodermalnego. Sugerowana rola PMP22 w obwodowym układzie nerwowym miałaby polegać na kontroli procesu mielinizacji nerwów obwodowych. Wykładnikiem morfologicznym patologicznej funkcji białka PMP22 w CMT są tzw. struktury cebulowate (ang. *onion bulbs*), które obserwuje się w mikroskopie świetlnym, w preparatach biopsyjnych mięśni osób chorujących na CMT1A. Są to koncentrycznie zbudowane struktury, w środku których znajduje się włókno mielinowe, a wokół naprzemiennie ułożone są warstwy kolagenu i wypustek Schwanna [17]. Wykładnikiem elektrofizjologicznym zaburzenia mielinizacji w obwodowym układzie nerwowym jest zwolnienie przewodnictwa nerwowego w nerwie pośrodkowym poniżej wartości granicznej 38 m/s [17].

GEN I BIAŁKO P0

Gen, którego mutacje prowadzą do CMT1B, to gen P0 znajdujący się w chromosomie 1, w regionie q22-q23 [16,23,30]. Gen P0 koduje białko o tej samej nazwie. Strukturalnie białko P0 należy do klasy immunoglobulin. Białko P0 ma również własności białka adhezyjnego [10,12,38,43,47]. Na podstawie modelu zwierzęcego sugeruje się, że podstawową funkcją białka P0 jest utrzymywanie prawidłowej cyklicznej, warstwowej struktury osłonki mielinowej nerwu obwodowego. W przypadku braku białka P0 dochodzi do zatarcia *dense line* osłonki mielinowej oraz do zaburzenia warstwowej struktury osłonki mielinowej. Obserwuje się nieprawidłową strukturę mieliny oraz przyspieszoną demielinizację. Podobnie jak w CMT1A, badaniem w mikroskopie świetlnym stwierdza się struktury cebulowate. Jak dotychczas znaleziono kilka mutacji punktowych w genie P0 związanych z CMT1B [16,21,24,41]. Większość mutacji genu P0 to mutacje punktowe dotyczące domeny zewnątrzkomórkowej – odpowiadającej za własności adhezyjne białka P0. Efektem jednej z mutacji jest zamiana jednego aminokwasu w dojrzałym białku P0, która najprawdopodobniej zakłóca modyfikacje białka P0 zachodzące w aparacie Golgiego określane jako dojrzewanie białka.

Następne dwie mutacje punktowe prowadzą do powstania „kodonów stop”, czego efektem jest powstanie rozpuszczalnej formy białka P0 zawierającej tylko część zewnątrzkomórkową. Delecja 3 par zasad w genie P0, której efektem jest brak seryny w białku, prowadzi również do fenotypu CMT1B.

ROLA KONEKSYNY 32 W CMTX

W roku 1987 opisano nowy sposób dziedziczenia choroby Charcot-Marie-Tooth [5,9,37,40]. W tym wypadku choroba dziedziczy się w sposób recesywny sprzężony z chromosomem X.

Gen, którego mutacje są odpowiedzialne za powstanie CMTX zlokalizowano w pericentrycznym regionie ramienia długiego chromosomu X. Gen Cx32 koduje białko o nazwie koneksyna 32. Koneksyna 32 należy do dużej klasy białek zwanych koneksynami. Koneksyny mają zdolność oligomeryzacji, której efektem jest wytworzenie struktur wyższego rzędu, tzw. koneksonów. W koneksonie składającym się z 6 koneksyn mogą znajdować się identyczne (homoheksamer), jak i różne koneksyny (heteroheksamer). Koneksyny są kanałami jonowymi o wybiórczej przepuszczalności, warunkującymi przepływ jonów, wtórnych przekaźników oraz metabolitów komórkowych o masie cząsteczkowej nie większej niż 1 kDa. Koneksyny zostały zaklasyfikowane do grupy połączeń typu *gap*. Koneksyny zbudowane z koneksyny 32 występują w centralnym i obwodowym układzie nerwowym. Mutacje punktowe w genie Cx32 prowadzą do zaburzenia struktury podjednostek wchodzących w skład koneksonu. Tak zaburzona struktura koneksonu upośledza przepływ

jonów w kanałach jonowych na poziomie komórkowym. Zwielokrotnienie zaburzeń przewodnictwa w kanałach jonowych manifestuje się jako upośledzenie przewodnictwa nerwowego w nerwie obwodowym. Jak dotychczas poznano kilkanaście różnych mutacji punktowych genu Cx32 [11,18,32]. Większość z nich to mutacje nonsensowne, których efektem jest powstanie niefunkcjonalnego białka – koneksyny 32.

MODELE ZWIERZĘCE CHOROBY CHARCOT-MARIE-TOOTH

Modelem zwierzęcym choroby CMT1 jest mysz „Trembler”. Klinicznie u myszy „Trembler” występują objawy polineuropatii, tj. niestabilny chód, drżenie mięśniowe, porażenie czterokończynowe. W badaniu patomorfologicznym nerwów obwodowych myszy „Trembler” stwierdza się:

- hypomielinizację,
- brak mielinizacji niektórych włókien,
- ścięczenie osłonki mielinowej,
- obecność struktur typu cebulowatych oraz
- zaburzenie warstwowej struktury osłonki mielinowej.

Mutacje punktowe w genie PMP22 u myszy Trembler są identyczne z mutacjami punktowymi w genie PMP22 u pacjenta z ciężką postacią CMT. W przypadku myszy heterozygotycznych PMP22 pod względem zmutowanego allelu neuropatia rozwija się z pewnym opóźnieniem. Przewodnictwo nerwowe nie jest upośledzone, natomiast zmiany anatomopatologiczne są słabo wyrażone lub ich nie ma. Ilość białka PMP22 w postaci heterozygotycznej wydaje się być wystarczająca do pierwotnej mielinizacji, natomiast niewystarczająca do utrzymania prawidłowej struktury mielininy w życiu osobniczym. Podobnie do myszy Trembler myszy homozygotyczne pod względem zmutowanego allelu genu P0 rozwijają polineuropatię o bardzo ciężkim przebiegu. Morfologicznie obserwuje się degradację osłonek mielinowych, struktury cebulowate oraz zatarcie struktury warstwowej osłonki mielinowej [1,15,27,45].

PODSUMOWANIE

Obecny stan badań ukazuje bogaty i różnorodny obraz patologii molekularnej choroby CMT. Tak różne mechanizmy, jak duplikacja wielkości 1,5 mln par zasad czy pojedyncze mutacje punktowe, prowadzą do jednego wspólnego fenotypu choroby. Podział choroby Charcot-Marie-Tooth opierający się na kryteriach patologii molekularnej wydaje się mieć swoje praktyczne uzasadnienie. Poznanie coraz to nowych czynników w patologii molekularnej będzie podstawą prawidłowego poradnictwa genetycznego dla rodzin ryzyka. Jak dotychczas o rozpoznaniu de-

cydowały: rozpoznanie kliniczne, elektromiograficzne oraz biopsja mięśnia. Wzbogacenie zestawu badań o nowe techniki pozwalające na wykazanie zmian na poziomie DNA (FISH, PCR) hybrydyzacja Southerna otwiera możliwości bardzo wczesnego i precyzyjnego diagnozowania choroby.

Dzięki takiemu podejściu diagnostycznemu można precyzyjnie określić nosicielstwo patologicznego genu w rodzinach ryzyka, szanse posiadania zdrowego potomstwa itp. Innymi słowy genetyka medyczna zyskuje nowe narzędzie badawcze.

Niestety, podobnie jak w innych chorobach genetycznych istnieją bardzo ograniczone możliwości terapeutyczne. Na obecnym etapie rozwoju genetyki molekularnej nie można mówić o skutecznej terapii genowej w żadnym ze schorzeń genetycznych. Z drugiej jednak strony dokładne poznanie patogenezы stanowi pierwszy krok do opracowania skutecznej terapii genowej.

Rozwój badań nad chorobą CMT poszerza ponadto znacznie zakres naszej wiedzy na temat mechanizmów molekularnych prowadzących do chorób uwarunkowanych genetycznie.

LITERATURA

- [1] ADLKOFEK K, MARTINI R, AGUZZI A, ZIELASEK J, TOYKA K, SUTER U. Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in PMP22-deficient mice. *Nature Genet* 1995; **11**: 274–280.
- [2] BEN OTHMANE K, HENTATI F, LENNON F, HAMIDA CB, BIEL S. Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1625–1628.
- [3] BEN OTHMANE K, HENTATI F, LENNON F. Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8 q. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1625–1628.
- [4] BEN OTHMANE K, MIDLETTON LT, LOPREST LJ, LENNON F. Localisation of a gene (CMT2A) autosomal disease 2 to chromosome 1p and evidence for genetic heterogeneity. *Genomics* 1993; **17**: 370–375.
- [5] BERGOFFEN J, TROFFATER J, PERICACK VANCE. Linkage localization of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Genet* 1993; **52**: 312–318.
- [6] BIRD TD, OTT J, GIBLETT ER. Evidence of linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy to the duffy locus on chromosome 1. *Am J Hum Genet* 1982; **34**: 388–394.
- [7] CHANCE PF, MATSUNAMI N, LENSCH W. Analysis of the DNA duplication 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 pedigrees: Additional evidence for a third autosomal Cmt1 locus. *Neurol* 1992; **42**: 2037–2041.
- [8] CHARCOT JM, MARIE P. Sur une forme particuliere d, atrophie musculaire progressive souvent familiale debutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev Med* 1886; **6**: 97–138.
- [9] DERMJETZEL R, SPRAY DC. Gap junctions in the brain, what type, how many and why? *Trends in Neurosci* 1993; **16**: 186–192.
- [10] DURSO D, BROPHY PJ, AUGAITIS SM GILLESPIE CS. Protein zero peripheral nerve myelin: biosynthesis, membrane insertion, and evidence for homotypic interaction. *Neuron* 1990; **4**: 449–460.

- [11] FAIRWEATHER N, BELL C, COCHRANE S, CHELLY J, WANG S, MOSTACCIUOLO ML, MONACO AP, HAITES NE. Mutations in the connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 29–34.
- [12] FILBIN MT, WALSH FS, TRAPP BD, PIZZEY JA, TENNEKON GI. Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature* 1990; **344**: 871–872.
- [13] GABREELS-FESTEN A, GABREELS FJ. Hereditary demyelinating motor and sensory neuropathy. *Brain Pathol* 1993; **3**: 135–146.
- [14] GALD, MUCKE J, THEILEH. X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease: Suggestion of linkage with a cloned DNA sequence from the proximal Xq. *Hum Genet* 1985; **70**: 38–42.
- [15] GIESE KP, MARTINI R, LEMKE G. Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 1992; **71**: 565–576.
- [16] HAYASAKA K, TAKADA G, IONASESCU W. Mutation of the myelin P0 gene. *Nat Genet* 1993; **5**: 31–34.
- [17] HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ I. Choroby mięśni. 1993, PWN.
- [18] IONASESCU V, SEARBY C, IONASESCU R. Point mutations of connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 355–358.
- [19] IONASESCU V. Charcot-Marie-Tooth neuropathies from clinical description to molecular genetics. *Muscle Nerve* 1995; **18**: 267–275.
- [20] KIYOSAWA H, LENSCH M, CANCE F. Analysis of the CMT1A repeat: mapping crossover breakpoints in CMT1A and HNPP. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 2327–2334.
- [21] KULKENS T, BOLHUIS PA, WOLTERMAN RA, KEMP S. Deletion of the serine 34 codon from the major myelin protein P0 gene in Charcot-Marie-Tooth disease type 1B. *Nat Genet* 1993; **5**: 35–39.
- [22] KWON JK, ELLIOT JL. Assignment of a second Charcot-Marie-Tooth type II locus to chromosome 3q. *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 853–858.
- [23] LEMKE G, LAMAR G, PATTERSON J. Isolation and analysis of the gene encoding peripheral myelin protein zero. *Neuron* 1988; **1**: 73–83.
- [24] LUPSKI JR, GARCIA CA. Charcot-Marie-Tooth polyneuropathy syndrome: Clinical, electrophysiologic and genetic aspects. *Current Neurology* 1991; 1–25.
- [25] LUPSKI JR, SLAUGENHAUPT S, PENTAO L, GUZZETTA V, TRASK BJ, BARKER BF, KILLIAN JM. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991; **66**: 219–232.
- [26] LUPSKI JR, WISE CA, KUWANO A, PENTAO L, PARKE JT, GLAZE DG, PATEL PI. Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1992; **1**: 29–33.
- [27] MARTINI R, ZIELASEK J, TOYKA K, GIESE K, SCHACHNER M. Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited neuropathies. *Nat Genet* 1995; **11**: 281–286.
- [28] MARTINI R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* 1994; **23**: 1–28.
- [29] MATSUNAMIN, SMITH B, BALLARD L, LENSCH MW, ROBERTSON M, ALBERTSEN M, HANEMANN CO, MULLER HW, BIRD TD, WHITE R. Peripheral myelin protein -22 gene maps in the duplication in chromosome 17p11.2 associated with Charcot-Marie-Tooth type 1A. *Nat Genet* 1992; **1**: 176–179.
- [30] NELIS M, TIMMERMAN V, JONGHE P. Linkage and mutation analysis in an extended family with Charcot-Marie-Tooth disease type 1B. *J Med Genet* 1994; **31**: 811–815.
- [31] OOSUMI T, BELKNAP W. Mariner transposons in humans. *Nature* 1995; **378**: 672–680.

- [32] ORTH U, FAIRWEATHER N, EXLER MC, SCHWINGER E, GAL A. X linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease: valine-38-methionine substitution of connexin 32. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 699–700.
- [33] PALAU F, LOFGREN A, DE JONGHE P, BORT S, NELIS E, SEVILLA T, MARTIN JJ, VILCHEZ J, PRIETTO F. Origin of the *de novo* duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: unequal nonsister chromatid exchange during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 2031–2035.
- [34] PATEL PL, ROA BB, WELCHER AA, SCHOENER-SCOTT R, TRASK BJ, LUPSKI JR, SUTER U. The gene for the perihial myelin protein PMP 22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1992; **112**: 288–297.
- [35] REITER T, MURAKAMI T, PENTAO L, MUZNY D, GIBBS R, LUPSKI JR. A recombination hot-spot responsible for two inherited peripheral neuropathies is located near a mariner transposone-like element. *Nat Genet* 1996; **12**: 288–297.
- [36] ROA BB, GARCIA CA, SUTER U, KULPA DA, WISE CA, LUPSKI JR. Charcot-Marie-Tooth type 1 a associated with a *de novo* point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J MED* 1993; **329**: 96–101.
- [37] ROZEAR MP, VANCE MA, FISCHBECK K. Hereditary motor and sensory neuropathy, X-linked a half century follow-up. *Neurology* 1988; **37**: 1460–1465.
- [38] SCHNEIDER-SCHAULIES J, VON BRUN A, SHACHNER M. Recombinant periphery myelin Protein zero confers both adhesion and neurite outgrowth-promoting properties. *J Neurosci Res* 1990; **27**: 286–297.
- [39] SKRE H. Genetic and clinical aspect of Charcot-Marie-Tooth disease. *Clin Genet* 1974; **6**: 98–118.
- [40] SPRAY DC, DERMETZEL R. X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease and other potential gap junctions diseases of the nervous system. *Trends Neurosci* 1995; **18**: 256–262.
- [41] SU Y, BROOKS DG, LEPERC J, TROFATTER JA, RAWETH JW, LEBO RV. Myelin Protein zero mutated in Charcot-Marie-Tooth type 1B patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10856–10860.
- [42] SUTER U, SNIPES GJ. Peripheral myelin protein PMP22: Facts and hypotheses. *J Neurosci Res* 1995; **40**: 145–151.
- [43] THOMAS PK, CALNE DB, STEWART G. Hereditary motor and sensory neuropathy. *Ann Hum Genet* 1974; **38**: 111–153.
- [44] UEYMURA K, ASOU H, TAKEDA Y. Structure and function of peripheral nerve myelin proteins. *Prog Brain Research* 1995; **105**: 310–318.
- [45] VALENTIJN J, BAAS F, WOLTERMANN A, HOOGDEJNIIK JE, BOSCH NH. Identical point mutations of PMP22 in Trembler J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1992; **2**: 288–291.
- [46] VANCE JM, NICHOLSON GA. Linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy to chromosome 17. *Exp Neurol* 1989; **104**: 186–189.
- [47] WONG LH, FILBIN NT. The cytoplasmic domain of the myelin P0 protein influences the adhesive interactions of its extracellular domain. *J Cell Biol* 1994; **126**: 1089–1097.
- [48] ZOIDL G, BLASS-KAMPMANN S, DURSO D, SCHMALLENBACH C, MULLER HW. Retroviral-mediated gene transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells: modulation of cell growth. *EMBO J* 1995; **14**: 1122–1128.

Redaktor prowadzący – M. Zabel

Otrzymano:

Przyjęto: 18.02. 1998 r.

Adres autora: ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań

SPRAWOZDANIE Z DZIAŁALNOŚCI ZARZĄDU FUNDACJI BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ ZA OKRES OD STYCZNIA DO GRUDNIA 1997

W obecnym okresie sprawozdawczym Zarząd działał w składzie: Jerzy Kawiak – prezes, Maciej Nałęcz – wiceprezes, Maciej Zabel – sekretarz. Odszedł od nas dr Maciej Kawalec, który zmarł pod koniec 1996 r., a na Jego miejsce skarbnikiem została dr Joanna Liwska. Skład Rady Fundacji nie zmienił się: Zofia Osuchowska – przewodnicząca, członkowie: Tadeusz Cichocki, Antoni Horst, Józef Kałuża, Aleksander Koj, Włodzimierz Korohoda, Andrzej Łukaszyk, Andrzej Myśliwski, Maria Olszewska, Aleksandra Stojąłowska, Jan Steffen. Zarząd pracował społecznie. Kadencja Zarządu upływa w roku 1999.

W pracy Zarządu uczestniczyły panie: Ewa Próchniewicz – księgowa oraz Barbara Miks, Danuta Wasilewska w rozprawianiu zeszytów „Postępów Biologii Komórki”. Zarząd składa tym osobom serdeczne podziękowania.

1. Działalność wydawnicza

Jest to główny zakres działania Zarządu Fundacji. Fundacja wspiera wydawanie czasopism: „Folia Histochemica et Cytobiologica” oraz „Postępy Biologii Komórki”.

A. *Folia Histochemica et Cytobiologica*

Czasopismo ukazywało się regularnie w dotychczasowej formie odpowiadającej standardom międzynarodowym. Wprowadzono zwyczaj publikowania artykułów przeglądowych pisanych przez wybitnych specjalistów. Skład i druk czasopisma odbywa się w Krakowie. Merytoryczną pieczę i decyzje o składzie redaktorów ma Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików. Od 1995 roku Towarzystwo jest formalnym właścicielem czasopisma. Wydawanie czasopisma odbywa się z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych oraz z funduszy zebranych ze sprzedaży czasopisma. Otwarto subkonto Fundacji w PKO SA w Krakowie dla ułatwienia Redaktorom prowadzenia czasopisma. Współpraca Fundacji z Redaktorami prof. dr hab. J. Litwinem i doc. dr hab. B. Bilińską układa się bardzo dobrze.

Artykuły z „Folia” są indeksowane w: Medline, Biological Abstracts, Excerpta Medica, Index Medicus, SciSearch, Research Alert.

B. *Postępy Biologii Komórki*

Czasopismo ukazywało się regularnie w dotychczasowej formie. W dalszym ciągu wydawano suplementy. Ukazały się dwa suplementy:

– suplement 8 pt. „Mechanizmy regulacji ekspresji genów, część 2” pod redakcją prof. Z. Wasylewskiego zawiera materiały z konferencji „Rabka 1997” Instytutu Biologii Molekularnej UJ i jest kontynuacją omawiania zagadnień dotyczących ekspresji genów (część pierwszą zawierał suplement 7 pod redakcją Jacka Kuźnickiego);

– suplement 9 pt. „Ultrastruktura i funkcja jądra komórkowego. Wybrane zagadnienia” pod redakcją prof. S. Bilińskiego; są to wykłady wygłoszone podczas 27 Konferencji Biologii Komórki 1997 tradycyjnie organizowanej wspólnie przez zarządy Polskiego

Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Fundację Biologii Komórki i Biologii Molekularnej oraz Redakcję „Postępów Biologii Komórki” pod koniec roku.

Skład czasopisma odbywa się w dalszym ciągu w Wydawnictwie Fundacji „Rozwój SGGW” w Warszawie, a f-ma „Script” pomaga w składzie czasopisma i wspomaga współpracę z drukarniami.

Merytoryczną pieczę nad „Postępami” ma od 25 lat Polskie Towarzystwo Anatomiczne oraz od 4 lat Polskie Towarzystwo Biologii Komórki. Tytuł własności czasopisma „Postępy Biologii Komórki” ma Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej. Wydawanie czasopisma odbywa się z finansową pomocą Komitetu Badań Naukowych oraz z funduszy zebranych ze sprzedaży czasopisma.

2. Wyróżnienia

W dalszym ciągu działała stała Komisja Nagród Fundacji pod przewodnictwem prof. Zofii Osuchowskiej. Członkami Komisji są: prof. dr Barbara Sztabert-Grzelakowska, dr hab. Agnieszka Mostowska, prof. dr Hieronim Bartel, prof. dr Stanisław Moskalewski, prof. dr Jerzy Kawiak.

Komisja opracowała regulamin dorocznej nagrody Fundacji. Konkurs nagród w 1997 r. został ogłoszony w „Postęпах Biologii Komórki”, w których ogłoszono też regulamin nagrody. W roku 1996 nagrodzono pracę W. Diakowskiego i A. F. Sikorskiego pt. „*Interaction of brain spectrin (fodrin) with phospholipids*” ogłoszoną w *Biochemistry* r. 34, 13252–13258, 1995, a w 1997 r. nagrodzono pracę Marii Siweckiej pt. „*Purification and some properties of a novel dsRNA degrading nuclease bound to rye germ ribosomes*” ogłoszoną w *Acta Biochimica Polonica* v. 44, 61–68, 1997.

W dniu 25 lipca 1997 r. w obecności prof. dr Z. Osuchowskiej, księgowej p. Ewy Próchniewicz i prezesa J. Kawiaka odbyło się przekazanie informacji o stanie finansowym Fundacji nowemu skarbnikowi p. Joannie Liwskiej (zał.). Zarząd Fundacji wystąpił do Komitetu Badań Naukowych o dotację na dalsze wydawanie obu czasopism w roku 1998 i dotację tę otrzymał. Fundatorzy Fundacji w osobach: prof. dr Tadeusz Cichocki, prof. dr Andrzej Łukaszyk, prof. dr Andrzej Myśliwski są co roku proszeni o kontrolę finansów Fundacji.

Zarząd korzysta z kserokopiarki, która jest własnością Fundacji oraz przeznaczają część funduszy na opłaty pocztowe oraz zakup materiałów biurowych koniecznych do prowadzenia działalności bieżącej. W 1997 r. został też zakupiony komputer dla redakcji „Folia” w Krakowie.

Poprzednie sprawozdanie Fundacji było opublikowane w „Postęпах Biologii Komórki” t. 23, s. 717–721, 1996.

Prezes Fundacji
Jerzy Kawiak

Wiceprezes
Maciej Nałęcz

Sekretarz
Maciej Zabel

Załącznik do Sprawozdania

PROTOKÓŁ

z posiedzenia członków Rady Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej w dniu 25.07.1997 w Zakładzie Cytologii Klinicznej CMKP, Warszawa

Obecni: prof. dr hab. Zofia Osuchowska – przewodnicząca Rady Fundacji, doc. dr hab. Joanna Liwska – członek Zarządu, p. Ewa Próchniewicz – księgowa, prof. dr hab. Jerzy Kawiak – prezes Fundacji.

Sprawdzono stan kasy i konta bankowego w Banku PKO SA IV Oddz. Warszawa od stycznia 1997 r. do 25 lipca 1997 r.

1. Stwierdzono, że:

- saldo końcowe wynosi w Warszawie konto – 22 386,53 zł, subkonto – 50 000,00 zł, w Krakowie subkonto – 14 134,33 zł;
- na wydanie 3 zeszytów „Postępów Biologii Komórki” w 1997 r. wydano – 10 430,00 zł;
- rachunki były prowadzone prawidłowo.

2. Postanowiono zwrócić się do Redakcji „Folia Histochemica et Cytobiologica” z prośbą o przysłanie rachunków ew. kopii rachunków za wydanie 3 zeszytów „Folii” w 1997 r.

3. Sądzymy, że finanse Fundacji pozwalają na wydanie czwartego zeszytu „Postępów” z 1997 r. oraz suplementów 8 i 9 /1997.

4. Postanowiono zwrócić się do KBN o dotację na rok 1998 na wydanie obu czasopism w roku 1998.

Warszawa 25 lipca 1997 r.

Zofia Osuchowska
 Próchniewicz
 J. Kawiak Maria

KOMUNIKATY

IV KONFERENCJA POLSKIEGO TOWARZYSTWA CYTOMETRII
PRZEPLYWOWEJ

Konferencja nt. „Cytometria przepływowa w badaniach naukowych i diagnostyce” odbędzie się w Gdańsku w dniu 18 października 1998 roku. W programie przewidujemy wystąpienia zaproszonych gości oraz sesję plakatową. Wykładowcami będą: **Zbigniew Darzynkiewicz** (Nowy Jork, USA), **Jim Watson** (Cambridge, W. Brytania), **Carleton Stewart** (Buffalo, USA), **Paul Robinson** (West Lafayette, USA), **David Hedley** (Toronto, Kanada), **Jan Kapuściński** (Gdańsk, Polska).

Bezpośrednio po Konferencji w dniach 18–21 października zostaną zorganizowane warsztaty metodyczne z udziałem zaproszonych wykładowców. Konferencja oraz warsztaty będą prowadzone w języku angielskim. Liczba uczestników warsztatów jest ograniczona, prosimy zatem o oddzielne zaznaczenie zamiaru udziału w tej części Konferencji. Osoby zainteresowane udziałem prosimy o nadsyłanie zgłoszeń uczestnictwa w terminie do 30 kwietnia 1998 roku na adres Komitetu Organizacyjnego:

Dr hab. **Jacek Bigda**
Sekretarz Komitetu Organizacyjnego
Katedra Histologii i Immunologii AM Gdańsk
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
tel/fax 058-3023673
e-mail: jbigd@amed01.amg.gda.pl

Prof. dr hab. **Andrzej Myśliwski**
Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
E-mail: anmys@amed01.amg.gda.pl

Poniższy formularz proszę odciąć i przesać na adres Komitetu Organizacyjnego

Zgłoszenie uczestnictwa
w IV Konferencji Polskiego Towarzystwa Cytometrii Przepływowej

Imię i nazwisko

Adres

Telefon Fax

E-mail

Jestem zainteresowana/y/ udziałem w warsztatach metodycznych (właściwe zakreślić):

tak / nie

podpis

VII OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA BIOLOGII KOMÓRKI THE VIIITH POLISH CONFERENCE ON CELL BIOLOGY

Uprzejmie informujemy, że VII Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki zostanie zorganizowana w 1999 roku, w dniach 9 (środa) do 12 (sobota) września, w Krakowie.

Za organizację Konferencji z upoważnienia Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki odpowiedzialni będą profesorowie: Tadeusz Cichocki, Włodzimierz Korohoda i Stanisław Przystański.

Zainteresowanych prosimy o śledzenie dalszych komunikatów.

First Announcement. The VIIth Polish Conference on Cell Biology will be organized in Cracow, on 9 (Wednesday) to 12 (Saturday) September 1999.

For the organization of Conference the professors: Tadeusz Cichocki, Włodzimierz Korohoda and Stanisław Przystański have been chosen by the Polish Cell Biology Society.

Please keep attention to the forthcoming communicates.

XXXIII KONFERENCJA NAUKOWA POLSKIEGO TOWARZYSTWA HISTOCHEMIKÓW I CYTOCHEMIKÓW

Uprzejmie informujemy, że w dniach 3–5 września 1998 r. odbędzie się w Kazimierzu Dolnym nad Wisłą XXXIII Konferencja Naukowa PTHiC.

Zgłoszenie uczestnictwa prosimy przesyłać na adres Sekretariatu Konferencji

Katedra Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Lublinie
ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin, tel. (081) 53-216-36
e-mail: jodla@eskulap.am.lublin.pl

Komitet Organizacyjny XXXIII Konferencji Naukowej PTHiC

LISTY DO REDAKCJI

Prof. dr Mieczysław Chorąży (*Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii, Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, 44-100 Gliwice*) nadesłał list z następującą informacją o poprawnym zapisie nazw genów i białek. Podstawowe reguły:

- * geny wirusów, bakterii, roślin, zwierząt (oprócz człowieka) powinny być pisane małymi literami i kursywą, np. *bcl-2*, *agrB*, *env*;
- * geny ludzkie zapisujemy dużymi literami i kursywą, np. *N-MYC*, *BCL-2*, *RAS*;
- * białka zwierząt – pierwsza litera symbolu duża, pismo proste, np. Myc, Fos, Ras;
- * białka ludzkie – symbol dużymi literami, pismo proste, np. RAS, TNF, IL-1.

Redakcja „Postępów” uprzejmie prosi Autorów o przestrzeganie reguł proponowanych przez Autora listu.

Wskazówki przygotowania rysunków do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 1997 r.

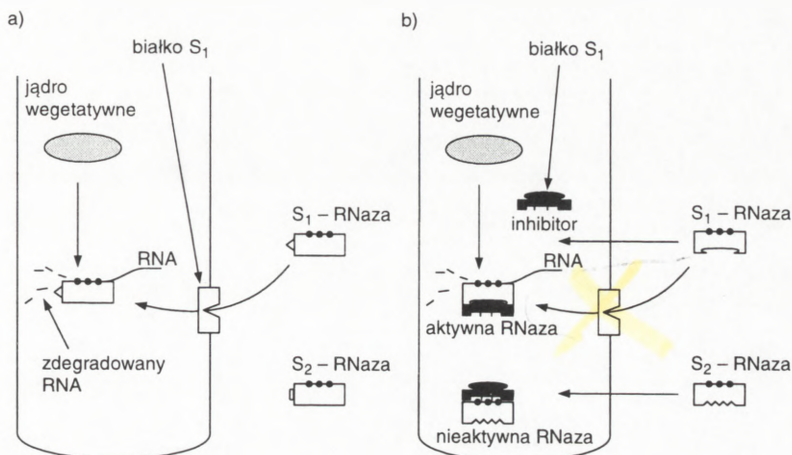
Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	40,00	60,00	80,00	100,00

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

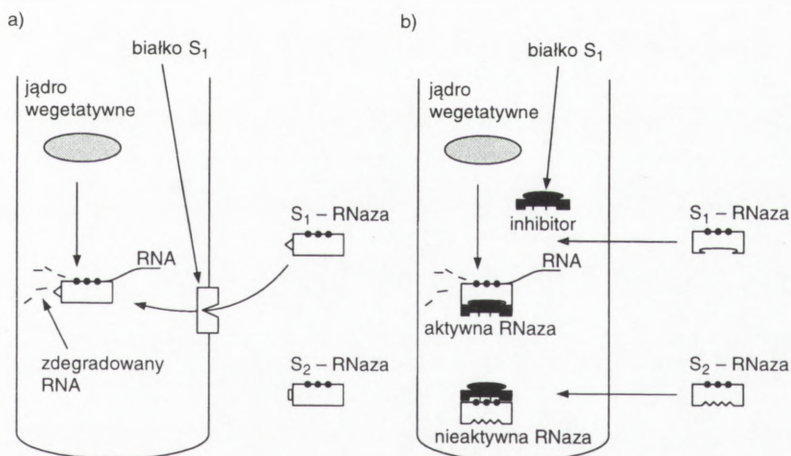
ERRATA

do pracy **E. Krzywnickiej, S. Kowalczyka** pt. „*Molekularne mechanizmy samonezgodności izomorficznej zapobiegające samozapłodnieniu roślin okrytonasiennych*” PBK 1998 25,1, s. 75.

Na stronie 84 zamieszczono rysunek 4 w postaci:



a powinien wyglądać jak niżej



Za popełnione błędy redakcja przeprasza Autorów i Czytelników.

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

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

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

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

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

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki na s. 482) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy w pracy i domowy wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ówkiwem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

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

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w kolejce 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. 482.

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 głoszące 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. 482.

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin. Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została wysłana do innej redakcji. **tak nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę. **tak nie** Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak nie**

Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście artykułu **tak nie** Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn. **tak nie**

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

TREŚĆ

W tym Zeszytcie	313
MOTYL T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie	315
STRZYŻEWSKA I., WOJSA-ŁUGOWSKA U., JERKA-DZIADOSZ M. Septyny – nowa rodzina białek cytoszkieletowych. Udział septyn w cytokinezie	335
BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Indukcja embrionalna w zarodkach <i>Xenopus laevis</i>	349
POREĘBA E. Biologia molekularna wirusów <i>Papilloma</i>	379
HEJNOWICZ Z. Siły i naprężenia mechaniczne we wrzecionie mitotycznym; ich role w rozdzieleniu chromosomów	403
JAKUBOWSKI W. Efekty stresu oksydacyjnego u drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	429
SOBKOWIAK A., WIERZBICKI A., TRZECIAK W. H. Cytotoksyczne rybonukleazy o szczególnym działaniu biologicznym (Rysbazy): Rysbazy zwierzęce i ludzkie	449
KOCHAŃSKI A. M. Patologia molekularna choroby Charcot-Marie-Tooth	469
Sprawozdanie z działalności zarządu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej	477
Komunikaty	480
Listy do Redakcji	482
Wskazówki przygotowania rysunków	483
Errata	483

Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI
Prenumerata na rok 1999

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 1999:
dla instytucji (bibliotek) wynosi 60 zł,
a dla odbiorców indywidualnych 20 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1999 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