

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 27, 2000

Suplement nr 14

Redaktor: Ryszard Słomski

PROBLEMY BIOLOGII MOLEKULARNEJ 2

PROBLEMS OF MOLECULAR BIOLOGY 2

**Postępy
Biologii
Komórki**

**Advances
in Cell
Biology**

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

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

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILINSKI – biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*,

Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

Bożena KAMIŃSKA – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*

Jerzy KAWIAK – immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*

Wincenty KILARSKI – mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maria OLSZEWSKA – komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – plant cells, genetic information in plant and animal cells – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*

Barbara PŁYTYCZ – immunologia – immunology – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maciej ZABEL – histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry, immunocytochemistry, hybrydocytochemistry, cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chałubińskiego 6a*

Jan ŻEROMSKI – patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*

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. 8340 344, fax 8340470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl.

© 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. 19,5. Ark. druk. 17,0 Podpisano do druku w kwietniu 2000 r. Druk ukończono w maju 2000 r.

PRZEDMOWA

W 1998 roku z okazji X.j Szkoły Letniej nt. „Postępy Biologii Molekularnej” przygotowaliśmy zeszyt specjalny *Postępów Biologii Komórki* (Suplement nr 10, 1998; 25: 1–342). Po dwóch latach od jego wydania postanowiliśmy przygotować kolejne prace, które mają służyć nam jako podsumowanie bieżących wydarzeń w omawianych dyscyplinach, jak również jako materiały uzupełniające dla młodych pracowników nauki. Sądzę, że połączenie informacji obydwu zeszytów stanowić może ciekawą lekturę. W ostatnim czasie zauważyć można wzrost zainteresowania diagnostyką molekularną chorób genetycznych człowieka. W opracowanym przez nas zeszycie ma to odzwierciedlenie w pracach D. Napierały i wsp. o strukturze, ekspresji i mutacjach genu DMD oraz A. Pławskiego i wsp. na temat genu APC. Wzrost zainteresowania białkami i rozwojem proteomiki zauważony jest w pracy

M. Rybczyńskiej i A. Pawlaka o budowie i funkcji białka ATM. Dla chorób uwarunkowanych wielogenowo określenie molekularnego podłoża jest często bardzo utrudnione. Przykładem może być osteoporoza, gdzie badane są poszczególne geny kandydujące (R. Kalak i wsp.). Z kolei B. Siemieniako i wsp. dyskutują zastosowanie badań hybrydacyjnych w diagnostyce i wskazują, że pomimo zastąpienia znacznej grupy badań hybrydacyjnych przez PCR, to hybrydyzacja w dalszym ciągu jest jedną z głównych metod weryfikujących wyniki uzyskane metodą PCR. Ostatnich kilka lat dostarczyło wielu nowych obserwacji o budowie telomerów oraz charakterystyce telomerazy i białek współdziałających zarówno w stanach prawidłowych, jak i w komórkach nowotworowych. Zagadnienie to omawiają M. Szalata i R. Słomski oraz J. Nowak i wsp.

Równie intensywne badane w ostatnich latach jest genetyczne uwarunkowanie płci u ssaków. Artykuły K. Kusz i wsp. oraz A. Korcz i wsp. dotyczą tego właśnie zagadnienia i przechodzą do diagnostyki molekularnej chromosomu Y u mężczyzn z zaburzeniami spermatogenezy. Intensywne prace nad sekwencjonowaniem genomu człowieka spowodowały, że badania w tym kierunku podjęto również dla roślin i zwierząt. Poznano już budowę genomów licznych mikroorganizmów i organizmów modelowych. Bardzo interesujące są badania przedstawione przez M. Świtońskiego

i G. Cholewińskiego na temat markerowych map genomów psa i konia. Badania DNA w chorobach nowotworowych są coraz silniej powiązane z praktyką. Zagadnienia metodyczne z tego zakresu przedstawiono w pracy K. Szyftera i wsp. Do grupy badań najbardziej aktualnych należą również prace z zakresu cytogenetyki. Poświęca się im bardzo wiele uwagi i zaobserwować można zbliżanie się rozdzielczości uzyskiwanej metodami cytogenetycznymi z rozdzielczością technik molekularnych. Wiele obserwacji chromosomów prowadzi się na komórkach w interfazie. W niniejszym zeszycie poruszają to M. Zawada i I. Liweń oraz M. Kujawski i K. Szyfter.

Kolejne trzy artykuły dotyczą zagadnień, które bardzo często odbierane są jako badania kontrowersyjne i dyskusji na ich temat towarzyszy duże zainteresowanie. Przyszłość terapii genowej przedstawiona jest w artykule J. Nowaka i D. Januszkiewicz-Lewandowskiej, klonowanie ssaków w pracy M. Kurpisza i A. Horsta, a genetyczne podłoże zachowań ludzi i zwierząt w pracy P. Gronka i R. Słomskiego.

Zestawienie prac wydawałoby się niepełne, gdybyśmy nie zaznaczyli intensywnego wkroczenia biologii molekularnej do badań roślin. S. Mikołajczyk i Z. Broda przedstawiają indukowanie haploidów żyta, a Ł. Wolko i R. Słomski uzyskiwanie określonych chromosomów roślin poprzez cytometrię przepływową i przygotowanie bibliotek genomowych poszczególnych chromosomów.

Należy podkreślić, że wszystkie prace zostały napisane przez osoby aktywnie działające w omawianych dziedzinach i zamieszczające wyniki prac eksperymentalnych w renomowanych czasopismach zagranicznych.

Serdecznie dziękuję Panu Profesorowi Jerzemu Kawiakowi za podjęcie trudu wydania w bardzo krótkim czasie zeszytu specjalnego *Postępów Biologii Komórki*, co zapewniło aktualność wiadomości z omawianych dziedzin. Chciałbym podziękować także wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania zeszytu specjalnego, a w szczególności:

prof. dr hab. Zbigniewowi Brodzie, prof. dr hab. Maciejowi Kurpiszowi, dr Wojciechowi Lassocińskiemu, prof. dr hab. Annie Latos-Bieleńskiej, prof. dr hab. Jerzemu Pawełkiewiczowi, prof. dr hab. Andrzejowi Pawlakowi, prof. dr hab. Januszowi Rybaczewskiemu, prof. dr hab. Markowi Świtońskiemu, prof. dr hab. Wiesławowi Trzeciakowi i prof. dr hab. Jackowi Wojcierowskiemu za pomoc w recenzowaniu prac oraz mgr Marcie Kaczmarek za pomoc w redagowaniu.

Ryszard Słomski

Kwiecień 2000 r.

STRUKTURA, EKSPRESJA I MUTACJE GENU DMD, NAJWIĘKSZEGO GENU CZŁOWIEKA

STRUCTURE, EXPRESSION AND MUTATIONS OF DMD GENE, THE LARGEST HUMAN GENE

Dobrawa NAPIERAŁA¹, Marta KACZMAREK¹, Ryszard SŁOMSKI^{1,2}

¹Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań, ^{1,2}Katedra Biochemii i Biotechnologii,
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Streszczenie: Dystrofia mięśniowa Duchenne'a i Beckera (DMD/BMD) stanowią alleliczne formy choroby, występującej wśród chłopców z częstością raz na 3,5 tysiąca urodzeń. Prowadzą do niej mutacje w genie *DMD* położonym w regionie Xp21. Około 60% mutacji stanowią delecje obejmujące nawet kilkanaście eksonów. Pozostałe mutacje to duplikacje (6%) i mutacje punktowe, występujące w ponad 30%. Diagnostyka genetyczno-molekularna DMD/BMD obejmuje analizę metodą PCR-multipleks delecji promotora i 19 eksonów położonych w dwóch gorących miejscach występowania tego typu mutacji. Wykrywanie drobnych zmian (mikrodelecje, mikroinsercje, tranzycje, transwersje) nie jest objęte rutynową analizą, jest jednak konieczne dla pełnej diagnostyki choroby, szczególnie gdy zachodzi konieczność ustalenia nosicielstwa. Nadal poszukuje się testu diagnostycznego, który pozwoliłby na szybką i dokładną analizę podłoża molekularnego choroby. Identyfikacja mutacji ma szczególne znaczenie dla kobiet z rodziny chorego, potencjalnych nosicielek nieprawidłowego allelu. W przypadku niemożności zidentyfikowania mutacji nosicielstwo można ustalać metodami pośrednimi, informują one jednak o dziedziczeniu markerów genetycznych sprzężonych z chorobą, a nie o podłożu molekularnym.

Słowa kluczowe: dystrofia mięśniowa Duchenne'a/Beckera, gen *DMD*, dystrofina, analiza delecji, mutacje punktowe, polimorfizm, określanie nosicielstwa

Summary: Duchenne and Becker muscular dystrophies are allelic forms of disease occurring with an incidence of 1 in 3500 live male births. The disease is associated with mutation in *DMD* gene, mapped to Xp21. High rate of mutation involves deletions (60%) comprising even several exons. The remaining are duplications (6%) and point mutations (34%). Molecular-genetic diagnostics includes analysis of deletions of promotor and 19 exons, located in two „hot-spot” regions, by multiplex PCR. Detection of small changes (microdeletion, microinsertion, transition and transversion) is not included in routine analysis, but is necessary for complete diagnostics of the disease especially in cases where identification of carriers is required. New approaches are needed for fast and reliable diagnostics tests which make the analysis of molecular basis of disease possible. Identification of mutation is especially important for

females in affected families, who are potential carriers of mutant allele and are able to pass it to their offspring. In case when determination of mutation is not possible, carriers still can be identified by indirect methods, but they inform about inheritance of genetic markers correlated with disease, but not of nature of mutation.

Key words: Duchenne/Becker muscular dystrophy, *DMD* gene, dystrophin, analysis of deletion, point mutation, polymorphism, carrying determination

STRUKTURA GENU *DMD*

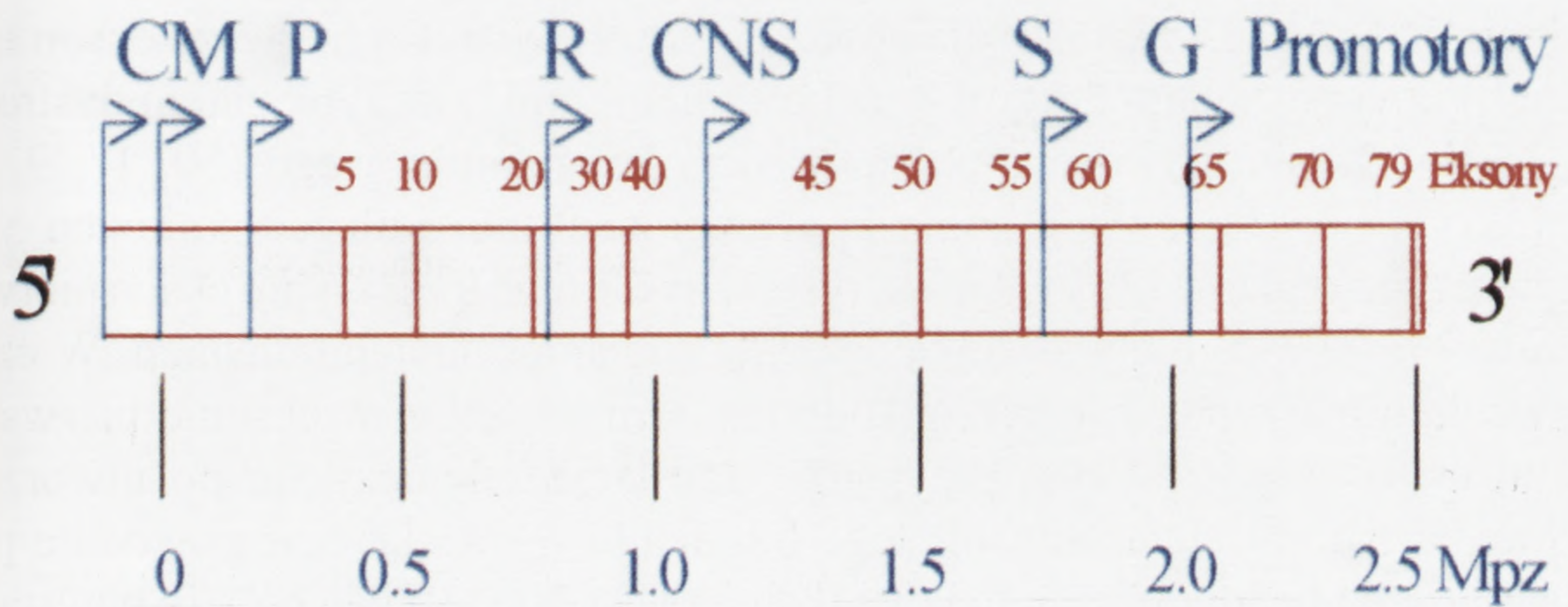
Największym poznany genem człowieka jest położony w chromosomie X w regionie p21 gen *DMD* obejmujący fragment genomu o wielkości 2,5 Mbp, co stanowi 1% chromosomu X i prawie 0,1% genomu człowieka [73]. Gen ten zidentyfikowany został w 1986 roku [37] w wyniku poszukiwania molekularnego podłoża dystrofii mięśniowej Duchenne'a (DMD) i od skrótu nazwy tej choroby utworzono nazwę genu. Część kodująca, w porównaniu z rozmiarem całego genu, jest bardzo mała i koduje mRNA o wielkości 14 kb. Gen *DMD* złożony jest z 79 eksonów o średniej wielkości 180 pb, przy czym największy ekson 79 składający się z 2703 pb prawie w całości stanowi region nie ulegający translacji. Wielkość pozostałych eksonów waha się od 32 do 277 pb. Sekwencje niekodujące stanowią zatem aż 99,4% genu, przy przeciętnej wielkości intronu 35 kb, a największe introny przekraczają nawet 200 kb [62, 49].

EKSPRESJA GENU *DMD*

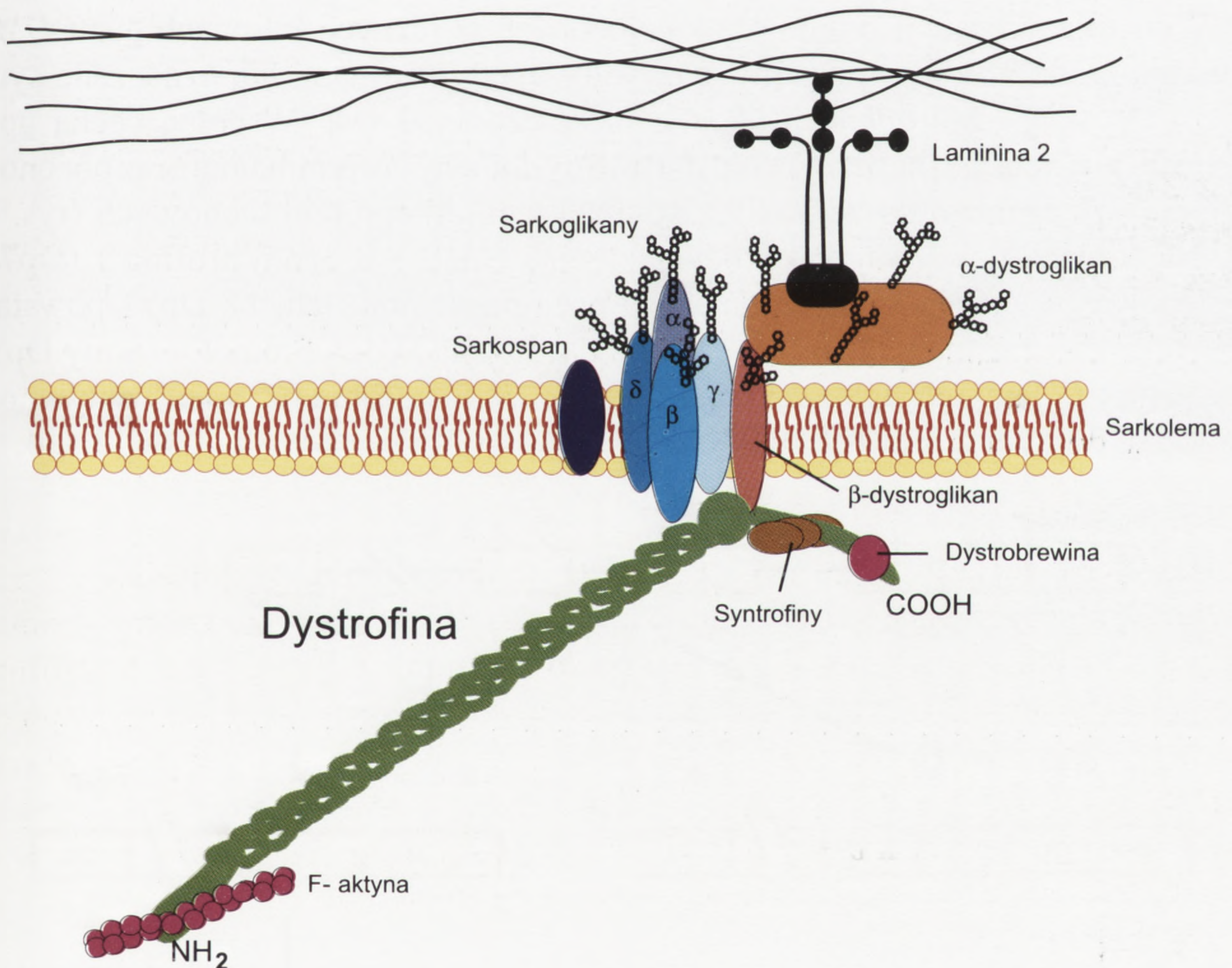
Gen *DMD* jest nie tylko największym, ale również najbardziej złożonym genem człowieka. Do tej pory w jego obrębie znaleziono aż 7 promotorów (rys. 1), a nie jest wykluczone występowanie jeszcze innych. Aktywność poznanych promotorów w różnych typach komórek prowadzi do powstania różnych form dystrofiny – białkowego produktu genu *DMD*. Dystrofina jest białkiem strukturalnym położonym po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej (rys. 2). Jej część N-terminalna wiąże się z elementami cytoszkieletu, a część C-terminalna z dużym kompleksem glikoprotein błonowych [1]. Funkcja dystrofiny nie jest do końca wyjaśniona. Biorąc pod uwagę położenie w komórce i właściwości dystrofiny sugeruje się trzy funkcje tego białka:

- 1) stabilizacja błony komórkowej mięśni w czasie cyklu skurczowo-rozkurczowego,
- 2) przenoszenie siły wytwarzanej w aparacie skurczu,
- 3) udział w organizacji strukturalnych komponentów błony komórkowej w tkankach niemięśniowych.

W mięśniach szkieletowych, korze mózgowej i komórkach Purkiniego występują dystrofiny o masie 427 kDa oznaczone jako formy M (mięśniowa), C (mózgowa)



RYSUNEK 1. Budowa genu *DMD*, położenie poszczególnych promotorów



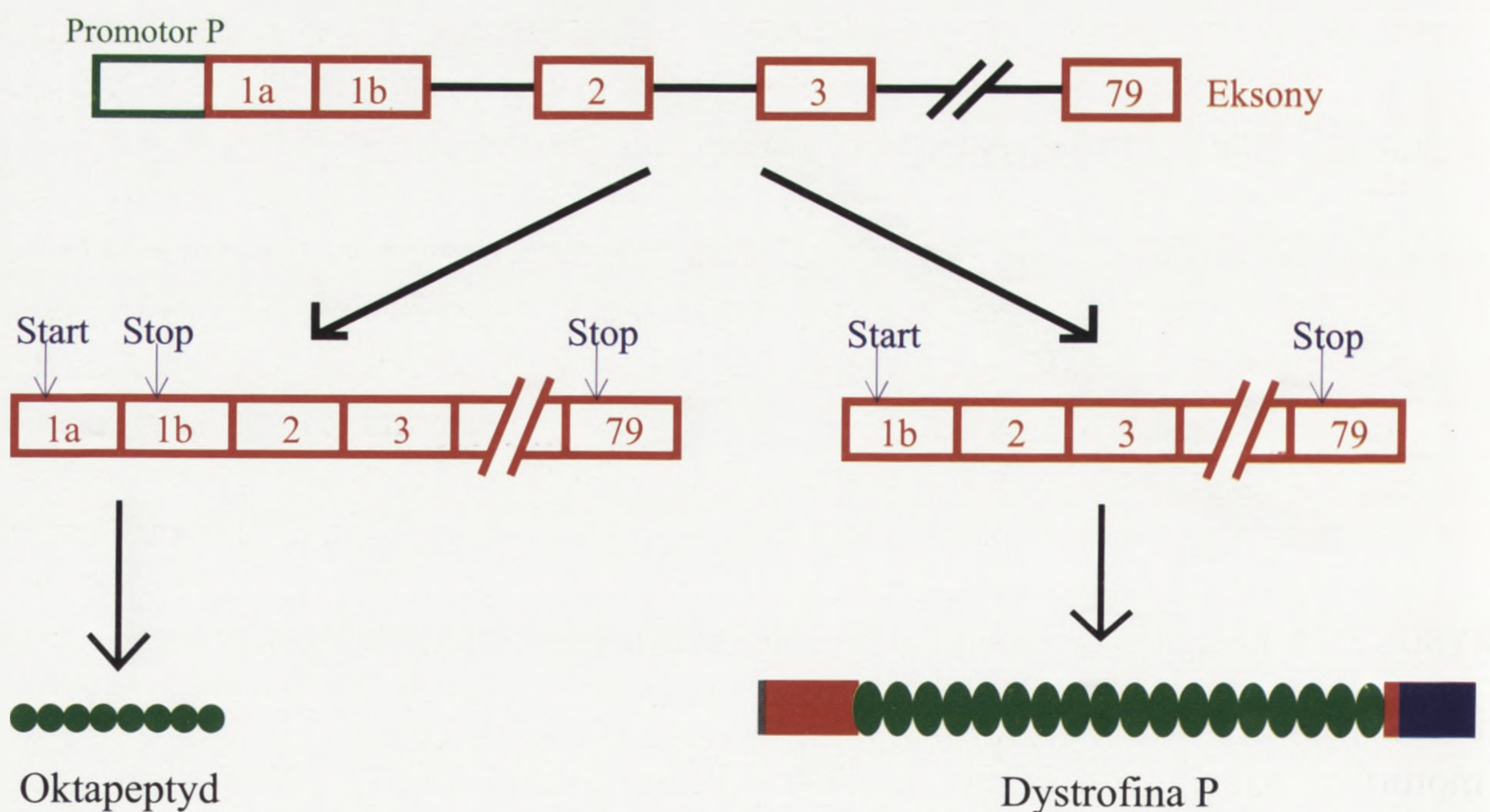
RYSUNEK 2. Kompleks dystrofiny i glikoprotein błonowych osadzonych w sarkolemmie

i P (komórek Purkinjego). Powstają one w wyniku aktywności trzech różnych promotorów, nazwanych odpowiednio do powstającego białka promotorami M, C i P, położonych w części proksymalnej genu. Ich aktywność prowadzi do powstania „pełnej długości” transkryptów o wielkości 14 kz, które różnią się jedynie krótką

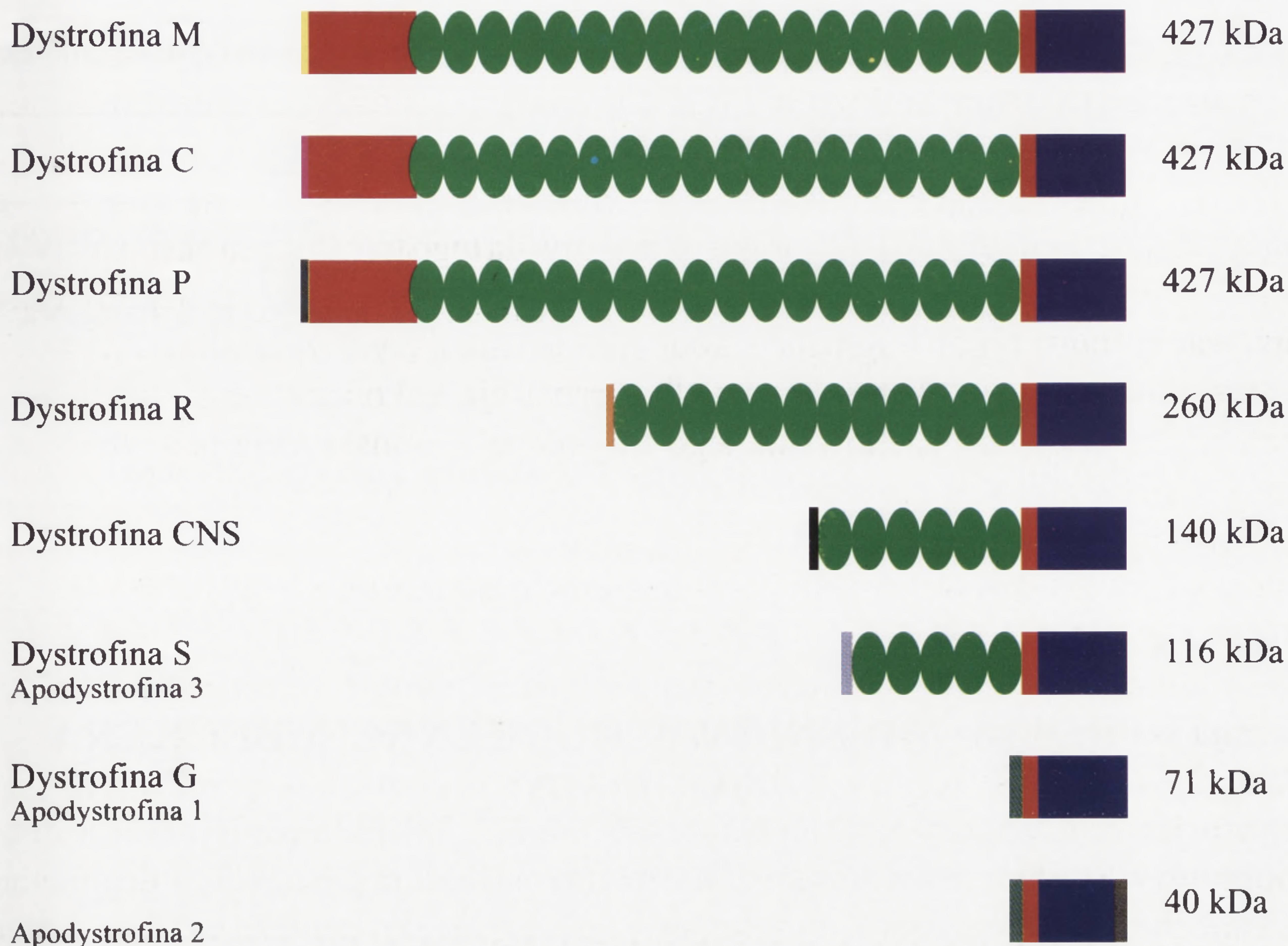
sekwencją na końcu 5'. Swoisty dla poszczególnych dystrofin pierwszy ekson łączy się ze wspólnym eksonem drugim z zachowaniem ramki odczytu, zatem dystrofiny M, C i P różnią się jedynie krótką sekwencją końca aminowego [50, 17, 9, 25].

Transkrypt powstający pod kontrolą promotora P może ulegać na końcu 5' alternatywnemu składaniu [29]. Charakterystyczny dla tego transkryptu ekson pierwszy zawiera w części 3' zgodny z ramką odczytu sygnał terminacji translacji. W czasie dojrzewania transkryptu fragment z kodonem terminującym w eksonie pierwszym może zostać usunięty. W tym przypadku translacja zakończy się po utworzeniu dystrofiny P, natomiast zachowanie tego fragmentu w transkrypcie powoduje przerwanie translacji po utworzeniu oktapeptydu (rys. 3). Nie jest pewne, czy powstający pod kontrolą promotora P oktapeptyd jest niezależnym regulatorem ekspresji, jednak udowodniono, że jego obecność w komórce uniemożliwia translację pełnej długości dystrofiny.

W wyniku aktywacji promotorów położonych w różnych intronach genu *DMD* powstają krótkie formy dystrofiny, nazywane apodystrofinami lub oznaczane symbolem Dp (ang. *dystrophin product*) i masą cząsteczkową. Wspólną cechą apodystrofin jest brak ważnej dla funkcji dystrofiny domeny N-terminalnej oraz obecność regionu wymaganego do wiązania z kompleksem glikoprotein błonowych (rys. 4) [8]. Najbardziej powszechnym produktem genu *DMD* jest apodystrofina 1 (Dp71) występująca w mózgu i innych tkankach poza mięśniami (tab. 1). Dp71 powstaje w wyniku translacji jedynie 6% części kodującej genu *DMD*. Promotor formy Dp71 – promotor G (ang. *glial* lub *general*) znajduje się w intronie 62, a jego aktywność prowadzi do syntezy dwóch mRNA o wielkości 4,8 kb oraz 2,2 kb [3, 34, 7,



RYСУNEK 3. Alternatywne składanie transkryptu genu *DMD* powstającego pod kontrolą promotora P: wystąpienie kodonu Stop w eksonie 1 powoduje powstanie oktapeptydu zamiast pełnej długości białka



RYSUNEK 4. Izoformy dystrofiny

38]. Z krótszego transkryptu powstaje apodystrofina 3 o masie 40 kDa. Apodystrofina 1 i 3 mają identyczną sekwencję N-terminalną oraz wykazują takie samo rozmieszczenie w tkankach, jednak apodystrofina 1 występuje w znacznie większych ilościach [69]. Natomiast pozycja kodonu Stop oraz sekwencja 3' UTR apodystrofiny 3 jest taka sama jak w skróconej dystrofinie płodowej [22].

Kolejne promotory zlokalizowano w intronach: 29 – promotor R (ang. *retinal*), 44 – promotor CNS (ang. *central nervous system*) oraz 55 – promotor S (komórki Schwanna). Promotor S jest aktywny wyłącznie w komórkach nerwów obwodowych i w hodowlach komórek Schwanna [14]. Pod jego kontrolą powstaje dystrofina S o masie 116 kDa (Dp116, apodystrofina 2). Ekwiwalentem Dp116 jest w centralnym układzie nerwowym izoforma o masie 140 kDa (Dp140) powstająca pod kontrolą promotora CNS [41]. Transkrypt Dp140 zawiera specyficzną 109-nukleotydową sekwencję transkrybowaną z regionu w intronie 44. Charakterystyczne jest, że cały pierwszy ekson Dp140 koduje region nie ulegający translacji, a inicjujący kodon metioninowy znajduje się dopiero w eksonie 51. Czwarta, krótka forma dystrofiny występuje głównie w siatkówce [68]. Izoforma oznaczona jako Dp260 lub nazwana dystrofiną R, ulega ekspresji z promotora R, a pierwszy ekson jej transkryptu koduje specyficzny koniec aminowy złożony z 13 aminokwasów o charakterze hydrofilowym.

TABELA 1. Białka kodowane przez gen *DMD* i ich występowanie w różnych typach komórek

Białko	Masa [kDa]	Promotor	Występowanie
Dystrofina M	427	M	Mięśnie szkieletowe, gładkie, mięsień sercowy
Dystrofina C	427	C	Kora mózgowa, hipokamp
Dystrofina P	427	P	Komórki Purkinjego, mięśnie, kora mózgowa
Dystrofina G, Dp71, Apodystrofina 1	71	G	Większość tkanek oprócz mięśni
Apodystrofina 3	40	G	Większość tkanek oprócz mięśni
Dystrofina S, Dp116 Apodystrofina 2	116	S	Nerwy obwodowe, komórki Schwanna
Dystrofina R, Dp260	260	R	Siatkówka
Dystrofina CNS, Dp140	140	CNS	Centralny układ nerwowy

DYSTROFIA MIĘŚNIOWA DUCHENNE’A/BECKERA (DMD/BMD)

Zmiany w strukturze lub ekspresji dystrofiny powodują postępującą degenerację włókien mięśniowych, która może mieć przebieg ciężki, prowadzący do śmierci w drugiej dekadzie życia (dystrofia mięśniowa Duchenne’a, DMD) lub łagodny, prowadzący do inwalidztwa (dystrofia mięśniowa Beckera, BMD). Dystrofie mięśniowe Duchenne’a i Beckera to alleliczne formy tej samej choroby, która dziedziczy się w sposób recesywny sprzężony z chromosomem X. Występują z częstością 1 na 3500 urodzeń chłopców i w 30% przypadków są następstwem nowych, sporadycznych mutacji [21]. Mutacje genu *DMD* powodują brak dystrofiny w mięśniach chorych na DMD, natomiast u chorych na BMD dystrofina występuje przeważnie w mniejszej ilości lub w formie zmienionej [28]. Oprócz dwóch podstawowych postaci dystrofii mięśniowej wyróżnia się także szereg form pośrednich (IMD, ang. *intermediate muscular dystrophy*). W mięśniach osób chorych na IMD, podobnie jak w przypadku BMD, stwierdza się obniżony poziom dystrofiny lub jej nieprawidłową budowę.

MUTACJE GENU *DMD*

Delecje

Najczęstszymi mutacjami w genie *DMD* są duże delecje, które stanowią prawie 60% wszystkich mutacji prowadzących do dystrofii mięśniowej Duchenne’a/Beckera. Największe zaobserwowane delecje obejmują prawie połowę genu, jednak w większości przypadków delecji ulega od kilku do kilkunastu eksonów. Delecje występują przeważnie w dwóch gorących miejscach [20]: pierwsze znajduje się w części

proksymalnej genu, obejmującej eksony 7–20 (30% delecji), drugie położone jest w części centralnej i obejmuje eksony 44–53 (70% delecji). Częstość występowania delecji u chorych z DMD i BMD jest taka sama. Jedyna korelacja pomiędzy rodzajem mutacji a postacią choroby zaproponowana została przez Monaco i wsp. [46]. Zgodnie z jego hipotezą delecje powodujące zmianę ramki odczytu wywołują letalną postać choroby, natomiast delecje zachowujące ramkę odczytu – postać łagodną.

Oba gorące miejsca występowania delecji są jednocześnie miejscami częstych rekombinacji. Biorąc pod uwagę wielkość genu *DMD*, rekombinacje w jego obrębie powinny zachodzić z częstością nie większą niż 2,5%. Tymczasem wskaźnik rekombinacji wewnątrz genu, zarówno w rodzinach z DMD jak i nie obciążonych genetycznie, jest co najmniej czterokrotnie wyższy (10%), przy czym podobnie jak w przypadku delecji, do rekombinacji dochodzi częściej w regionie centralnym [52]. Początkowo sugerowano udział elementów transpozonowych w powstawaniu delecji [53, 45]. W intronie 7, w którym najczęściej rozpoczynają się delecje obejmujące region proksymalny genu, znaleziono jednak tylko odwrócone terminalne powtórzenia bez sekwencji kodujących transpozony oraz sekwencję podobną do transpozonów, ale znacznie różniącą się od występujących u innych ssaków. Obecnie przyjmuje się, że niestabilność gorących miejsc w genie *DMD* wynika z obecności dużej liczby różnego typu elementów powtarzających się [44].

Duplikacje i translokacje

Wydaje się, że delecje, duplikacje i translokacje powstają, przynajmniej częściowo, w wyniku działania tych samych mechanizmów. Jak wykazały badania nad ewolucją genów (w tym ewolucją genu *DMD*), duplikacje odgrywały ważną rolę w tworzeniu złożonych struktur genetycznych, niewiele wiadomo jednak o molekularnym mechanizmie ich powstawania. Analiza sekwencyjna miejsc duplikacji w genie *DMD* wykazała, że duplikacje często zachodzą w miejscach rozpoznawanych przez topoizomery, które uczestniczą między innymi w procesie rekombinacji. Takie sekwencje oraz sekwencje wykazujące do nich wysoką homologię znaleziono również w miejscach pęknięć chromosomów, które uległy translokacji [71], co sugeruje znaczący udział topoizomerazy w rearanżacji genów. Inne badania udowodniły, że duplikacje dużych fragmentów genu *DMD* powstają zarówno w wyniku homologicznej rekombinacji pomiędzy elementami repetytywnymi, jak i rekombinacji pomiędzy sekwencjami niehomologicznymi [31].

Nierówna wymiana chromatyd prowadzi do duplikacji w jednym chromosomie, a do delecji w drugim. Częstość delecji w genie *DMD* jest jednak prawie dziesięciokrotnie wyższa niż duplikacji, co wskazuje, że w generowaniu delecji uczestniczą dodatkowe mechanizmy. Dowodem na to jest fakt, że w powstawaniu większości delecji opisanych w innych genach bierze udział tylko jedna chromatyda [32, 43]. Wykazano ponadto, że region, który uległ duplikacji, staje się bardziej

podatny na delecje, co może tłumaczyć znacznie mniejszą częstość obserwowanych duplikacji w genie *DMD*, tym bardziej że przypuszczalnie niektóre nie wywołują zmian w fenotypie [30].

Okolo 6% przypadków dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera wywoływana jest przez tandemowe duplikacje, które obejmują zarówno sekwencje wewnątrzgenowe, jak i położone w bezpośrednim sąsiedztwie genu *DMD*. Podobnie jak delecje, duplikacje występują przeważnie w dwóch gorących miejscach, częściej jednak w regionie proksymalnym genu położonym około 0,5 Mbp od promotora mięśniowego. Hipoteza Monaco dotycząca korelacji między mutacjami a postacią choroby prawdziwa jest również dla duplikacji. Wyjątki od tej hipotezy dotyczą duplikacji fragmentu genu kodującego domenę wiążącą aktyne [30].

Chociaż translokacje pomiędzy locus Xp21 a różnymi regionami autosomów stanowią niewielki procent mutacji prowadzących do dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera, to właśnie ich występowanie przyczyniło się do identyfikacji genu *DMD* [42]. Bardzo nieliczne przypadki dystrofii mięśniowej Duchenne'a u dziewczynek wywołane są głównie przez translokacje, którym towarzyszy inaktywacja prawidłowego chromosomu X [10], ale znane są również przypadki występowania *DMD* u dziewczynek z zespołem Turnera [47].

Mutacje punktowe

Szacuje się, że mutacje punktowe w genie *DMD* odpowiedzialne są za ponad 30% przypadków dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera. Największą grupę opisanych mutacji punktowych stanowią substytucje powodujące powstawanie kodonu Stop, mniej znaleziono mutacji prowadzących do utworzenia lub zaniku donorowych i akceptorowych miejsc składania mRNA oraz mikrodelecji i insercji zmieniających ramkę odczytu [63]. Trudno jest przewidywać, jak zmiana pojedynczego aminokwasu wpływa na funkcjonowanie dużych strukturalnych białek jak dystrofina. Chociaż dystrofina jest białkiem konserwatywnym ewolucyjnie, wydaje się, że istnieje w niej niewiele miejsc znamienych dla jej funkcji (miejsca wiązania aktyny i syntrofiny) oraz przyjmowania odpowiedniej konformacji. Dlatego, oprócz kilku mutacji zmiany sensu o udowodnionym efekcie patogennym, przyjmuje się, że tego typu mutacje nie wywołują choroby, a są jedynie rzadkimi wariantami sekwencji [55, 48, 58, 39].

Pomimo że mutacje punktowe nie są zgrupowane w szczególnych regionach genu *DMD*, poszukuje się „klucza”, który mógłby wskazać miejsca bardziej podatne na substytucje nukleotydowe. Rozmieszczenie w genie *DMD* 1738 potencjalnych miejsc powstawania kodonu Stop jest raczej równomierne, prawdopodobieństwo znalezienia mutacji w poszczególnych eksonach jest więc takie samo. Większość mutacji typu *nonsense* powstaje w wyniku tranzycji C→T zmieniającej kodon CGA w TGA, co wskazuje, że obecność metylowanego dwunukleotydu CpG zwiększa

częstość mutacji [2, 57]. Chociaż stosunkowo dużo mutacji punktowych znaleziono w eksonach najczęściej ulegającym delecji, to nie stwierdzono, jak w przypadku delecji, gorących miejsc, w których częstość mutacji jest znacząco wyższa. Zwiększona liczba opisanych mutacji w eksonach ulegających delecji wynika jedynie z tego, że eksony te analizowane są znacznie częściej niż pozostałe.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA DYSTROFII MIĘŚNIOWEJ DUCHENNE'A/BECKERA

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a/Beckera należy do dużej grupy chorób uwarunkowanych genetycznie, które wykazują szereg wspólnych cech: dotyczą mięśni szkieletowych, mają podobny obraz histopatologiczny i są na ogół postępujące. Diagnostyka laboratoryjna dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera obejmuje głównie badania biochemiczne, elektromiograficzne, histopatologiczne i genetyczne [27]. Decydującą rolę w klasyfikacji dystrofii mięśniowych do niedawna odgrywał sposób dziedziczenia choroby. Od czasu zidentyfikowania genu odpowiedzialnego za dystrofię mięśniową Duchenne'a/Beckera oraz genów odpowiedzialnych za szereg innych dystrofii [11] określenie mutacji w genie i sposobu jej dziedziczenia jest niepodważalnym testem diagnostycznym.

Analiza mutacji genu *DMD*

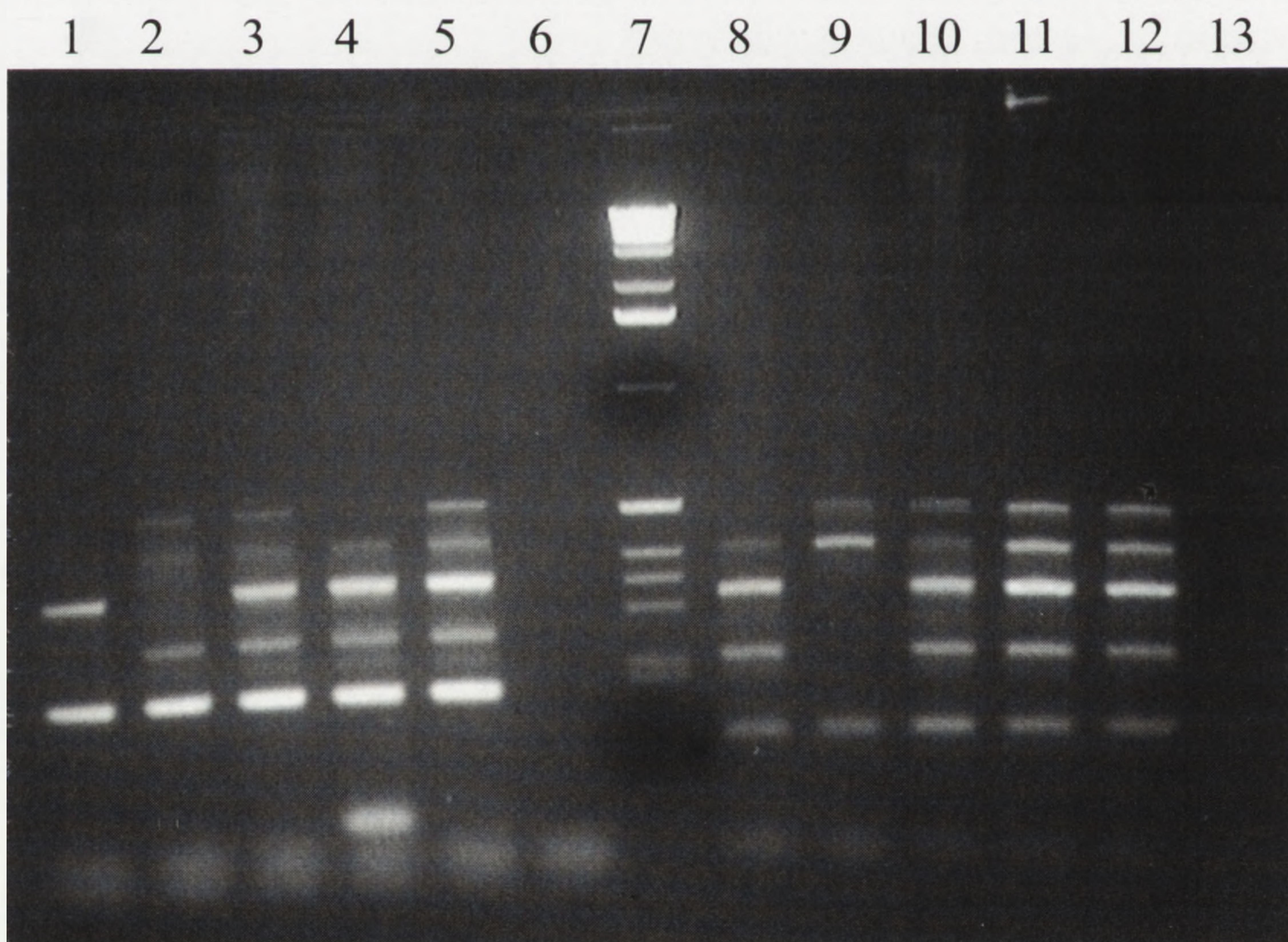
W rutynowej diagnostyce genetyczno-molekularnej dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera analiza mutacji polega na wykrywaniu delecji eksonów położonych w obu gorących miejscach. Początkowo badania zmian strukturalnych genu *DMD* wykonywane były przez hybrydyzację wg Southerna. Podejście to stosowane jest nadal, ale tylko do wykrywania duplikacji. Znacznym uproszczeniem analizy delecji było wprowadzenie metody PCR-multipleks [5, 15]. Metoda PCR zrewolucjonizowała diagnostykę molekularną upraszczając procedurę i przyspieszając czas uzyskania wyniku. Zastosowanie wariantu multipleks metody PCR do diagnostyki *DMD/BMD* ma dodatkowe zalety. Jednoczesna analiza delecji kilku fragmentów genu nie tylko ułatwia badanie, ale również stanowi wewnętrzną kontrolę – przy braku któregoś z amplifikowanych fragmentów obecność pozostałych wskazuje na prawidłowy przebieg reakcji (rys. 5). Obecnie w wielu laboratoriach rutynowo analizuje się region promotora i 19 eksonów genu *DMD*, co umożliwia wykrycie prawie 100% delecji.

Wykrywalne duże rearanżacje genu *DMD* stanowią około dwie trzecie jego mutacji. Pozostałe mutacje to najprawdopodobniej drobne zmiany, które nie są wykrywane w rutynowej diagnostyce dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera. Identyfikacja mutacji punktowych jest jednak konieczna do pełnej diagnostyki choroby szczególnie w przypadkach, gdy zachodzi potrzeba ustalenia nosicielstwa cho-

roby w rodzinie. Ponieważ sekwencjonowanie tak dużego genu jest zbyt kosztowne, aby stosować je do przeszukiwania choćby tylko części kodującej genu *DMD*, dlatego stosuje się metody pozwalające na wstępną selekcję zmienionych fragmentów DNA.

Pierwsze próby identyfikacji mutacji punktowych wywołujących DMD/BMD przeprowadzono analizując strukturę dystrofiny metodą *Western blot* z przeciwciałami specyficznymi dla C-terminalnej domeny dystrofiny [12]. Podejście to jest jednak zbyt pracochłonne, aby mogło być stosowane rutynowo, wymaga bowiem izolacji zarówno białka, jak i mRNA z wycinków mięśni. Nie przyjęła się również metoda chemicznej analizy niesparowań [61] oraz analiza konformacji dwuniciowych DNA [66].

Obecnie stosowanych jest kilka metod wykrywania mutacji punktowych w genie *DMD*, najczęściej jednak stosowana jest analiza polimorfizmu konformacji jednoniciowych DNA (SSCP, ang. *single strand conformation polymorphism*). W większości laboratoriów analizę SSCP przeprowadza się dla eksonów objętych rutynową diagnostyką DMD/BMD z wykorzystaniem do PCR starterów stosowanych do analizy delecji (rys. 6). Dodatkowym uproszczeniem jest wprowadzenie wariantu multipleks metody SSCP, który przyspiesza analizę dużej liczby fragmentów [35, 65,



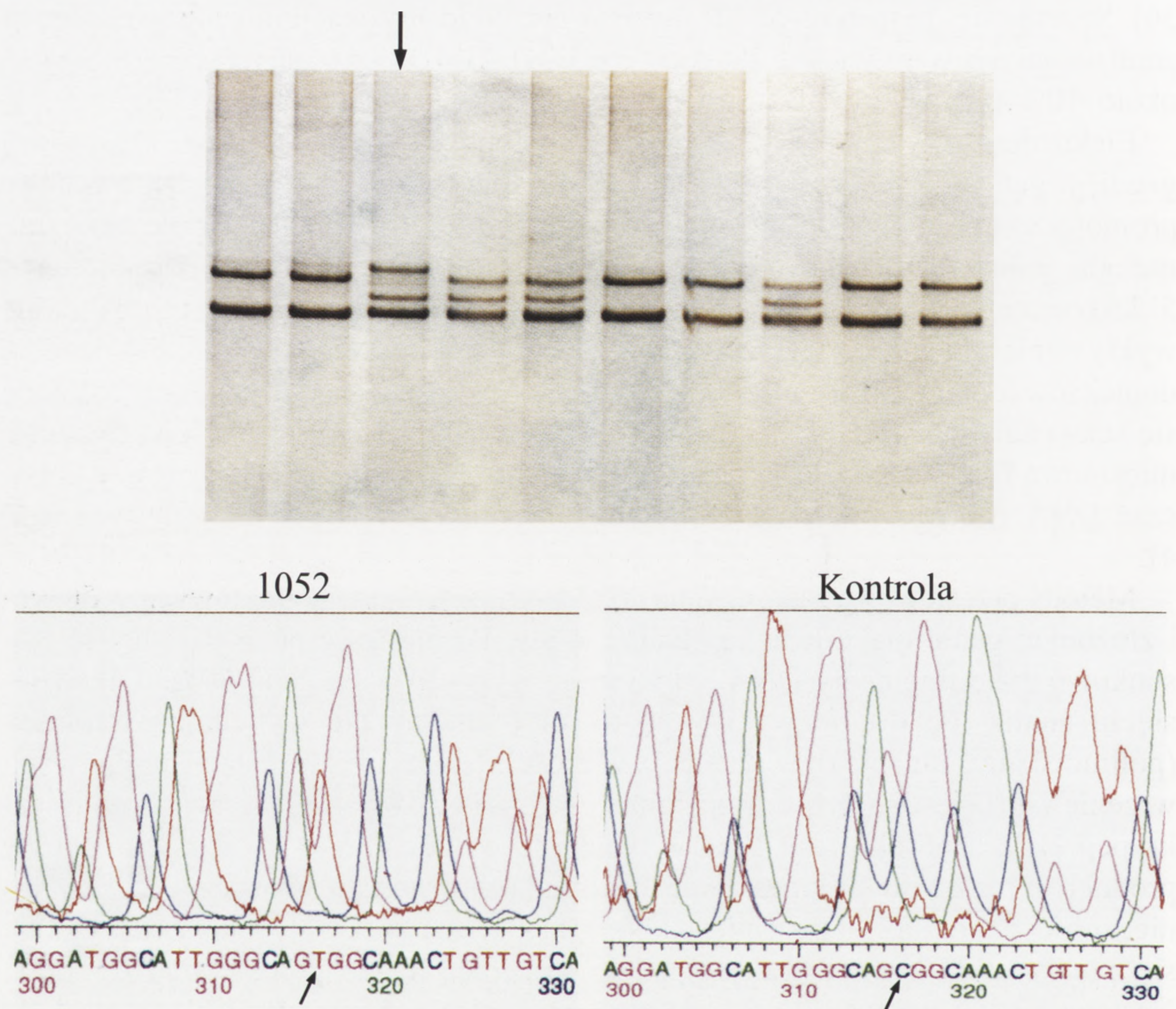
RYСУNEK 5. Przykład analizy delecji w genie *DMD* metodą PCR-multipleks. Tory 1-6, eksony: 45 (547 pz), 49 (439 pz), 8 (380 pz), 50 (271 pz) i 4 (196 pz); tory 8-13, eksony: 48 (506 pz), 3 (410 pz), 12 (331 pz), 13 (238 pz) i 60 (139 pz). Tory 1 i 8, chory 1092 (delecja eksonów 45, 48, 49 i 50); tory 2 i 9, chory 1096 (delecja eksonów 8, 12 i 13); tory 3 i 10, chory 1123; tory 4 i 11, chory 1120 (delecja eksonu 45); tory 5 i 12, kontrola pozytywna DNA(+); tory 6 i 13, kontrola negatywna DNA(-); tor 7, standard wielkości KBL

36]. Szacuje się, że metoda SSCP zastosowana do identyfikacji mutacji w eksonach analizowanych w rutynowej diagnostyce DMD/BMD pozwala wykryć zmiany w około 10% przypadków dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera [72].

Elektroforezę w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE, ang. *denaturing gradient gel electrophoresis*) zastosowano do identyfikacji mutacji punktowych w promotorze mięśniowym i mózgowym genu *DMD* [70]. DGGE jest bardzo czułą metodą, jednak wymaga syntezy specjalnych starterów z przyłączonymi na końcu 5' kilkoma nukleotydami guaninowymi i cytozynowymi. Inną bardzo czułą metodą wykrywania zmian, szczególnie mikrolecji i mikroinsercji jest analiza heterodupleksów (rys. 7). Do utworzenia heterodupleksów konieczne są dwa allele różniące się sekwencją lub wielkością. Aby uzyskać heterodupleksy u chorych na dystrofię mięśniową Duchenne'a/Beckera, którzy są hemizygotami genu *DMD*, należy zmieszać DNA chorego z DNA kontrolnym lub połączyć DNA dwóch chorych [56, 4].

Metody przesiewowe zastosowane do identyfikacji mutacji punktowych w dużym i złożonym genie mają dwie zasadnicze wady. Po pierwsze pozwalają badać stosunkowo małe fragmenty DNA, co wymaga wykonania dla genu *DMD* kilkudziesięciu analiz. Po drugie wykrywają również zmiany nie wywołujące choroby (polimorfizmy, mutacje zmiany sensu). W efekcie poszukiwanie mutacji punktowych w genie *DMD* jest bardzo czasochłonne. Odkrycie zjawiska nieuprawnionej transkrypcji [16], czyli ekspresji genu w tkankach, w których nie występuje białkowy produkt, umożliwiło wykorzystanie mRNA jako materiału wyjściowego bez konieczności pobrania wycinka mięśni. Nieuprawnione transkrypty genu *DMD* izoluje się z leukocytów krwi obwodowej, gdzie występują w liczbie 1 na 1000 komórek. Następnie na matrycy mRNA syntetyzuje się cDNA i metodą PCR amplifikuje poszczególne fragmenty, w ten sposób analizowana sekwencja genu *DMD* zostaje zredukowana do 11 kpz [60].

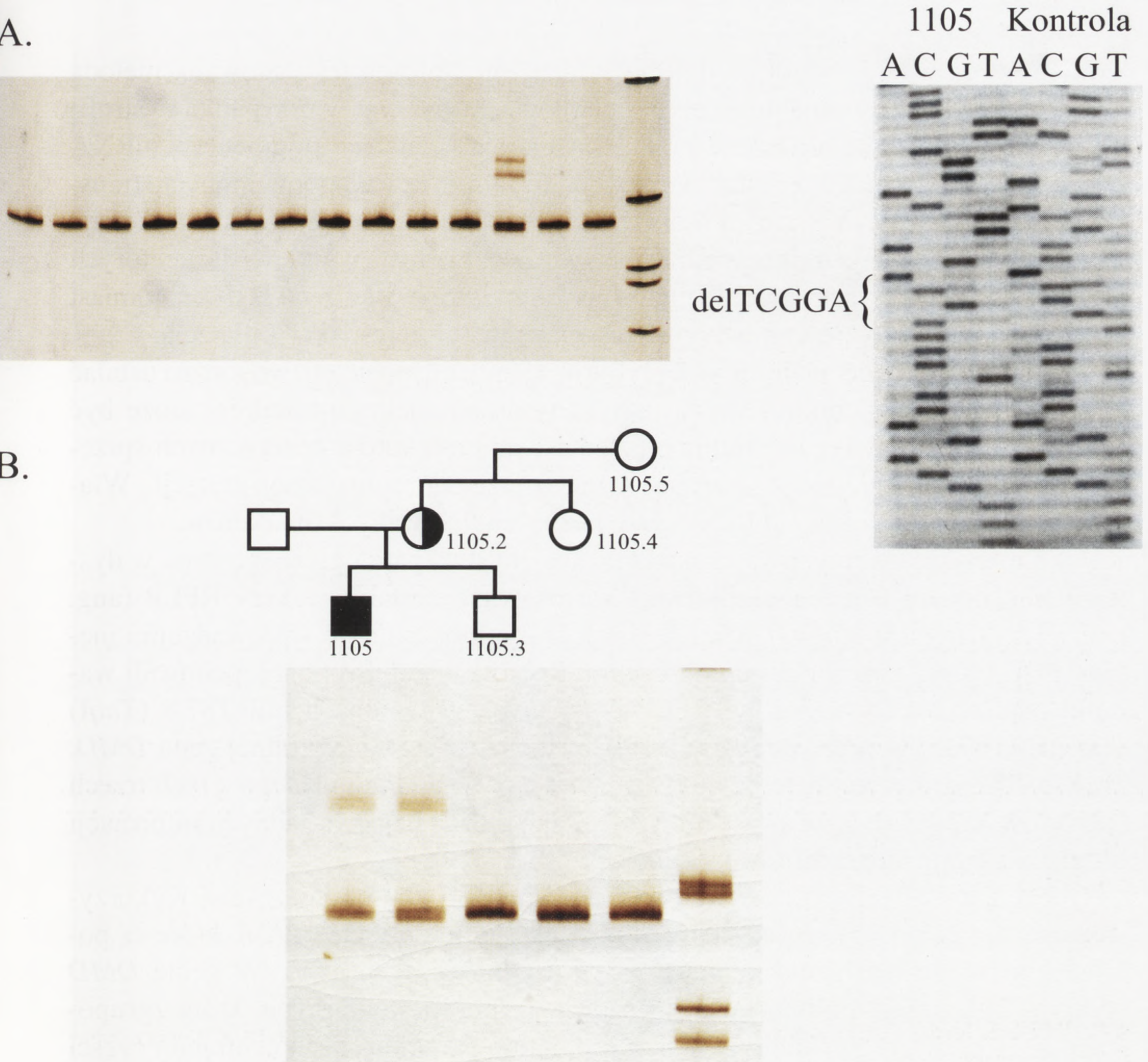
Zjawisko nieuprawnionej transkrypcji genu *DMD* zostało wykorzystane w teście terminacji translacji (PTT, ang. *protein truncation test*), który obejmuje tylko sekwencje kodujące genu [64]. Metoda ta wykrywa wszystkie mutacje powodujące powstawanie kodonu Stop: substytucje, zmieniające ramkę odczytu delecje i insercje oraz mutacje miejsc składania. Test terminacji translacji polega na przeprowadzeniu *in vitro* reakcji transkrypcji i translacji, a następnie porównaniu wielkości powstałego peptydu ze wzorcem. Matrycą do reakcji transkrypcji jest cDNA lub DNA, w przypadku występowania w badanym genie dużych eksonów (powyżej 1500 pz). Starter F zawiera na końcu 5' dodatkowe sekwencje konieczne do przeprowadzenia transkrypcji i translacji *in vitro*: 20-nukleotydową sekwencję promotora faga T7, sekwencję zgodną Kozaka oraz kodon Start. Sekwencja do amplifikacji musi być tak dobrana, aby fragment genu pozostał w tej samej ramce odczytu co kodon ATG. Zaletą tej metody w analizie genu *DMD* jest identyfikacja tylko tych zmian, które uważane są za przyczynę prawie wszystkich przypadków DMD/BMD [24].



RYSUNEK 6. Identyfikacja mutacji punktowej 6671C>T metodą PCR-SSCP. Mutację zmiany sensu zidentyfikowano u chorego 1052; analiza SSCP eksonu 45 wykazała obok dwóch częstych wzorów prążków utworzonych przez dwa polimorficzne allele, dwa dodatkowe: u chorego 1105 oraz u chorego 1052; sekwencjonowanie eksonu 45 przeprowadzone dla chorego 1052 wykazało tranzycję C>T w pozycji 6671 nukleotydu cDNA dystrofiny, zmieniającą kodon CGG argininy w kodon TGG tryptofanu; w dolnej części rysunku przedstawiono wynik sekwencjonowania na zestawie ALFExpress

Określanie nosicielstwa patologicznego genu w przypadku dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera

Identyfikacja mutacji w genie *DMD* ma znaczenie diagnostyczne nie tylko dla chorego, ale przede wszystkim dla jego rodziny, dla kobiet, które mogą być nosicielkami zmutowanego allele. Określenie nosicielstwa choroby ułatwia poradnictwo genetyczne obejmujące oszacowanie ryzyka wystąpienia choroby u innych członków rodziny oraz badania prenatalne. Dla ustalenia nosicielstwa najkorzystniej jest, gdy u chorego określono mutację. Umożliwia to badanie nosicielstwa w sposób bez-



RYSUNEK 7. Wykrycie mikrodelecji 6782delTCGGA w eksonie 45 metodą PCR-HD. Analiza PCR-HD i sekwencjonowanie fragmentów, które utworzyły heterodupleks; sekwencjonowanie przeprowadzono ze starterem R; B – rodowód rodziny 1105 oraz analiza segregacji mutacji w rodzinie. Delecja 5 nukleotydów eksonu 45 powoduje przesunięcie ramki odczytu, w wyniku którego nukleotydy od 6871 do 6873 cDNA dystrofiny (ekson 46) tworzą kodon Stop. W celu określenia nosicielstwa delecji przeprowadzono dla rodziny chorego 1105 analizę heterodupleksów eksonu 45. DNA chorego 1105 i jego zdrowego brata 1105.3 mieszano z DNA kontrolnym. Heterodupleksy powstały u chorego i matki 1105.2, co wskazuje na występowanie delecji w badanych próbach. U siostry matki 1105.4 oraz u babki 1105.5 nie zaobserwowano heterodupleksów i na tej podstawie stwierdzono, że nie są one nosicielkami dystrofii mięśniowej Duchenne’a

pośredni, czyli przez wykazanie obecności lub braku poszukiwanej mutacji u badanej osoby.

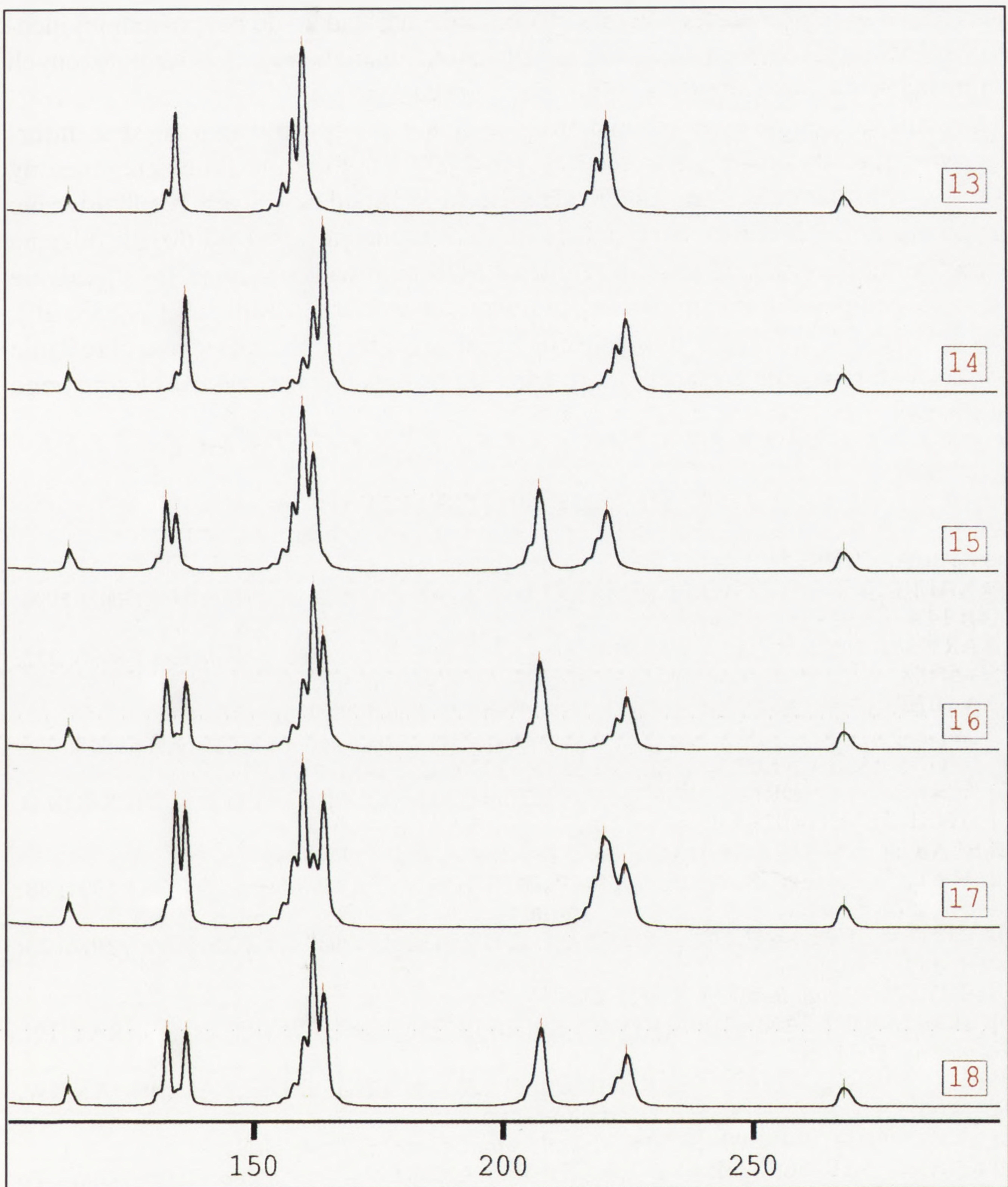
U kobiety, w przypadku analizy delecji nie można wykazać braku fragmentu genu *DMD* metodą PCR multipleks, ponieważ obecność prawidłowego allelu w

jednym chromosomie maskuje delecję w drugim. Najczęściej stosowana metoda bezpośredniego określania nosicielstwa patologicznego genu w przypadku dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera polega na analizie wielkości fragmentów mRNA dystrofiny izolowanego z leukocytów [60, 67]. Analiza nieuprawnionych transkryptów jest obecnie najbardziej wiarygodną metodą ustalania nosicielstwa, zdarzają się jednak bardzo nieliczne przypadki fałszywie negatywnych wyników. U niektórych nosicielek w leukocytach ekspresji ulega tylko prawidłowy allel genu *DMD*, natomiast w mięśniach obecny jest transkrypt zarówno prawidłowy, jak i z delecją.

Jeżeli u chorego nie udało się zidentyfikować mutacji, nosicielstwo można ustalać tylko metodami pośrednimi. Wynik uzyskany drogą analizy pośredniej może być obarczony błędem, gdyż informuje o dziedziczeniu markerów genetycznych sprzężonych w danej rodzinie z chorobą, a nie o dziedziczeniu samej mutacji. Wiarygodność wyniku zależy od rodzaju i liczby analizowanych markerów.

Jako pierwsze do rutynowego ustalania nosicielstwa patologicznego genu w dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera zastosowane zostały markery RFLP (ang. *restriction fragment length polymorphism*), których badanie po wprowadzeniu metody PCR uległo znacznemu uproszczeniu. Roberts i wsp. [59] zaproponowali warunki analizy trzech markerów RFLP położonych w regionach pERT87.8 (*TaqI*) oraz pERT87.15 (*XmnI* i *BamHI*) zlokalizowanych w części centralnej genu *DMD*. Prawie 70% kobiet jest heterozygotycznych dla przynajmniej jednego z tych trzech markerów, co oznacza, że aż dla 30% rodzin nie można uzyskać żadnych informacji o dziedziczeniu nieprawidłowego allelu.

Obecnie do określania nosicielstwa metodami pośrednimi najczęściej wykorzystywane są markery mikrosatelitarne o powtórzonym motywie (CA)_n, które są powszechne w intronach oraz regionach 5' i 3' flankujących geny. W genie *DMD* wykryto kilkanaście polimorficznych sekwencji mikrosatelitarnych, które zgrupowane są w trzech regionach: w pobliżu promotora C, w intronach centralnej części genu oraz w regionie 3'UTR. Dwie z trzech polimorficznych sekwencji mikrosatelitarnych z regionu 5' genu charakteryzują się wysokim polimorfizmem [23], podobnie jak markery znajdujące się w intronach 44, 45, 49 i 50 [18]. Natomiast wszystkie markery wykryte w dystalnej części genu *DMD* mają zaledwie po kilka alleli, przy czym zawsze jeden z alleli występuje w populacji w zdecydowanej przewadze [6, 51, 54]. Niski polimorfizm markerów z regionu 3'UTR powoduje, że w wielu przypadkach ich analiza nie daje informatywnego wyniku o nosicielstwie. W przeciwieństwie jednak do markerów RFLP, analiza trzech markerów mikrosatelitarnych w prawie każdym przypadku wykazuje sprzężenie mutacji z przynajmniej jednym allelem. Biorąc pod uwagę stosunkowo dużą częstość powstawania nowych mutacji oraz rekombinacje wewnątrzgenowe dla uzyskania wiarygodnego wyniku o nosicielstwie dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera konieczna jest analiza dziedziczenia kilku markerów (rys. 8). Dla rodzin, w których u chorego została zidentyfikowana delecja, analiza dziedziczenia markerów mikrosatelitarnych



RYSUNEK 8. Określanie nosicielstwa zmutowanego allelu genu *DMD* przez analizę sekwencji mikrosatelitarnych (CA)_n; przykład przedstawia wykrywanie nosicielstwa zmutowanego allelu genu *DMD* przez jednoczesną analizę trzech markerów mikrosatelitarnych leżących w różnych regionach genu. Skala u dołu rysunku określa wielkości fragmentów w parach zasad. Wierzchołki 113 pz i 268 pz – wewnętrzne standardy. Wierzchołki 133 pz, 135 pz i 137 pz – marker DMD(CA)₃', wierzchołki 158 pz, 160 pz i 162 pz – marker DMD(CA)_{45i}, wierzchołki 208 pz, 220 pz i 224 pz – marker DMD(CA)₅'II. Tor 13, chory 1122; tor 14, ojciec 1122.1; tor 15, matka 1122.2; tor 16, siostra 1122.3; tor 17, siostra 1122.4; tor 18, siostra 1122.5. Sprzężone z mutacją są allele: 135 pz, 158 pz i 220 pz, które występują u chorego. Tylko siostra 1122.4 odziedziczyła od matki allele występujące u chorego, jest więc nosicielką dystrofii mięśniowej Duchenne'a, siostry 1122.3 i 1122.4 nie są nosicielkami

położonych w regionie, który uległ delecji, może prowadzić do bezpośredniej identyfikacji mutacji u nosicielek. Taką możliwość daje analiza markerów położonych w intronach 44, 45 i 49.

Obecnie w diagnostyce molekularnej dąży się do opracowania wysoce informatywnej metody analizy nosicielstwa, gdyż jak dotąd nie ma skutecznej metody terapii dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera. Spodziewanych rezultatów nie przyniosły próby leczenia sterydami [13], a rehabilitacja prowadzi do złagodzenia objawów choroby bez efektów leczniczych. Obecnie nadzieje wiązane są jedynie z terapią genową, której próby podejmowane są w kilku ośrodkach [19, 33, 26]. Przy braku możliwości leczenia dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera określanie nosicielstwa jest jedyną szansą dla rodziny na posiadanie w przyszłości zdrowego potomstwa.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AHN HA, KUNKEL LM. *J Cell Biol* 1995; **128**(3): 363–371.
- [2] AKALIN N, ZIĘTKIEWICZ E, MAKALOWSKI M, LABUDA D. *Hum Mol Genet* 1994; **3**(8): 1425–1426.
- [3] BAR S, BARNEA E, LEVY Z, NEUMAN S, YAFFE D, NUDEL U. *Biochem J* 1990; **272**: 557–560.
- [4] BARBERI AM, SORIANI N, FERLINI A. *Eur J Hum Genet* 1996; **4**: 183–187.
- [5] BEGGS AH, KOENIG M, BOYCE FM, KUNKEL LM. *Hum Genet* 1990a; **86**: 45–48.
- [6] BEGGS AH, KUNKEL LM. *Nucl Acids Res* 1990b; **18**: 1931.
- [7] BLAKE D, LOVE DR, TINSLEY J, MORRIS GE, TURLEY H, GATTER K, DICKSON G, EDWARDS H, DAVIES KE. *Hum Mol Genet* 1992; **1**: 103–109.
- [8] BLAKE DJ, TINSLEY J, DAVIES KE. *Trends Cell Biol* 1994; **4**: 19–23.
- [9] BOYCE FM, BEGGS AH, FEENER C, KUNKEL LM. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 1276–1280.
- [10] BOYD Y, BUCKLE V, HOLT S, MUNRO E, HUNTER D, CRIAG I. *J Med Genet* 1986; **23**: 484–490.
- [11] BROWN RH. *Annu Rev Med* 1997; **48**: 457–566.
- [12] BULMAN DE, GANGOPADHYAY SB, BEBCHUCK KG, WORTON RG, RAY PN, *Genomics* 1991; **10**: 457–460.
- [13] BURROW K, COOVERT DD, KLEIN C.J, BULMAN DE, KISSEL JT, RAMMOHAN KW, BURGHEES AHM. *Neurology* 1991; **41**: 662–666.
- [14] BYERS TJ, LIDOV HGW, KUNKEL LM. *Nature Genet* 1993; **4**: 77–81.
- [15] CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, RANIER JE, CASKEY CT. *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications* 1990; 272–281.
- [16] CHELLY J, CONCORDET JP, KAPLAN JC, KAHN A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2617–2621.
- [17] CHELLY J, HAMARD G, KOULAKOFF A, KAPLAN JC, KAHN A. *Nature* 1990; **344**: 64–65.
- [18] CLEMENS PR, FENWICK RG, CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, DE ANDRADE M, CHAKRABORTY R, CASKEY CT. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 951–960.
- [19] DECROUY A, RENAUD JM, DAVIS HL, LUNDE JA, DICKSON G, JASMIN BJ. *Gene Ther* 1997; **4**: 401–408.

- [20] DEN DUNNEN JT, GROOTSCHOLTEN PM, BAKKER E, BLONDEN LAJ, GINJAAR HB, WAPENAAR MC, VAN PAASSEN HMB, VAN BROECKHOVEN C, PEARSON PL. *Am J Hum Genet* 1989; **45**: 835–847.
- [21] EMERY AEH. *Neuromusc Disord* 1991; **1**: 19–29.
- [22] FEENER CA, KOENIG M, KUNKEL LM. *Nature* 1989; **338**: 509–511.
- [23] FEENER CA, BOYCE FM, KUNKEL LM. *Am J Hum Genet* 1991; **48**: 621–627.
- [24] GARDNER RJ, BOBROW M, ROBERTS RG. *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 311–320.
- [25] GÓRECKI DE, MONACO AP, DERRY JM, WALKER AP, BARNARD EA, BARNARD PJ. *Hum Mol Genet* 1992; **1**: 505–510.
- [26] GUSSONI E, BLAU HM, KUNKEL LM. *Nature Med* 1997; **3(9)**: 970–977.
- [27] HAUSMANOWA-PETRUSEWICZI. *Choroby Mięśni* Wydawnictwo Naukowe PWN, 1993: 189–206.
- [28] HOFFMAN EP, SCHWARTZ L. *Mol Aspects Med* 1991; **12**: 175–194.
- [29] HOLDER E, MASATO M, BIES RD. *Hum Genet* 1996; **97**: 232–239.
- [30] HU X, RAY PN, MURPHY EG, THOMPSON MW, WORTON RG. *Am J Hum Genet* 1990; **46**: 682–695.
- [31] HU X, RAY PN, WORTON RG. *EMBO J* 1991; **10(9)**: 2471–2477.
- [32] HU X, WORTON RG. *Hum Mut* 1992; **1(1)**: 3–12.
- [33] HUARD J, KRISKY D, OLIGINO T, MARCONI P, DAY CS, WATKINS SC, GLORIOSO JS. *Neuromusc Disord* 1997; **7(5)**: 299–313.
- [34] HUGNOT JP, GILGENKRANTZ H, VINCENT N, CHAFEY P, MORRIS GE, MONACO AP, BERWALD-NETTER Y, KOULAKOFF A, KAPLAN JC, KAHN A, CHELLY J. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7506–7510.
- [35] KILIMAN MW, PIZZUTI A, GROMPE M, CASKEY CT. *Hum Genet* 1992; **89**: 253–258.
- [36] KNEPPERS ALJ, DEUTZ-TERLOUW PP, DEN DUNNEN JT, VAN OMMEN GJB, BAKKER E. *Hum Mut* 1995; **5**: 235–242.
- [37] KOENIG M, HOFFMAN EP, BERTELSON CJ, MONACO AP, FEENER C, KUNKEL LM. *Cell* 1987; **50**: 509–517.
- [38] LEDERFEIN D, YAFFE D, NUDEL U. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1883–1888.
- [39] LENK U, OEXLE K, VOIT T, ANCKER U, HELLNER KA, SPEER A, HUBNER C. *Hum Mol Genet* 1996; **5(7)**: 973–975.
- [40] LIDOV HGW, BYERS TJ, WATKINS SC, KUNKEL LM. *Nature* 1990; **348**: 725–729.
- [41] LIDOV HW, SELIG S, KUNKEL LM. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 329–335.
- [42] LINDENBAUM RH, CLARKE G, PATEL C, MONCRIEFF M, HUGHES JT. *J Med Genet* 1979; **16**: 389–392.
- [43] LOPES J, RAVISE N, VANDENBERGHE A, PALAU F, IONASESCU V, MAYER M, LEVY N, WOOD N, TACHI N, BOUCHE P, LATOUR P, RUBERG M, BRICE A, LEGUERN E. *Hum Mol Genet* 1998; **7(1)**: 141–148.
- [44] MCNAUGHTON JC, HUGHES G, JONES WA, STOCKWELL PA, KLAMUTH HJ, PETERSEN GB. *Genomics* 1997; **40**: 294–304.
- [45] MICIĄK A, KEEN A, JADAYEL D, BUNDEY S. *J Med Genet* 1992; **29**: 123–126.
- [46] MONACO AP, BERTELSON CJ, LIECHTI-GALLETI S, MOSER H, KUNKEL LM. *Genomics* 1988; **2**: 90–95.
- [47] NIELSEN BL, NIELSEN IM. *Ann Genet* 1984; **27(3)**: 173–177.
- [48] NIGRO V, NIGRO G, ESPOSITO MG, COMI LI, MOLINARI AM, PUCA GA, POLITANO L. *Hum Mol Genet* 1994; **3(10)**: 1907–1908.
- [49] NOBILE C, GALVAGNI F, MARCHI J, ROBERTS R, VITIELLO L. *Genomics* 1995; **28**: 97–100.
- [50] NUDEL U, ZUK D, EINAT P, ZEELON E, LEVY Z, NEUMAN S, YAFFE D. *Nature* 1989; **337**: 76–78.
- [51] OUDET C, HEILIG R, MANDEL JL. *Hum Genet* 1990; **84**: 283–285.

- [52] OUDET C, HANAUER A, CLEMENS P, CASKEY T, MANDEL JL. *Hum Mol Genet* 1992; **1(8)**: 599–603.
- [53] PIZZUTI A, PIERETTI M, FENWICK RG, GIBBS RA, CASKEY CT. *Genomics* 1992; **13**: 594–600.
- [54] POWELL JF, FODOR FI, COCKBURN DJ, MONACO AP, CRIAG IW. *Nucl Acids Res* 1990; **19**: 1159.
- [55] PRIOR TW, PAPP AC, SNYDER PJ, BURGHEES AHM, BARTOLO C, SEDRA MS, WESTERN LM, MENDELL JR. *Nature Genet* 1993; **4**: 357–360.
- [56] PRIOR TW, PAPP AC, SNYDER PJ. *Am J Med Genet* 1994; **50**: 68–73.
- [57] PRIOR TW, BARTOLO C, PEARL DK, PAPP AC, SNYDER PJ, SEDRA MS, BURGHEES AHM, MENDEL JR. *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 22–33.
- [58] RININSLAND F, REISS J. *Hum Genet* 1994; **94**: 111–116.
- [59] ROBERTS RG, COLE CG, HART KA, BOBROW M, BENTLEY DR. *Nucl Acids Res* 1989; **17(2)**: 811.
- [60] ROBERTS RG, BENTLEY DR, BARBY TFM, MANNERS E, BOBROW M. *Lancet* 1990; **336**: 1523–1526.
- [61] ROBERTS RG, BOBROW M, BENTLEY DR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 2331–2335.
- [62] ROBERTS RG, COFFEY AJ, BOBROW M, BENTLEY DR. *Genomics* 1993; **16**: 536–538.
- [63] ROBERTS RG, GARDNER RJ, BOBROW M. *Hum Mut* 1994; **4**: 1–11.
- [64] ROEST PAM, ROBERTS RG, SUGINO S, VAN OMMEN GJB, DEN DUNNEN JT. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1719–1721.
- [65] SAAD FA, VITIELLO L, OLIVIERO S, MOSTACCIULLO ML, DANIELI GA. *PCR Met and Applic* 1993; **3**: 60–62.
- [66] SAAD FA, VITA G, TOFFOLATTI L, DANIELI GA. *Neuromusc Disord* 1994; **4(4)**: 335–341.
- [67] SCHLOESSER M, SŁOMSKI R, WAGNER M, REISS J, BERG LP, KAKKAR VV, COOPER DN. *Mol Biol Med* 1990; **7**: 519–523.
- [68] SOUZA VND, THI MAN N, MORRIS GE, KARGES W, PILLERS AM, RAY PN. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 837–842.
- [69] TINSLEY J, BLAKE DJ, DAVIES KE. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 521–524.
- [70] TUBIELLO G, CARRERA P, SORIANI N, MORANDI L, FERRARI M. *Mol Cell Probes* 1995; **9**: 441–446.
- [71] VAN BAKEL I, HOLT S, CRIAG I, BOYD Y. *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 329–336.
- [72] VAN ESSEN AJ, KNEPPERS ALJ, VAN DER HOUT AH, SCHEFFER H, GINJAAR IB, TEN KATE LP, VAN OMMEN GJ, BUYS C, BAKKER E. *J Med Genet* 1997; **34**: 805–812.
- [73] VAN OMMEN GJB, BERTELSON C, GINJAAR HB, DEN DUNNEN JT, BAKKER E, CHELLY J, MATTON M, VAN ESSEN AJ, BARTLEY J, KUNKEL LM, PEARSON PL. *Genomics* 1987; **1**: 329–336.

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

GEN *APC****APC* GENE**Andrzej PŁAWSKI¹, Jacek PASZKOWSKI³, Ryszard SŁOMSKI^{1,2}¹Zakład Genetyki Człowieka PAN, ²Katedra Biochemii i Biotechnologii AR,
³III Klinika Chirurgii AM w Poznaniu

Streszczenie: Rodzinna polipowatość jelita grubego jest dziedziczną dominującą chorobą nowotworową charakteryzującą się występowaniem licznych polipów w jelicie grubym i odbytnicy. Nie leczone polipy rozwijają się w nowotwór złośliwy w wieku około 40 lat. Występowanie choroby związane jest w mutacjami w genie *APC* zlokalizowanym w regionie 5q21. Gen *APC* jest genem supresorowym nowotworów i działa jako negatywny regulator w szlaku transdukcji *Wnt*. Mutacje tego genu są dziedziczne lub powstają *de novo* w rodzicielskiej linii płciowej. Najczęściej obserwuje się występowanie mikromutacji w postaci delecji lub insercji kilku par zasad. W nielicznych przypadkach obserwowane są substytucje. W większości przypadków mutacje genu *APC* prowadzą do skrócenia białka APC (300 kD). Mutacje w drugim allelu genu powodują brak funkcjonalnego białka APC, co prowadzi do dysplazji, a następnie rozwoju choroby nowotworowej.

Summary: Familial adenomatous polyposis coli is dominantly inherited cancer disease characterized by numerous adenomatous polyps of the colon and rectum. The polyps progressing to malignancy in untreated carriers of mutant gene with a median age at diagnosis of 40 years. FAP is linked with mutations in localized on chromosome 5q21 *APC* gene. *APC* gene is a tumor suppressor gene and acts as a negative regulator of the *Wnt* signal transduction cascade. The mutations of *APC* gene are inherited, or *de novo* arise in parental germ line. The most of mutations of the gene are small mutation observed as deletion or insertion a few base pair. In rare cases we can observe substitutions. Most of the *APC* mutations truncate the 300 kD *APC* protein product. During lifetime mutation in second copy of *APC* gene cause absence of functional *APC* protein that lead to displasia and progression of cancer disease.

HISTORIA BADAŃ GENU *APC*

W 1951 roku Gardner opisał pierwszy przypadek polipowatości jelita grubego [16]. W następnym roku opisano autosomalnie dominujący sposób dziedziczenia predyspozycji do występowania polipowatości oraz kostniaków (*osteoma*), zasugerowano również, że obie choroby mogą być związane z tym samym genem. W 1972 roku został opisany zespół Gardnera, który przez długi czas był traktowany jako oddzielna jednostka chorobowa [17], ponieważ w kilku rodzinach zaobserwowano różny stopień nasilenia objawów pozajelitowych [48, 11]. Większość pacjentów z FAP manifestuje jeden lub więcej objawów pozajelitowych, a obie choroby są związane z mutacjami w tym samym genie. Wobec tego zespół Gardnera (OMIM 175100.0006) traktowany jest jako forma rodzinnej polipowatości jelita [41]. Występowanie FAP zaczęto wiązać z regionem q21-q22 chromosomu 5 na podstawie obserwacji dużej delecji wykrytej w badaniach cytogenetycznych i badaniach sprzężeń markerów RFLP pacjenta z zespołem Gardnera i zaawansowanym rozwojem polipów w jelicie grubym [21]. Pod koniec lat osiemdziesiątych badania sprzężeń ukierunkowały poszukiwania genu na region obejmujący oddalone od siebie o 150 kbpz geny *APC* i *MCC*. W 1991 roku u chorych z FAP przebadano trzy geny: *DP1*, *SRP19* i *DP2.5* znajdujące się w regionie, który uległ delecji. U dwóch pacjentów z FAP zaobserwowano 4 mutacje w genie *DP2.5* (*APC*), które prowadziły do powstania kodonu Stop, a jedna z nich była przekazana potomstwu [18]. W następnym roku przebadano 79 chorych z FAP i zaobserwowano mutacje w genie *APC* u 67% chorych. W 92% były to mutacje prowadzące do skrócenia produktu białkowego genu *APC* [35]. W wielu krajach zaczęto badać występowanie mutacji w genie *APC* i utworzono bazy danych mutacji dziedzicznych i somatycznych, w których zgromadzono dane o 332 mutacjach dziedzicznych i 402 mutacjach somatycznych [2,13]. Funkcja białka *APC* była badana od 1993 roku, gdy zaobserwowano, że wiąże się ono z β -kateniną, co wskazywało na jego uczestniczenie w adhezji komórek [48, 51].

BUDOWA I LOKALIZACJA GENU *APC*

Gen *APC* położony jest na chromosomie 5 w regionie q21 i zawiera 21 eksonów [53]. Charakterystyczne dla genu *APC* jest występowanie dużego eksonu, który obejmuje ponad 70% sekwencji kodującej. Ekspresja obserwowana jest we wszystkich tkankach organizmu. Kodon Start położony jest w eksonie 1. Produktem transkrypcji jest 8538 nukleotydowy mRNA [18, 25]. Alternatywne składanie genu jest tkankowo specyficzne. W komórkach mózgu występuje produkt genu *APC*, dla którego kodon Start położony jest w eksonie BS (ang. *brain specific*). Po stronie 5' eksonu 1 występują cztery eksony 0.3, 0.1, 0.2, BS ulegające alternatywnemu składaniu. Eksony te mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji genu [30]. W eksonach

0.3 i BS znajdują się kodony Start, a także sekwencje inicjacji translacji. W eksonie 0.2 nie ma sekwencji inicjacji translacji mimo występowania kodonu Start. Ekson 0.1 nie zawiera sygnału Start, a występowanie w jego obrębie częstego polimorfizmu, który powoduje powstanie kodonu Stop, sugeruje, że ekson ten nie ulega translacji. Powstanie produktu białkowego na matrycy eksonów z końca 5' w stosunku do eksonu 1 jest możliwe tylko w przypadku, gdy transkrypt nie zawiera eksonu 1. Położony w eksonie 1 w części 5' kodon Stop uniemożliwia translację takiego mRNA. Wyeliminowanie kodonu 1, który koduje domenę *coiled coil*, o której wiadomo, że służy do homo- lub heterodimeryzacji [9], wpływa na funkcjonalność produktu białkowego [53]. Występowanie alternatywnego składania związane jest również z wyeliminowaniem efektu mutacji skracającej produkt białkowy przez wycięcie całego eksonu. Zwłaszcza alternatywne składanie początkowych eksonów genu może być związane z występowaniem łagodnej formy polipowatości – AAPC (ang. *attenuated adenomatous polyposis coli*) [52]. Podobny efekt zaobserwowano w jednej z dwóch rodzin z mutacjami na końcu 3' eksonu 9, gdzie w jednym przypadku wykazano modyfikujący efekt alternatywnego składania, prowadzący do łagodnej formy FAP. W związku z tym uważa się, że rodzaj, położenie mutacji, jak również efekt alternatywnego składania wpływają na przebieg choroby [10]. W przypadku genu *APC* funkcja produktu wynika z tworzenia różnych jego form przez alternatywne składanie. Transkrypty zawierające eksony BS, 0.3, 0.2, 0.1 obserwuje się w komórkach zróżnicowanych, które nie mogą rozpocząć cyklu komórkowego.

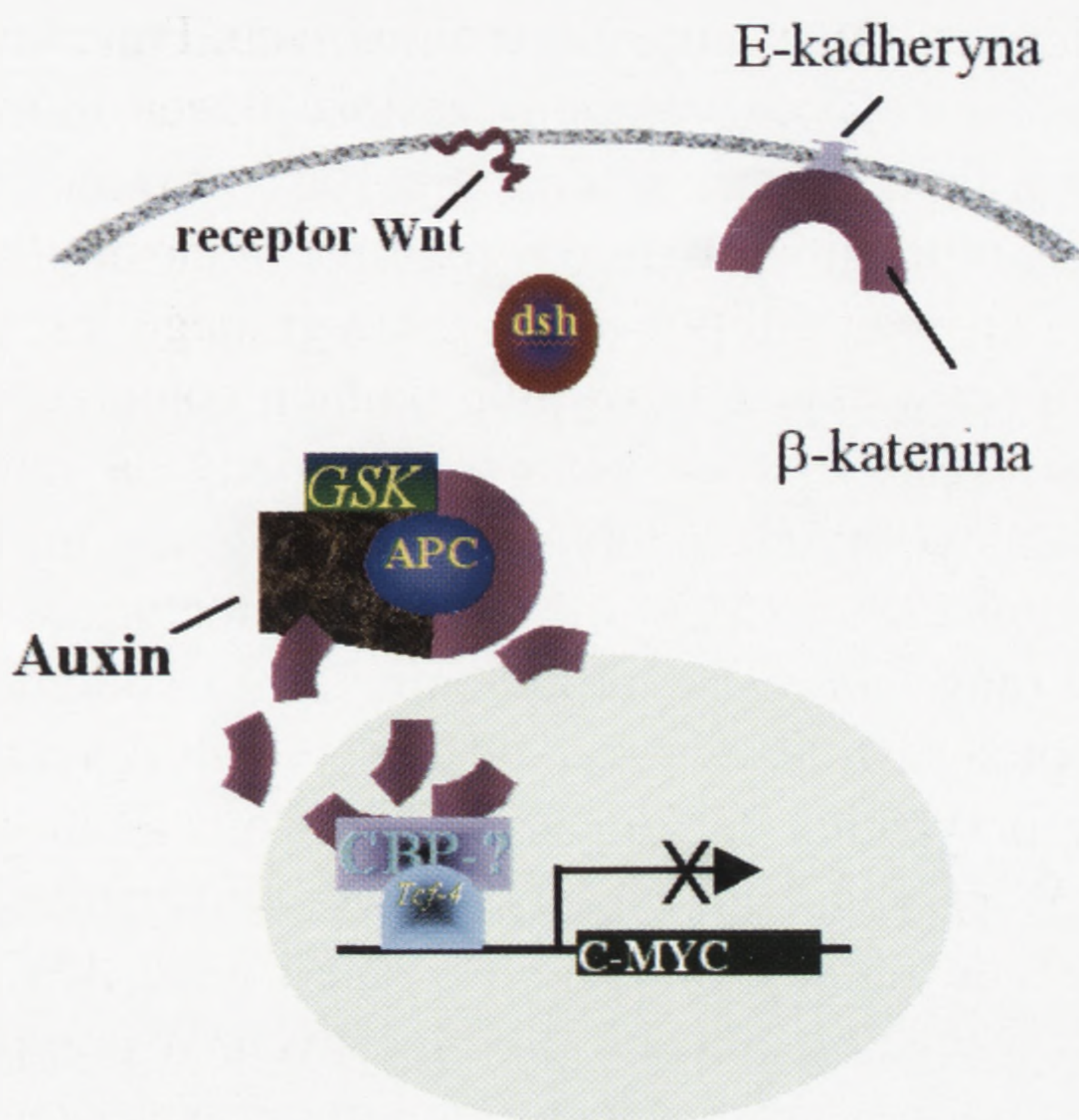
Bardzo ciekawa jest obserwacja międzygenowego składania, w wyniku którego z genu *APC* zostaje wycięty ekson 14 i obejmujący prawie 70% genu ekson 15, a pozostały fragment łączy się z końcem 3' genu *SRP1* [22]. Wycięcie eksonu 14 lub 15 prowadzi do powstania dwóch izoform produktu różniących się zdolnością wiązania mikrotubul i β -kateniny, jak również sekwencją regionu 3' nie podlegającego translacji, co może wpływać na stabilność mRNA oraz na różne funkcje produktu [60]. Alternatywne składanie genu jest w tym przypadku związane z regulacją aktywności białka APC i nasuwa przypuszczenie, że pełni ono wiele różnych funkcji w komórce zwłaszcza, że w alternatywnym składaniu bierze udział ponad 75% eksonów tego genu.

BUDOWA I FUNKCJA BIAŁKA *APC*

Hydrofobowy produkt białkowy genu *APC* składa się z 2843 aminokwasów [18,25]. Pełnej długości białko APC obserwowane jest w cytoplazmie oraz w jądrze komórkowym [40]. Białko zawiera jedną domenę zasadową obejmującą aminokwasy 2200–2400 [18]. Dotychczas poznano kilka białek wchodzących w interakcję z

białkiem APC. Należą do nich białko DLG, białko mikrotubul, GSK β -3, β -katenina, γ -katenina, p34, Tid56, białko Auxin i białko APC. Interakcje z wieloma białkami oznaczają, że białko APC bierze udział w regulacji wielu procesów w komórce, do których należą: podział komórek, migracja, adhezja i różnicowanie komórek (ang. *cell fate determination*) [1]. W białku APC wyodrębniono kilka funkcjonalnych domen. Fragment N-końcowy białka między aminokwasami 1-171 zaangażowany jest w oligomeryzację. Region ten znajduje się w obszarze obejmującym 900 pierwszych aminokwasów genu, które złożone są z 7-aminokwasowych powtórzeń typu aminokwas apolarny-XX-aminokwas apolarny-XXX tworzących strukturę super spirali. W warunkach doświadczalnych wystarczy 55 aminokwasów dla utworzenia stabilnego dimeru [24]. Jak już zauważono, białko APC wiąże się z β -kateniną, co wskazuje na jego funkcję związaną z adhezją komórek [46]. W białku APC występują dwa miejsca wiązania β -kateniny. Pierwsze znajduje się we fragmencie obejmującym trzy 15-nukleotydowe powtórzenia między aminokwasami 1020–1169 [51]. Drugie miejsce wiązania β -kateniny znajduje się w regionie 20-aminokwasowych powtórzeń typu F-X-VE-X-TP-XCF SR-X-SSLSSLS między aminokwasami 1324–2075, który ulega fosforylacji przez kinazę GSK3 β [18, 51]. Wiązanie z mikrotubulami, występujące podczas zwiększonej ekspresji genu, odbywa się za pomocą fragmentu obejmującego aminokwas 2130–2483 [37]. Aminokwas 2560–2843 są miejscem wiązania z białkiem EB1, a aminokwas 2771–2843 wiążą się z białkiem DLG [34, 58]. Nie wyodrębniono regionu związanego z procesem apoptozy, zaobserwowano jednak, że ekspresja prawidłowego białka APC w komórkach linii nowotworowej jelita prowadzi do wystąpienia tego zjawiska. W komórkach śluzówki jelita grubego produkt genu APC o masie 300 kDa uczestniczy w kontaktowym hamowaniu wzrostu komórek.

Białko APC oddziałuje z γ -kateniną i β -kateniną. Obydwa białka wiążą się z białkiem adhezyjnym E-kadheryną. Fearon [14] na podstawie badań nowotworów dziedzicznych zaproponował model, w którym białko APC bierze udział w transdukcji sygnału i przez degradację β -kateniny wpływa na aktywność czynnika transkrypcji Tcf4 (ang. *T-cell transcription factor 4*) [14]. Białkiem regulującym tworzenie kompleksu białka APC z β -kateniną jest kinaza białkowa ZW3/GSK3 β . Fosforylacja białka APC aktywuje wiązanie β -kateniny. Aktywność kinazy GSK3 β jest regulowana przez białko dsh, wchodzące w interakcje z produktem genu *WNT1*. Sygnał proliferacji z *WNT1* może być inhibowany w wyniku ekspresji białka Auxin. Białko APC związane z kinazą ZW3/GSK3 β ma zdolność inhibowania transkrypcji indukowanej przez β -kateninę. W przypadku utraty funkcji produktu genu APC następuje aktywacja czynnika transkrypcji Tcf4 (*TCF7L2*) – rysunek 1 [14]. Komórka jest pobudzona do proliferacji w wyniku aktywacji transkrypcji genu *c-MYC* przez Tcf4 [20]. Gen *c-MYC* jest protoonkogenem położonym na chromosomie 8 w regionie q24 [61]. Produkt genu zlokalizowany jest w jądrze komórkowym i ma zdolność wiązania z DNA [47]. Produkt białkowy genu *c-MYC* aktywuje gen wzrostu –



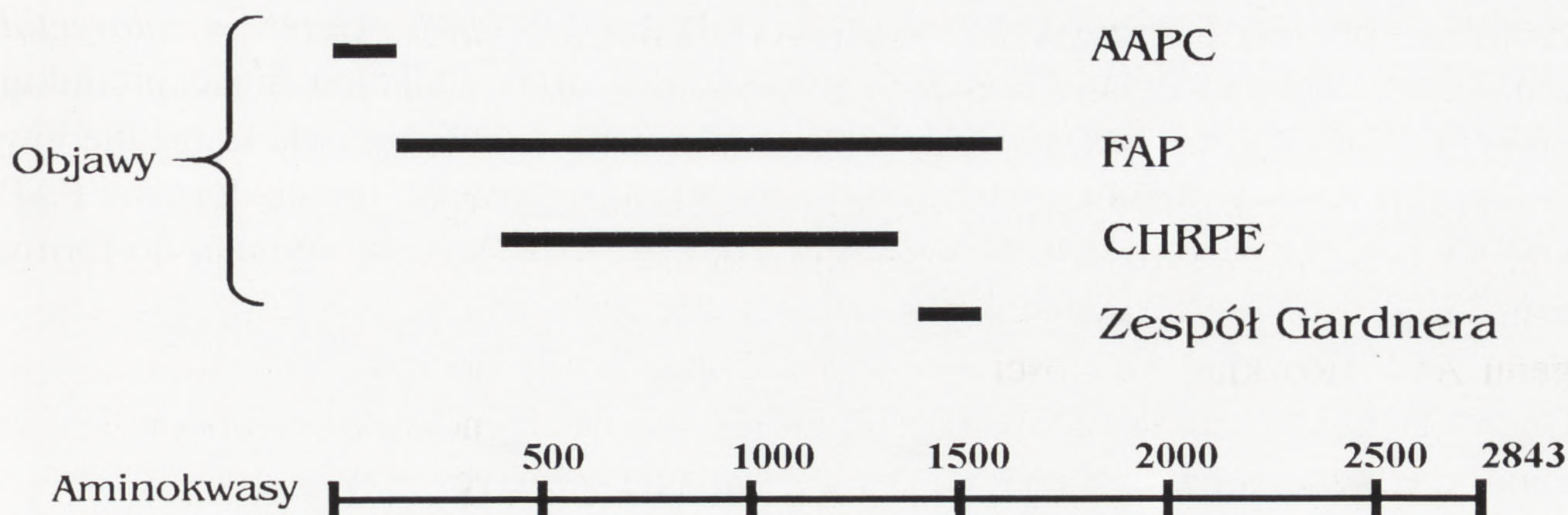
RYSUNEK 1. Rola białka APC w kontroli aktywności *C-MYC* przez degradację β -kateniny

dekarboksylazę ornityny (*ODC1*) i gen *CDC25A*, ponadto jest inhibitorem genu *GAS1* [31]. Wykazano również, że aktywowany kompleks β -katenina-Tcf4 indukuje ekspresję Tcf1 [50]. W komórkach śluzówki jelita grubego gen *APC* działa jako regulator cyklu komórkowego inhibujący przez regulację poziomu β -kateniny sygnał proliferacji pochodzący od transmembranowego białka E-kadheryny. Zaangażowany jest więc w proces utrzymywania liczby komórek na stałym poziomie. W przypadku utraty funkcjonalności tego genu w tkance zostaje zaburzona równowaga między podziałami i śmiercią komórek.

MUTACJE GENU *APC*

Mutacjami genu *APC* są najczęściej delecje lub insercje kilku par zasad, a także substytucje. Większość mutacji (98%) stanowią mutacje prowadzące do skrócenia produktu białkowego. W przypadku substytucji, które stanowią 30% mutacji, kodon Stop powstaje w miejscu mutacji, a w przypadku delecji lub insercji stanowiących 68% mutacji powstaje w jej pobliżu w wyniku zmiany ramki odczytu [2, 38]. W genie występuje region o podwyższonej częstości występowania mutacji – MCR (ang. *mutation cluster region*), który obejmuje kodony 1055–1309. W regionie

tym występuje 23% wszystkich mutacji germinalnych. Ponadto wśród mutacji germinalnych zaobserwowano podwyższoną częstość trzech mutacji: delecji 5 pz w kodonie 1309 (10%), delecji 5 pz w kodonie 1061 oraz delecji 4 pz w kodonie 1064 [32]. Większość mutacji występuje w regionie 5' eksonu 15 genu *APC*. Charakterystyczną cechą rodzinnej polipowatości jelita grubego jest utrata heterozygotyczności w genie *APC* powstająca w wyniku mutacji somatycznej w drugim allelu genu *APC*. Rozkład częstości tych mutacji jest różny od mutacji germinalnych. Do 60% mutacji somatycznych znajduje się we fragmencie, który obejmuje 8% genu między kodonami 1286 i 1513 [38]. Mutacje somatyczne występują w dwóch gorących miejscach (ang. *hot spots*) w kodonie 1309 i kodonie 1450 [2]. Mutacje w genie *APC* występują również w przypadkach sporadycznych nowotworów jelita grubego, a także w przypadku rodzinnego nowotworu jelita grubego bez polipowatości (HNPCC). W przypadkach tych nowotworów występują pojedyncze guzy, ponieważ musi dojść do mutacji w jednym z alleli genu *APC*, a następnie utraty heterozygotyczności w wyniku mutacji sporadycznych. W przypadku dziedzicznego nowotworu jelita bez polipowatości proces ten jest przyspieszany przez dziedziczne mutacje w genach kontroli integralności genomu [15]. Według najnowszych badań, dla inicjacji sporadycznego nowotworu jelita grubego nie musi wystąpić LOH w *APC*. W połowie sporadycznych nowotworów, w których nie zaobserwowano zmian w *APC*, powstanie nowotworu związane jest z heterozygotycznymi mutacjami w genie β -kateniny (*CTNNB1*). Mutacje występują w miejscu fosforylacji β -kateniny przez kinazę GSK 3 β . Powodują one wyłączenie regulacyjnej funkcji genu *APC*, co prowadzi do kumulacji β -kateniny, a tym samym ekspresji genu *MYC* i rozwoju nowotworu jelita grubego [36]. β -katenina znajduje się za genem *APC* (ang. *downstream*) w szlaku kontaktowego hamowania wzrostu i w przypadku mutacji w tym genie proces nowotworowy przebiega niezależnie od stanu genu *APC*. Utrata heterozygotyczności w locus 5q21 obserwowana jest także w nowotworach wyższych odcinków przewodu pokarmowego, jak również nowotworach płuc [43, 54]. Podjęto próbę określenia związku między położeniem mutacji terminujących translację a obrazem klinicznym choroby i wystąpieniem objawów pozajelitowych. Zaobserwowano, że wystąpienie kodonu Stop przed kodonem 157 powoduje zmniejszenie liczby polipów i łagodny przebieg choroby [57]. Klasyczny przebieg polipowatości z licznymi polipami ma miejsce w przypadku wystąpienia sygnału Stop między kodonami 169 a 1600 [38]. Mutacje występujące między kodonami 1403 i 1587 prowadzą do nasilenia objawów pozajelitowych (rys. 2) [12]. Występowanie włóknakowatości naciekowej związane jest z mutacjami w regionie między kodonami 1445 a 1578 [6]. Mutacje w końcu 3' genu *APC* dają zróżnicowany obraz przebiegu choroby zarówno pod względem liczby polipów, jak również występowania objawów pozajelitowych.



RYSUNEK 2. Korelacja lokalizacji mutacji w genie *APC* z przebiegiem rodzinnej polipowatości jelita grubego

PROGRESJA ZMIAN MORFOLOGICZNYCH I GENETYCZNYCH W RODZINNEJ POLIPOWATOŚCI JELITA GRUBEGO

Dziedziczenie zmutowanego allelu genu *APC* nie wywołuje obrazu klinicznego choroby. Pojawienie się objawów klinicznych związane jest z sekwencją dalszych zdarzeń w komórce. W przypadku rodzinnej polipowatości komórki charakteryzują się bardzo wysokim ryzykiem wystąpienia utraty heterozygotyczności w wyniku dziedziczenia jednego zmutowanego allelu. W czasie rozwoju nowotworu zachodzą zmiany w obrębie genów supresorowych, onkogenów i genów naprawy DNA. Delecje obserwuje się w regionach występowania genów hamujących proliferację 5q (*APC*, *MCC*), 17p (*TP53*), 18q (*DCC*), a mutacje punktowe w obrębie protoonkogenu *K-ras* [4]. Przebieg rozwoju nowotworu w jelicie grubym jest podobny w przypadkach tak sporadycznych, jak i dziedzicznych [15]. Różnice obserwowane są tylko na etapie inicjacji, w przypadkach sporadycznych zarówno mutacja jednego allelu, jak i utrata heterozygotyczności w genie *APC* następuje w wyniku mutacji spontanicznej lub pod wpływem czynników mutagennych środowiska. W przypadku FAP ryzyko utraty heterozygotyczności jest bardzo wysokie, ponieważ jeden z alleli dziedziczony jest w formie zmutowanej. Ryzyko inicjacji nowotworu w przypadku HNPCC jest również wysokie w wyniku dziedziczenia mutacji w genach odpowiedzialnych za integrację genomu. Mimo różnych przyczyn pierwszym etapem inicjacji choroby nowotworowej jest utrata heterozygotyczności w locus *APC*, prowadzącym do zwiększenia proliferacji komórek w wyniku aktywacji transkrypcji protoonkogenu *c-MYC*. Częste podziały komórek prowadzą do wyselekcjonowania klonu z uszkodzonym genem *MCC*, co prowadzi do powstania dysplazji i w dalszym etapie do powstania gruczolaka stopnia pierwszego. Wzrost tempa podziałów komórek powoduje dalsze gromadzenie błędów genetycznych, w wyniku czego na-

stępuje aktywacja protoonkogenu *K-ras* i delecja *DCC* (ang. *deleted in colorectal cancer*). Kolejnym etapem rozwoju nowotworu jest utrata funkcjonalności produktu genu *TP53*, co prowadzi do powstania gruczolakoraka, a dalsze gromadzenie błędów do powstania nowotworu inwazyjnego. Różnica w podłożu molekularnym FAP i HNPCC sprawia, że pojedyncze guzy w HNPCC rozwijają się szybciej do formy inwazyjnej niż w przypadku FAP.

FENOTYP MUTACJI W GENIE APC

Rodzinna polipowatość jelita grubego (OMIM 175100)

Rodzinna polipowatość jelita grubego (FAP) występuje z częstością 1/7000 i stanowi ponad 1% nowotworów jelita grubego. Jest chorobą dziedziczną w sposób autosomalny dominujący. W około 60 do 85% przypadków FAP wykrywane są mutacje w genie *APC* [63]. Objawy w postaci licznych (setki lub tysiące) polipów w śluzówce jelita grubego pojawiają się pod koniec drugiej dekady życia. Polipy charakteryzują się znacznym potencjałem do rozwoju w kierunku nowotworu złośliwego. Transformacja polipów o charakterze gruczolaków w nowotwór złośliwy występuje średnio w wieku 40 lat, ale może wystąpić w okresie od późnego dzieciństwa do wieku 70 lat. Pierwszymi objawami wystąpienia polipów są biegunki i krew w stolcu. W miarę progresji procesu nowotworowego u chorych występuje spadek masy ciała i ogólne osłabienie. Najwcześniejsze wystąpienie objawów polipowatości zaobserwowano w wieku 5 lat. Wraz z objawami w jelicie grubym obserwuje się występowanie jednego lub kilku objawów pozajelitowych [29], do których zalicza się: zmiany w wyższych odcinkach przewodu pokarmowego, zmiany w siatkówce oka, nowotwory poza jelitem grubym, zmiany skórne, zmiany w kośćcu.

W wyższych odcinkach przewodu pokarmowego najczęściej występują gruczolaki żołądka, gruczolaki dwunastnicy, hipertroficzne polipy dna żołądka. Gruczolaki żołądka występują częściej niż gruczolaki dwunastnicy. Poza tym obserwuje się występowanie wątrobiaków [29], nowotworów tarczycy (wśród pacjentów z tym nowotworem dominują kobiety 94%) [5] oraz nowotwory nadnerczy [39]. Kolejnym typem nowotworu występującego w FAP jest włókniakowatość naciekowa (ang. *desmoid tumors*), jej pojawienie następuje częściej po zabiegu chirurgicznym. U pacjentów z FAP obserwuje się wzrost częstości występowania włókniakowatości naciekowej w stosunku do populacji ogólnej. Obserwuje się także modyfikujący efekt płci. Choroba ta występuje rzadziej u mężczyzn z FAP (8%) niż u kobiet (13%) [27]. Przebadano związek lokalizacji mutacji skracającej produkt białka *APC* a występowaniem włókniakowatości naciekowej. Występowanie włókniakowatości naciekowej odnotowano u wszystkich pacjentów z FAP, u których mutacja wystąpiła między kodonami 1445 a 1578 [6].

Zespół Gardnera (OMIM 175100.0006), traktowany jest jako forma rodzinnej polipowatości jelita z licznymi objawami pozajelitowymi w formie torbieli gruczołów łojowych skóry, kostniaków i włókniakowatości naciekowej, a ponadto obserwuje się zmiany w uzębieniu polegające na zmianach ilości zębów oraz długie i zaostrome korzenie zębów [3].

Przebarwienie barwnikowe siatkówki dna oka CHRPE, (ang. *congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium*) wiązane jest z położeniem mutacji w genie APC [6, 65]. Przebarwienie siatkówki nie występuje, jeżeli produkt zmutowanego genu jest mniejszy niż 50 kD, a ekson 9 uważany jest za graniczny między mutacjami nie powodującymi i powodującymi przebarwienie. W regionie 3' genu APC granicą występowania przebarwienia jest kodon 1387 [7]. Długość produktu ma wpływ na obraz przebarwienia. Produkty białkowe genu o długości poniżej 1014 aminokwasów przedstawiają obraz małego okrągłego przebarwienia (ang. *small round pigmented*) lub dużego okrągłego przebarwienia (ang. *large round pigmented*). Produkty białkowe powyżej 1014 aminokwasów powodują wzrost występowania pozostałych dwóch typów zmian w siatkówce dna oka, tj. owalnego przebarwienia okrażonego aureolą (ang. *oval pigmented with a surrounding halo*) i dużego okrągłego odbarwienia (ang. *large round de-pigmented*) [64]. Kodon 1014 jest miejscem wiązania dwóch białek cytoplazmatycznych α - i β -kateniny, są one istotne dla białka czynnego w adhezji komórek E-kadheryny. Produkty dłuższe od 1014 aminokwasów mogą wiązać się z tymi białkami, co może wpływać na zmianę fenotypu przebarwienia [65]. Przebarwienie barwnikowe siatkówki było stosowane jako marker nosicielstwa zmutowanego allelu, ale rozwój technik biologii molekularnej, jak i występowanie tylko u części rodzin ograniczyły jego znaczenie.

Łagodna forma rodzinnej polipowatości jelita grubego

Łagodna forma rodzinnej polipowatości jelita grubego AAPC (ang. *attenuated adenomatous polyposis coli*) charakteryzuje się występowaniem małej liczby polipów od kilku do stu. Z objawów pozajelitowych rzadko obserwuje się występowanie polipów dna żołądka [55]. Występowanie tej formy rodzinnej polipowatości jelita związane jest z występowaniem mutacji na końcu 5' genu APC. Przyjmuje się, że kodon 159 jest granicą między mutacjami powodującymi AAPC i FAP, jednak ustalenie jednoznacznej granicy nie wydaje się uzasadnione, ponieważ ta forma choroby wystąpiła również w przypadkach, gdy mutacja prowadziła do powstania kodonu Stop w eksonie 9 genu APC [26, 52, 57].

Zespół Turcota (OMIM 276300)

Zespół Turcota jest również predyspozycją do występowania nowotworów w śluzówce jelita, a także objawów pozajelitowych, takich jak: nowotwory wyższych odcinków przewodu pokarmowego, kostniaków, wątrobiaków oraz guzów neuroe-

ktodermalnych. Można przyjąć, że jest to współwystępowanie nowotworów układu pokarmowego i nowotworów złośliwych centralnego układu nerwowego [66]. W 1991 roku wyróżniono dwie formy choroby, dziedziczną autosomalnie dominującą formę występowania rdzeniaka (meduloblastoma) w młodym wieku i objawów jelitowych FAP, oraz formę dziedziczną autosomalnie recesywnie z występowaniem glejaka wielopostaciowego (glioblastoma) u starszych pacjentów z objawami HNPCC w jelicie grubym [33]. W zespole Turcota zaobserwowano, że u chorych z mutacją w genie *APC* w 79% wystąpił rdzeniak, a u chorych z objawami jelitowymi wskazującymi na mutacje w genach naprawy DNA – glejak [15]. Mutacje zidentyfikowane w genie *APC* wykazują heterogeny charakter. Nie wyodrębniono regionu w genie *APC* związanego z występowaniem jednej z form zespołu Turcota.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA I PROFILAKTYKA FAP

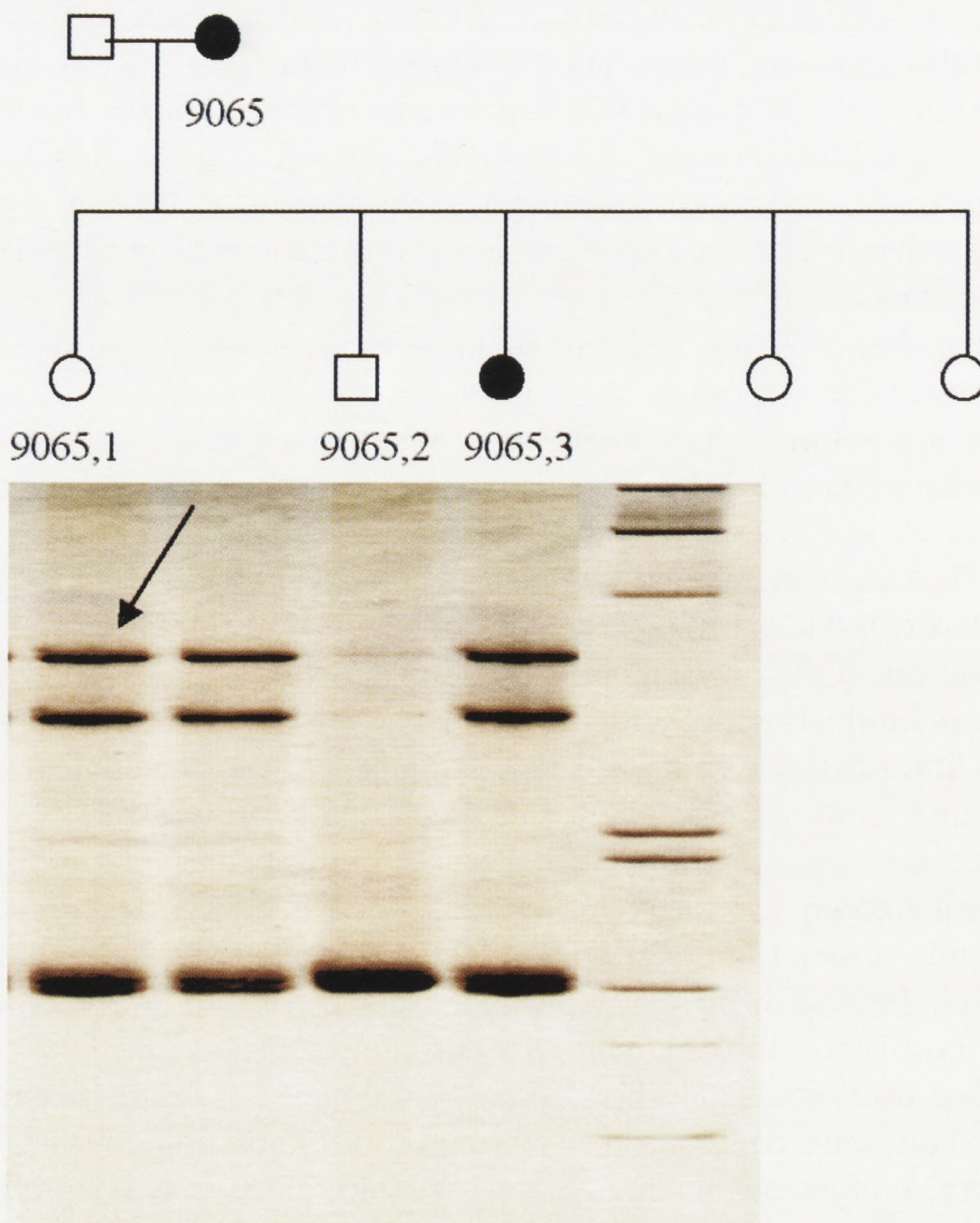
Podatność na wystąpienie nowotworu złośliwego u osób ze zmutowanym genem supresorowym powoduje konieczność przedobjawowego rozpoznania nosicieli mutacji. Jest to bardzo ważne dla profilaktyki stosowanej u osób obciążonych wysokim ryzykiem wystąpienia choroby nowotworowej, jak również daje możliwość uniknięcia nieuzasadnionego stresu u osób nie obciążonych. Materiałem do badań jest DNA wyizolowany z komórek krwi obwodowej. W przypadku genów, w których występują miejsca podatne na wystąpienie mutacji (ang. *hot spots*), można prowadzić analizę bezpośrednią, ale w przypadku dużych genów, gdzie mutacje mają charakter heterogeny, wykonuje się wstępne badanie przesiewowe dla poszczególnych eksonów lub fragmentów genu, w celu znalezienia regionu zawierającego mutacje. Następnie taki fragment poddaje się analizie bezpośredniej celem określenia charakteru zmiany w materiale genetycznym [49]. We wstępnych badaniach przesiewowych wykorzystuje się metody oparte na wykrywaniu zmian w migracji fragmentów DNA w żelu poliakryloamidowym, powodowanych przez zmiany sekwencji. Podstawową techniką jest powielenie badanego fragmentu metodą PCR, a następnie produkty takie poddawane są denaturacji dla uzyskania jednoniciowych fragmentów do analizy SSCP (ang. *Single strand polymorphism conformation*) lub heterodupleksów nici zmutowanej i nie zmutowanej w analizie HD. W analizie heterodupleksów występują modyfikacje metody przez stosowanie czynników denaturujących podczas rozdziału i dołączanie do starterów sekwencji GC (ang. *GC-clamp*) w metodzie rozdziału w gradiencie czynnika denaturującego w żelu poliakryloamidowym (PCR-DGGE) [63]. Kolejną metodą wstępnego poszukiwania mutacji jest test przedwczesnej terminacji translacji PTT (ang. *protein truncation test*). Test polega na transkrypcji i translacji *in vitro*, przez co można wykryć mutacje prowadzące do skrócenia produktu genu. Gen *APC* zawiera jeden duży ekson,

jest to bardzo korzystny układ pozwalający na wykonanie badania bez konieczności przeprowadzania reakcji odwrotnej transkrypcji na matrycy mRNA. Region, w którym wykryto mutacje, poddaje się sekwencjonowaniu metodą enzymatyczną dla określenia charakteru zmiany. Po wykryciu mutacji w genie *APC* przeprowadza się analizę dziedziczenia zmutowanego allelu genu *APC* u osób z grupy ryzyka w badanej rodzinie. Przykład takiej analizy przedstawiono na podstawie badań własnych na rysunku 3.

W przypadku, gdy nie wykryto mutacji, można zastosować analizę typu pośredniego, badając współdziedziczenie markerów sprzężonych. W tym celu wykorzystuje się polimorfizmy fragmentów restrykcyjnych i wysoce polimorficzne loci, zawierające krótkie sekwencje powtórzone. Badanie polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych jest metodą prostą w wykonaniu, jednak w takich przypadkach występują tylko trzy warianty, a dwa z nich są homozygotyczne, więc informatywność tych markerów jest niska. Wysoce polimorficzne loci zawierające krótkie sekwencje powtórzone np. $(CA)_n$ występują często w genomie i zawierają od kilku do kilkudziesięciu krótkich sekwencji powtórzonych. Wysoki polimorfizm tych loci czyni je bardzo informatywnym narzędziem w analizie typu pośredniego. Do badania dziedziczenia zmutowanego allelu stosuje się markery położone blisko badanego genu. Wskazane jest stosowanie kilku markerów flankujących gen dla uniknięcia błędu wynikającego z wystąpienia crossing-over między markerem a genem.

Określenie nosicieli mutacji wiąże się z zastosowaniem dla nich odpowiedniej profilaktyki. Prowadzi się także badania mające na celu wywołanie opóźnienia wystąpienia objawów lub całkowitego wyeliminowania ryzyka ich wystąpienia. Obecnie, wobec osób obciążonych ryzykiem wystąpienia choroby stosuje się sigmoskopię, wykonywaną co 12 miesięcy począwszy od okresu dojrzewania [42]. Pozwala to na wykrycie objawów na długo przed rozwinięciem się nowotworu inwazyjnego. Po pojawieniu się polipów jedynym sposobem uniknięcia wystąpienia nowotworu inwazyjnego jest operacyjne usunięcie całego jelita grubego.

W zabiegu operacyjnym usuwa się całe jelito grube wytwarzając z jelita cienkiego zbiornik J (ang. *J pouch*). Obserwuje się duże przystosowanie śluzówki jelita cienkiego tak, że morfologicznie upodabnia się ona do śluzówki jelita grubego. Zabieg chirurgiczny, będący obecnie jedyną możliwością przedłużenia życia osób chorych, mimo skuteczności, powoduje poważne okaleczenie, zwłaszcza przy zaawansowanym rozwoju choroby, gdy usuwa się odbyt. Wobec tego bardzo duże nadzieje wiąże się z badaniem wpływu składu pożywienia i nie sterydowych leków przeciwzapalnych wpływających na obniżenie liczby występowania polipów. Badając zawartość skrobi w żywności i zachorowania na nowotwory jelita grubego stwierdzono odwrotną korelację między ilością skrobi w diecie a częstością występowania nowotworu jelita grubego. Badania prowadzi się na modelach zwierzęcych. Opracowano kilka modeli mysich, do których należą myszy *APC⁷¹⁶* [45]. Myszy te są heterozygotami mutacji w genie *APC* w kodonie 716, co daje klasyczny obraz



RYSUNEK 3. Analiza dziedziczenia delecji AGAAA w kodonie 1309 genu *APC* – analizę HD przeprowadzono w 10% natywnym żelu poliakryloamidowym, po rozdzieleniu DNA barwiono srebrem. Konformery związane z występowaniem delecji AGAAA w kodonie 1309 oznaczono strzałką. Mutacja występuje u chorej 9065. W grupie ryzyka mutacja występuje u dwóch osób 9065,1 i 9065,3

polipów występujących od 3 tygodnia życia. Homozygoty mutacji są prenatalnie letalne. Podawanie pokarmu o wysokiej zawartości skrobi i niskiej zawartości tłuszczu nie wpłynęło na częstość wystąpienia choroby, lecz zmniejszyło o 64% liczebność polipów, a także rozmiar polipów u osobników chorych. Obniżenie liczebności wystąpienia polipów powodowane jest także przez nie sterydowe leki przeciwzapalne. W badaniach stosuje się aspirynę, Pirixicam i Sulindac, które powodują obniżenie liczebności polipów w jelicie grubym u myszy ze znokautowanym genem *APC* od 40 do 60% [8, 23].

Zaobserwowano również, że efekt obniżenia liczby polipów w jelicie związany jest z inhibicją cyklooksygenazy (*COX2*) [8]. Uszkodzenie obydwu alleli genu *COX2* powoduje spadek liczby polipów u myszy *APC*⁷¹⁶, podobny efekt uzyskano stosując u tych myszy inhibitor cyklooksygenazy. Badania te otwierają szerokie możliwości chemoprewencji w chorobach nowotworowych jelita grubego [45].

Podejmowane są również próby zastosowania terapii genowej w leczeniu FAP. Warunkowanie choroby mutacją w jednym genie znacznie ułatwia podjęcie prób naprawy błędu. Do linii komórek śluzówki jelita grubego SW480 ze zmutowanym genem *APC* wprowadzono cały funkcjonalny gen *APC* z zastosowaniem liposomów jako wektora. Liposomy ulegają fuzji z błoną cytoplazmatyczną i przenoszony materiał wprowadzany jest do komórki. Wydajność tego systemu jest niska i gen nie ulega integracji z genomem komórki docelowej, jednak liposomy są dużo bezpieczniejsze od wektorów retrowirusowych. Transfer genu *APC* pozwolił uzyskać ekspresję prawidłowego genu *APC* w komórkach SW480 po 72 godzinach i obserwowana była ona przez okres tygodnia na poziomie zapewniającym biologiczny efekt. Choroby nowotworowe jelita grubego są dobrze poznane, konieczne jest jednak poznanie wszystkich czynników wpływających na inicjację i rozwój nowotworu oraz interakcje między nimi. Badanie mutacji występujących w czasie rozwoju choroby nowotworowej pozwoli na wybranie najskuteczniejszego sposobu profilaktyki lub minimalizowania skutków choroby. Mimo skutecznego stosowania chemoprewencji i immunoterapii [8, 62], największe nadzieje wiąże się ze stosowaniem terapii genowej. W tym przypadku, aby całkowicie wyeliminować przyczynę choroby, należałoby przeprowadzić korektę genu w większości komórek organizmu (dla uniknięcia licznych objawów pozajelitowych). Mimo poznania mutacji powodującej chorobę, dla tak masowej korekcji znanego błędu musi dokonać się przełom w technologii transferu genów.

LITERATURA

- [1] AHMED Y, HAYASHI S, LEVINE A, WIESCHAUS E. Regulation of armadillo by a *Drosophila* APC inhibits neuronal apoptosis during retinal development. *Cell* 1989; **3**: 1171–1182.
- [2] BEROUD C, SOUSSI T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1996; **24**: 121–124.
- [3] BISHOP T, HAAL N. The genetic of colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; **49**: 4682–4689.
- [4] BOLAND C, R, SATO J, APPELMAN HD, BRESALIER RS, FEINBERG AP. Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. *Nature Med* 1995; **1**: 902–909.
- [5] CAMIEL MR, MULE JE, ALEXANDER LL, BENNINGHOFF DL. Association of thyroid carcinoma with Gardner's syndrome in siblings. *New Eng J Med* 1968; **278**: 1056–1058.
- [6] CASPARI R, FRIEDL W, MANDL M, MOSLEIN G, KADMON M, KNAPP M, JACOBASCH KH, ECKER KW, KREISSLER-HAAG D, TIMMERMANNNS G. Familial adenoma-

- tous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer. *Lancet* 1994; **12**: 629–632.
- [7] CASPARI R, OLSCHWANG S, FRIEDL W, MANDL M, BOISSON C, BOKER T, AUGUSTIN A, KADMON M, MOSLEIN G, THOMAS G, PROPPING P. Familial adenomatous polyposis: desmoid tumors and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. *Hum Molec Genet* 1995; **4**: 337–340.
- [8] CHIU CH, MCENTEE MF, WHELAN J. Sulindac causes rapid regression of preexisting tumors in Min/+ mice independent of prostaglandin biosynthesis. *Cancer Res* 1997; **19**: 4267–4273.
- [9] COHEN C, PARRY D. α -helical coiled coils and bundles: how to design an α -helical protein. *Proteins* 1990; **7**: 1–15.
- [10] CURIA MC, ESPOSITO DL, ACETO G, PALMIROTTA R, CROGNALE S, VALANZANO R, FICARI F, TONELLI F, BATTISTA P, MARIANI-COSTANTINI R, CAMA A. Transcript dosage effect in familial adenomatous polyposis: model offered by two kindreds with exon 9 APC gene mutations. *Hum Mutat* 1998; **11**: 197–201.
- [11] DANES BS, GARDNER EJ. The Gardner syndrome: a cell culture study of kindred 109. *J Med Genet* 1978; **15**: 346–551.
- [12] DAVIES DR, ARMSTRONG JG, THAKKER N, HORNER K, GUY SP, CLANCY T, SLOANP, BLAIR V, DODD C, WARNES TW, HARRIS R, EVANS DG. Severe Gardner syndrome in families with mutations restricted to a specific region of the APC gene. *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 1151–1158.
- [13] DE VRIES EM, RICKE DO, DE VRIES TN, HARTMANN A, BLASZYK H, LIAO D, SOUSSI T, KOVACH JS, SOMMER SS. Database of mutations in the p53 and APC tumor suppressor genes designed to facilitate molecular epidemiological analyses. *Hum Mutat* 1996; **7**: 202–213.
- [14] FEARON E. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997; **278**: 1043–1050.
- [15] FEARON E, VOGELSTEIN BA. Genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; **61**: 759–767.
- [16] GARDNER EJ. A genetic and clinical study of intestinal polyposis, a predisposing factor for carcinoma of the colon and rectum. *Am J Hum Genet* 1951; **3**: 167–176.
- [17] GARDNER EJ. Discovery of the Gardner syndrome. *Birth Defects Orig Art Ser* 1972; **2**: 48–51.
- [18] GRODEN J, THLIVERIS A, SAMOWITZ W, CARLSON M, GELBERT L, ALBERTSEN H, JOSLYN G, STEVENS J, SPIRIO L, ROBERTSON M, SARGEANT L, KRAPCHO K, WOLFF E, BURT R, HUGHES JP, WARRINGTON J, MCPHERSON J, WASMUTH J, LE PASLIER D, ABDERRAHIM H, COHEN D, LEPPERT M, WHITE R. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; **66**: 589–600.
- [19] HAMILTON SR, LIU B, PARSONS RE, PAPADOPOULOS N, JEN J, POWELL SM, KRUSH AJ, HARGEST R, WILLIAMSON R. Expression of the APC gene after transfection into a colonic cancer cell line. *Gut* 1995; **37**: 826–829.
- [20] HE TC, SPARKS AB, RAGO C, HERMEKING H, ZAWEL L, DA COSTA LT, MORIN PJ, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; **28**: 11509–11512.
- [21] HERRERA L, KAKATI S, GIBAS L, PIETRZAK E, SANDBERG AA. Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 1986; **25**: 473–476.
- [22] HORII A, NAKATSURU S, ICHII S, NAGASE H, NAKAMURA Y. Multiple forms of the APC gene transcripts and their tissue-specific expression. *Hum Molec Genet* 1993; **2**: 283–287.
- [23] JACOBY RF, MARSHALL DJ, NEWTON MA, NOVAKOVIC K, TUTSCH K, COLE CE, LUBET RA, KELLOFF GJ, JAGELMAN DG, DECOSSE JJ, BUSSEY HJR, THE LEEDS

- CASTLE POLYPOSIS GROUP. Upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. *Lancet* 1988; **1**: 1149–1151.
- [24] JOSLYN G., RICHARDSON DS, WHITE R, ALBER T. Dimer formation by an N-terminal coiled coil in the APC protein. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1993; **90**: 11109–11113.
- [25] KINZLER KW, NILBERT MC, SU LK, VOGELSTEIN B, BRYAN TM, LEVY DB, SMITH KJ, PREISINGER AC, HEDGE P, MCKECHNIE D, FINNIEAR R, MARKHAM A, GROFFEN J, BOGUSKIS, ALTSCHUL SF, HORII A, ANDO H, MIYOSHI Y, MIKI Y, NISHISHO I, NAKAMURA Y. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; **253**: 661–665.
- [26] KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Lessons from hereditary Colorectal Cancer. *Cell* 1996; **87**: 159–170.
- [27] KLEMMER S, PASCOE L, DECOSSE J. Occurrence of desmoids in patients with familial adenomatous polyposis of the colon. *Am J Med Genet* 1987; **28**: 385–392.
- [28] KOBAYASHI T, NARAHARA K, YOKOYAMA Y, UEYAMA S, MOHRI O, FUJII T, FUJIMOTO M, OHTSUKI S, TSUJI K, SEINO Y. Gardner syndrome in a boy with interstitial deletion of the long arm of chromosome 5. *Am J Med Genet* 1991; **41**: 460–463.
- [29] KRUSH AJ, TRABOULSIEI, OFFERHAUS GJA, MAUMENEE IH, YARDLEY JH, LEVIN LS. Hepatoblastoma, pigmented ocular fundus lesions and jaw lesions in Gardner syndrome. *Am J Med Genet* 1988; **29**: 323–332.
- [30] LAMBERTZ S, BALLHAUSEN WG. Identification of an alternative 5-prime untranslated region of the adenomatous polyposis coli gene. *Hum Genet* 1993; **90**: 650–652.
- [31] LEE TC, LIL, PHILIPSON L, ZIFF EB. Myc represses transcription of the growth arrest gene *gas1*. *Proc Nat Acad Sci* 1997; **94**: 12886–12891.
- [32] MANDL M, PAFFENHOLZ R, FRIEDL W, CASPARI R, SENGTELLER M, PROPPING P. Frequency of common and novel inactivating APC mutations in 202 families with familial adenomatous polyposis. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 181–184.
- [33] MASTRONARDI L, FERRANTE L, LUNARDI P, CERVONI L, FORTUNA A. Association between neuroepithelial tumor and multiple intestinal polyposis (Turcot's syndrome): report of a case and critical analysis of the literature. *Neurosurgery* 1991; **28**: 449–452.
- [34] MATSUMINE A, OGAI A, SENDA T, OKUMURA N, SATOH K, BAEG GH, KAWAHARA T, KOBAYASHI S, OKADA M, TOYOSHIMA K, AKIYAMA T. Binding of APC to the human homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Science* 1996; **272**: 1020–1023.
- [35] MIYOSHI Y, NAGASE H, ANDO H, HORII A, ICHII S, NAKATSURU S, AOKI T, MIKI Y, MORI T, NAKAMURA Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Molec Genet* 1992; **1**: 229–233.
- [36] MORIN PJ, SPARKS AB, KORINEK V, BARKER, N, CLEVERS H, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* Mar 21: 1997; **275**: 1787–1790.
- [37] MUNEMITSU S, SOUZA B, MULLER O, ALBERT I, FELD B, POLAKIS P. The APC gene product associates with microtubules *in vivo* and promotes their assembly *in vitro*. *Cancer Res* 1994; **15**: 3676–3681.
- [38] NAGASE H, NAKAMURA Y. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat* 1993; **2**: 425–434.
- [39] NAYLOR EW, GARDNER EJ. Adrenal adenomas in a patient with Gardner's syndrome. *Clin Genet* 1981; **20**: 67–73.
- [40] NEUFELD KL, WHITE RL. Nuclear and cytoplasmic localizations of the adenomatous polyposis coli protein. *Proc Nat Acad Sci* 1997; **94**: 3034–3039.
- [41] NISHISHO I, NAKAMURA Y, MIYOSHI Y, MIKI Y, ANDO H, HORII A, KOYAMA K, UTSUNOMIYA J, BABA S, HEDGE P, MARKHAM A, KRUSH AJ, PETERSEN G, HAMILTON SR, NILBERT MC, LEVY DB, BRYAN TM, PREISINGER AC, SMITH KJ, SU

- LK, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; **253**: 665–669.
- [42] NOWACKI M, WRONKOWSKI Z, CHWALIŃSKI M. Badanie przesiewowe oraz badania u osób obciążonych przeciętnym i zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka jelita grubego. *Medycyna praktyczna* 1998; **4**: 119–131.
- [43] OGASAWARA S, TAMURA G, MAESAWA C, SUZUKI Y, ISHIDA K, SATOH N, UESUGIN, SAITO K, SATODATE R. Common deleted region on the long arm of chromosome 5 in esophageal carcinoma. *Gastroenterology* 1996; **1**: 52–57.
- [44] OKAMOTO M, SATO C, KOHNO Y, MORI T, IWAMA T, TONOMURA A, MIKI Y, UTSUNOMIYA J, NAKAMURA Y, WHITE R, MIYAKI M. Molecular nature of chromosome 5q loss in colorectal tumors and desmoids from patients with familial adenomatous polyposis. *Hum Genet* 1990; **85**: 595–599.
- [45] OSHIMA M, DINCHUK JE, KARGMAN SL, OSHIMA H, HANCOCK B, KWONG E, TRZASKOS JM, EVANS JF, TAKETO MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996; **29**: 803–809.
- [46] PEIFER M. Cancer, catenins, and cuticle pattern: a complex connection. *Science* 1993; **262**: 1667–1668.
- [47] PERSSON H, LEDER P. Nuclear localization and DNA binding properties of a protein expressed by human c-myc oncogene. *Science* 1984; **225**: 718–721.
- [48] PIERCE ER, WEISBORD T, MCKUSICK VA. Gardner's syndrome: formal genetics and statistical analysis of a large Canadian kindred. *Clin Genet* 1970; **1**: 65–80.
- [49] PŁAWSKI A, SŁOMSKI R. Geny supresorowe nowotworów. *Post Biol Kom* 1998; **25** (sup.10):251–264.
- [50] ROOSE J, HUIS G, VAN BEEST M, MOERER P, VANDER HORN K, GOLDSCHMEDING R, LOGTENBERG T, CLEVERS H. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* 1999; **285**: 1923–1926.
- [51] RUBINFELD B, SOUZA B, ALBERT I, MULLER O, CHAMBERLAIN S., H, MASIARZ FR, MUNEMITSU S, POLAKIS P. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 1993; **262**: 1731–1734.
- [52] SAMOWITZ WS, THLIVERIS A, SPIRIOLN, WHITE R. Alternatively spliced adenomatous polyposis coli (APC) gene transcripts that delete exons mutated in attenuated APC. *Cancer Res* 1995; **17**: 3732–3734.
- [53] SANTORO IM, GRODEN J. Alternative splicing of the APC gene and its association with terminal differentiation. *Cancer Res* 1997; **57**: 488–494.
- [54] SANZ-ORTEGA J, SANZ-ESPONERA J, CALDES T, GOMEZ DE LA CONCHA E, SOBEL ME, MERINO MJ. LOH at the APC/MCC gene (5Q21) in gastric cancer and preneoplastic lesions. Prognostic implications. *Pathol Res Pract* 1996; **192**: 1206–1210.
- [55] SORAVIA C, BERK T, MADLENSKY L, MITRI A, CHENG H, GALLINGER S, COHEN Z, BAPAT B. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet* 1998; **62**: 1290–1301.
- [56] SPARKS AB, MORIN PJ, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; **6**: 1130–1134.
- [57] SPIRIO L, OLSCHWANG S, GRODEN J, ROBERTSON M, SAMOWITZ W, JOSLYN G, GELBERTL, THLIVERIS A, CARLSON M, OTTERUD B, LYNCH H, WATSON P, LYNCH P, LAURENT-PUIG P, BURTR, HUGHES JP, THOMAS G, LEPPERT M, WHITE R. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993; **75**: 951–957.
- [58] SU LK, BURRELL M, HILL DE, GYURIS J, BRENT R, WILTSHIRE R, TRENT J, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res* Jul 1995; **15**: 2972–2977.
- [59] SU LK, VOGELSTEIN B, KINZLER KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 1993; **262**: 1734–1737.

- [60] SULEKOVA Z, REINA-SANCHEZ J, BALLHAUSEN WG. Multiple APC messenger RNA isoforms encoding exon 15 short open reading frames are expressed in the context of a novel exon 10A-derived sequence. *Int J Cancer* 1995, **63**: 435–441.
- [61] TAUB R, KIRSCH I, MORTON C, LENOIR G, SWAN D, TRONICK S, AARONSON S, LEDER P. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Nat Acad Sci* 1982; **79**: 7837–7841.
- [62] THOMPSON JA, EADES-PERNER AM, DITTER M, MULLER WJ, ZIMMERMANN W. Expression of transgenic carcinoembryonic antigen (CEA) in tumor-prone mice: an animal model for CEA-directed tumor immunotherapy. *Int J Cancer* 1997; **3**: 197–202.
- [63] VANDER LUIJT RB, KHAN PM, VASEN HF, TOPS CM, VAN LEEUWEN-CORNELISSE IS, WIJNEN JT, VAN DER KLIFT HM, PLUG RJ, GRIFFIOEN G, FODDE R. Molecular analysis of the APC gene in 105 Dutch kindreds with familial adenomatous polyposis: 67 germline mutations identified by DGGE, PTT, and southern analysis. *Hum Mutat* 1997; **1**: 7–16.
- [64] WALLIS YL, MACDONALD F, HULTEN M, MORTON JE, MCKEOWN CM, NEOPTOLEMOS JP, KEIGHLEY M, MORTON DG. Genotype-phenotype correlation between position of constitutional APC gene mutation and CHRPE expression in familial adenomatous polyposis. *Hum Genet* 1994; **5**: 543–548.
- [65] WESTBROOK CA, CHMURA SJ, ARENAS RB, KIM SY, OTTO G. Human APC gene expression in rodent colonic epithelium *in vivo* using liposomal gene delivery. *Hum Mol Genet* 1994; **11**: 2005–2010.
- [66] YAFFEE HS. Gastric polyposis and soft tissue tumors: a variant of Gardner's syndrome. *Arch Derm* 1964; **89**.
- [67] ZATOŃSKI WA. Nowotwory złośliwe w Polsce. *Wiedza i Życie* 1993.

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

BUDOWA I FUNKCJE BIAŁKA ATM*

STRUCTURE AND FUNCTION OF PROTEIN ATM

Maria RYBCZYŃSKA*, Andrzej L. PAWLAK**

*Zakład Chemii Klinicznej, Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego; **Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Streszczenie: Białko ATM, poznane po identyfikacji genu *ATM* w drodze klonowania pozycyjnego, jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 350,6 kD i aktywności kinazy białkowej. Substratami aktywności kinazowej ATM są białka p53, cAbl, p34 i Chk1. Fosforylacja p53, poprzez zahamowanie jego wiązania z onkogenem MDM2, zapobiega degradacji tego białka. W komórkach eksponowanych na promieniowanie jonizujące białko ATM zwiększa wiązanie p53 z DNA i transaktywację genów. Motyw kinazy białkowej mieści się w końcu karboksylowym białka ATM i wykazuje homologię z rodziną kinaz fosfatydyloinozytolu-3. W części środkowej białka ATM mieści się motyw „zamka leucynowego” (leu ZIP). Homologiczne motywy leu ZIP zaobserwowano w kinazach DNA-PK i ATR/FRB. Białko ATM pełni kluczową rolę w odpowiedzi komórki na promieniowanie jonizujące rozpoznając złamania podwójnej nici DNA, jak również rolę kontrolną w cyklu komórkowym.

Słowa kluczowe: białko ATM, gen *ATM*, kinaza PI-3, p53, fosforylacja p53, DNA-PK, MDM2, promieniowanie jonizujące

Summary: Protein ATM was identified after the positional cloning search and discovery of the *ATM* gene. It is a 350,6 kD glycoprotein displaying the activity of protein kinase. The substrates of this activity are: p53, cAbl, p34 and Chk1. Phosphorylation of p53 inhibits binding of this protein to the oncogene MDM2, preventing the degradation of p53. In cells exposed to ionizing radiation the ATM protein enhances p53 DNA binding with the resultant transactivation of the genes. The protein kinase domain of ATM is found within the carboxyl end of the protein and displays homology to a family of phosphoinositol-3 kinases. In the central portion of the ATM protein the leu ZIP domain is found, which shows homology to leuZIP domains in DNA-PK and ATR/FRB. The ATM protein plays a key role in cells response to ionizing radiation by sensing the double strand breaks of DNA as well as in the control function in relation to the cell cycle.

*Praca częściowo finansowana z projektu badawczego Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu nr 501-3-02-01. Autorzy dziękują mgr Ewie Zmitrewicz za jej wkład w przygotowanie rysunków.

Key words: ATM protein, *ATM* gene, PI-3-kinase, p53, p53 phosphorylation, DNA-PK, MDM2, ionizing radiation.

GEN *ATM* I IDENTYFIKACJA JEGO PRODUKTU

Ataxia telangiectasia (AT) jest autosomalną recesywną chorobą wieloukładową charakteryzującą się degeneracją neuronów mózdkowych, zakłóceniem równowagi (ataxia) i rozszerzeniami drobnych naczyń krwionośnych na białkówkach gałek ocznych. AT objawia się również upośledzeniem odporności komórkowej i humoralnej, hipogonadyzmem i cukrzycą o atypowym przebiegu. Chorzy z AT wykazują podwyższoną zachorowalność na nowotwory, a w szczególności na chłoniaki i białaczki, które występują w 10–15% przypadków przed 15 rokiem życia. Komórki chorych z AT [6], a także ich rodziców jako nosicieli patogenicznej mutacji [30] wykazują zwiększoną częstość aberacji chromosomowych, która wzrasta po ekspozycji na promieniowanie jonizujące, co wiąże się z zaburzeniami faz G_1 i G_2 cyklu komórkowego.

Gen, *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*), który ulega mutacji w zespole *ataxia telangiectasia* (AT), został zmapowany w roku 1988 w chromosomie 11p23 [11], a poznany wstępnie i nazwany genem *ATM*, w roku 1995 [38]. Białko ATM jest badane dopiero od roku 1995, tj. od czasu opisanego sekwencji części genu, ponieważ ta informacja stała się podstawą określenia struktury pierwszorzędowej fragmentów białka ATM kodowanych przez poznane domeny genu *ATM*.

Ten sposób poznawania nowych białek datuje się od opisanego w roku 1986 genu przewlekłej choroby ziarniniakowatej [32], a następnie genu mukowiscydozy [18, 31], w obu przypadkach poznanie budowy genu poprzedzało poznanie zmienionego genetycznie białka. Metoda zastosowana przez wymienionych badaczy do identyfikacji genu przed poznaniem genetycznie zmienionego białka determinującego zmienione funkcje zakłada wcześniejsze zmapowanie poszukiwanego genu. Autorzy określili ją jako klonowanie pozycyjne (*positional cloning*).

W okresie poprzedzającym opisane badania punktem wyjścia do poznania genu było z reguły poznanie funkcji, a przede wszystkim I-rzędowej struktury białek stanowiących jego produkt. Po dokonaniach wymienionych autorów obserwujemy rozkwit badań dążących do identyfikacji genu niezależnie od stanu wiedzy na temat białka determinującego genetycznie zmienione funkcje. Określeniem dobitniej podkreślającym przełom, jakim w genetyce było zastosowanie tego podejścia badawczego, jest opisywanie metody klonowania pozycyjnego jako odwróconej genetyki (poznawanie genu przed białkiem). Klonowanie na podstawie lokalizacji genu, opisane przez cytowanych autorów, zostało z powodzeniem zastosowane również do genu *ATM* [38, 39].

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA BIAŁKA ATM

Produktem genu *ATM* jest białko ATM o masie cząsteczkowej 350.6 kDa. Białko to jest glikoproteiną składającą się z 3056 aminokwasów i podlegającą fosforylacji. Jest ono wykrywane we wszystkich badanych tkankach, przy czym wysoki poziom ekspresji obserwowano w jądrach, śledzionie i grasicy [9].

Białko ATM zidentyfikowano przy użyciu przeciwciał monoklonalnych otrzymanych po immunizacji peptydami o sekwencji aminokwasów odpowiadającej wybranemu fragmentowi genu *ATM*. Jest ono zlokalizowane przede wszystkim w jądrze komórkowym, ale ostatnio wykazano jego obecność nie tylko w jądrowej, ale również w mikrosomalnej frakcji ludzkich komórek limfoblastycznych oraz limfocytów krwi obwodowej [6]. Badanie przy pomocy mikroskopu elektronowego z użyciem przeciwciał znakowanych złotem potwierdziło podaną przez Browna lokalizację białka ATM wykazując jego występowanie w pęcherzykach cytoplazmatycznych o średnicy od 60 do 230 nm [60].

Wykazano, że stężenie białka ATM i jego rozmieszczenie w komórce nie ulegają zmianom w różnych fazach cyklu komórkowego. Nie stwierdzono obecności białka ATM w limfocytach chorych z AT, u których mutacje prowadziły do przedwczesnego zakończenia syntezy tego białka [6].

Ekspozycja prawidłowych komórek człowieka na promieniowanie gamma lub leki o właściwościach radiomimetycznych, np. na neokarcinostatynę nie wpływała na poziom białka ATM pomimo obserwowanego w tych komórkach wzrostu stężenia białka p53. Natomiast komórki chorych z AT po napromienieniu nie wykazywały oczekiwanego wzrostu ilości i aktywności białka p53. Te obserwacje wskazują na znaczenie białka ATM dla prawidłowego przebiegu zależnych od p53 procesów regulacji cyklu komórkowego po zadziałaniu promieniowania jonizującego, a także naprawy uszkodzeń DNA powstałych w wyniku takiej ekspozycji [6].

Obecność białka ATM w pęcherzykach cytoplazmy można łączyć z funkcjami ATM odrębnymi od poznanych funkcji frakcji jądrowej tego białka. Jedną z możliwości jest uczestniczenie tej puli białka ATM w ukierunkowywaniu i przekazywaniu sygnałów w komórce. Funkcje białka ATM związane z oddziaływaniami z innymi białkami mogą być zmienione u chorych z AT i powodować objawy choroby nie związane z zaburzeniami naprawy uszkodzeń DNA. Białko ATM zlokalizowane poza jądrem komórkowym może także uczestniczyć w reakcji na reaktywne formy tlenu. Reakcja ta może polegać m.in. na odwracalnym hamowaniu defosforylacji poprzez oddziaływanie na równowagę utleniania i redukcji grup –SH w podobny sposób, jak to opisano w odniesieniu do defosforylacji tyrozyny onkogenu Erb i receptora PDGF [20]. Pozajądrowa funkcja białka ATM wiąże się też z organizacją cytoszkieletu w szczególności w przebiegu podziału komórki [40, 41].

Komórki o podwyższonej ekspresji fragmentów zmutowanego genu *ATM* obejmujących motyw „zamka leucynowego” wykazywały podwyższoną częstość asocjacji telomerowych oraz skrócenie telomerów [46]. U myszy z wyłączonym genem *atm* (*atm*^{-/-}) zaobserwowano zwiększoną częstość asocjacji telomerów w spermatocytach pierwszej generacji oraz zaburzone interakcje między telomerami a białkami strukturalnymi komórki. Zmiany te łączyły się z blokiem spermatogenezy na etapie profazy I [29]. W limfocytach heterozygot zespołu AT zaobserwowano zaburzenia tworzenia się wrzeciona kariokinetycznego oraz apoptozy *in vitro* [44, 49]. Z drugiej strony mutacje genu *ATM* wydają się nie wpływać na stan kondensacji chromosomów [15].

Białko ATM asocjuje *in vivo* z β adaptyną i β NAP – homologiem β adaptyny specyficznym dla komórek nerwowych. β adaptyna jest składnikiem kompleksu adaptora AP-2 uczestniczącego wraz z klatryną w endocytozie receptorów. Wskazuje to na udział białka ATM w wewnątrzkomórkowych procesach transportu białek w siateczce cytoplazmatycznej [22].

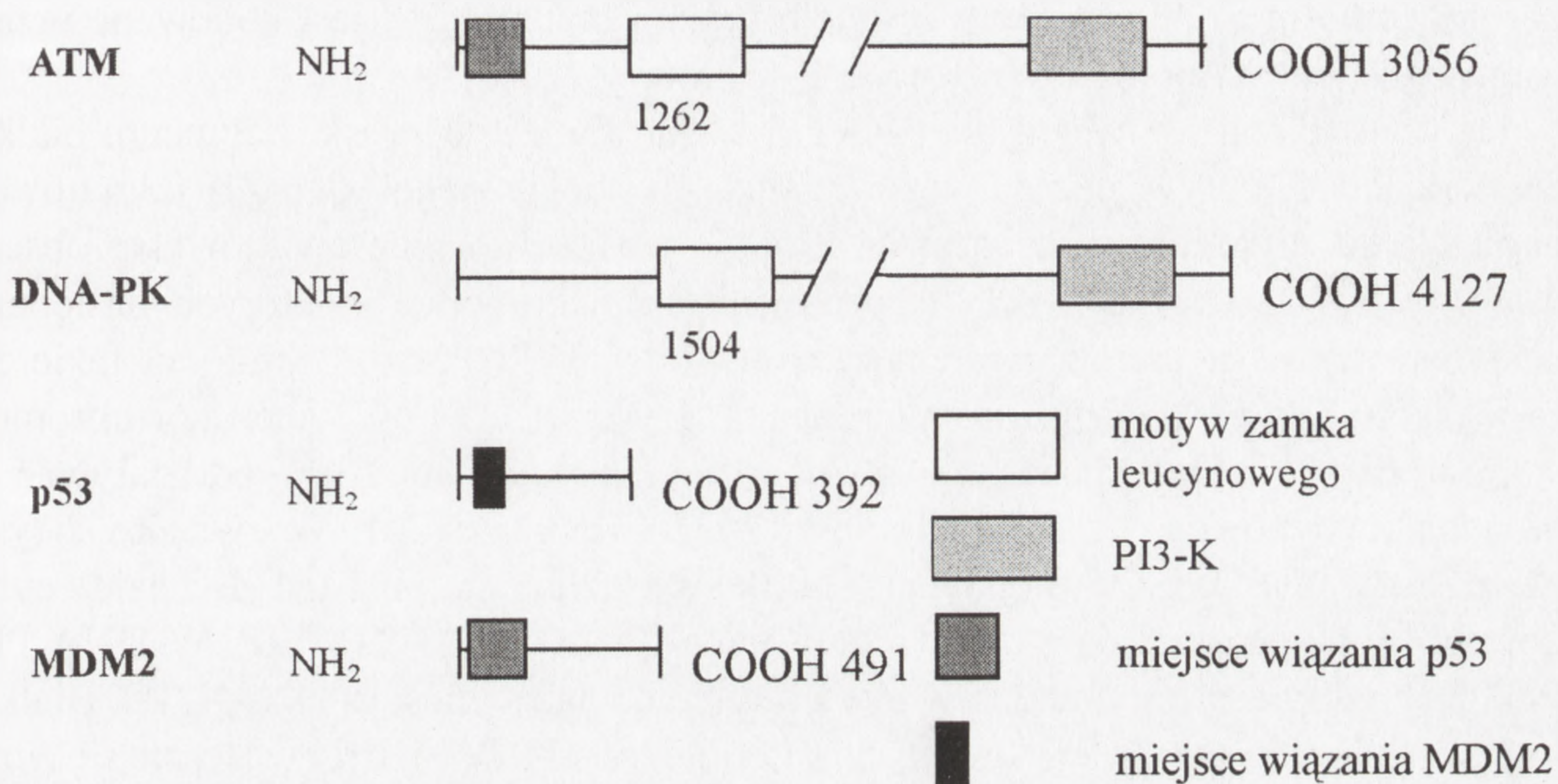
W krwinkach czerwonych u chorych i heterozygot zespołu *ataxia telangiectasia* zaobserwowano wzrost płynności błony komórkowej [33], co sugeruje, że pozajądrowa pula białka ATM może oddziaływać również na błonę komórkową.

RODZINA BIAŁEK ZAWIERAJĄCYCH SEKWENCJĘ PI-3-KINAZY

Produkt genu *ATM* należy do rodziny białek, które uczestniczą w kontroli cyklu komórkowego, rekombinacji i reperacji uszkodzeń DNA. Domena białka *ATM* zlokalizowana blisko jego końca karboksylowego jest homologiczna do sekwencji kinazy fosfotydylo-3-inozytolu (PI-3 kinazy). Sugeruje to udział białka *ATM* w fosforylacji lipidów i białek oraz w przekazywaniu sygnału z powierzchni komórki do jądra komórkowego [5].

Inne białka wykazujące homologię z PI-3-kinazą to zidentyfikowane u *Saccharomyces cerevisiae* białka TOR1 i TOR2 oraz opisane u ssaków ich odpowiedniki: mTOR. Wspólnym dla tych białek jest ich udział w kontroli fazy G1 / S cyklu komórkowego [34, 39]. Zazwyczaj białka należące do tej rodziny są niezbędne dla prawidłowej odpowiedzi na dwuniciowe złamanie nici DNA, a komórki wykazujące niedobory tych białek wykazują cechy fenotypu komórek AT.

W *Saccharomyces cerevisiae* najbliższym homologiem białka *ATM* pod względem struktury jest produkt genu *Tel1*. W białku tym domena PI3-kinazy jest w 45% identyczna z białkiem *ATM* [39]. Funkcjonalnymi homologami *ATM* u drożdży są dwa białka: *Tel1* i *Mec1*. Delecja genu *Tel1* powoduje skracanie telomerów [13, 26]. Mutacja *Mec1* prowadzi do zaburzeń replikacji DNA, reperacji uszkodzeń



RYSUNEK 1. Domeny funkcjonalne białek ATM, DNA-PK, p53 i MDM2 biorące udział we wzajemnych oddziaływaniach. cyframi oznaczono liczbę aminokwasów, w przypadku zamka leucynowego – pozycję pierwszego aminokwasu w domenie

DNA w mejozie i aktywacji transkrypcji genów po uszkodzeniach DNA [17, 62]. Funkcje białek Tel1 i Mec1 są powiązane w ten sposób, że dodatkowa kopia genu Tel1 koryguje obniżoną żywotność spowodowaną przez wspomnianą mutację Mec1 [26].

Do rodziny białek zawierających sekwencję PI-3-kinazy należy również DNA-PK omówiony poniżej w kontekście homologii funkcjonalnej z białkiem ATM (rys. 1).

DOMENY BIAŁKA ATM A FENOTYP AT

Białko ATM pełni kluczową rolę w odpowiedzi komórki na promieniowanie jonizujące rozpoznając złamania podwójnej nici DNA, jak również rolę kontrolną w cyklu komórkowym.

Pod wpływem ekspresji kompletnego cDNA genu *ATM* w komórkach AT *in vitro* obserwuje się rewersję fenotypu do prawidłowego, a w szczególności korektę wysokiej wrażliwości na promieniowanie jonizujące [64, 65]. Ekspresja fragmentu końca karboksylowego białka ATM obejmującego domenę homologiczną do PI-3-kinazy (rys. 1), również kompensuje niedobory wynikające z mutacji *ATM* w

fibroblastach AT obserwowane *in vitro*, takie jak obniżone przeżycie po promieniowaniu jonizującym, blok cyklu komórkowego i zwiększona częstość aberracji chromosomowych. Sugeruje to, że wiele funkcji białka ATM jest kodowane przez fragment genu homologiczny wobec PI-3-kinazy [25].

Dalsze badania sekwencji białka ATM wykazały, że ekspresja fragmentu białka zawierającego motyw leucynowego „zamka błyskawicznego” (leu ZIP) zmutowanego białka ATM prowadzi często, lecz nie zawsze do nieprawidłowości obserwowanych w komórkach AT. Napromieniowane komórki, w których następuje ekspresja tego fragmentu, wykazują zaburzenie cyklu komórkowego w fazie S, zwiększoną wrażliwość na promieniowanie i wzrost częstości aberracji chromosomowych [25]. Dotychczas nie poznano białek, które mogłyby oddziaływać z domeną leucynowego „zamka błyskawicznego” białka ATM. W związku z tym zainteresowanie budzi występowanie homologicznego motywu leu ZIP palca cynkowego w dwóch kinazach: taki region mają DNA-PK i ATR/FRP. W DNA-PK funkcją tej domeny jest oddziaływanie z białkiem wiążącym się z DNA-C1D. Białko to jest zdolne do aktywacji katalitycznej podjednostki DNA-PK i w teście *in vitro* aktywuje kinazę jako kosubstrat. Synteza białka C1D jest również indukowana przez uszkodzenia DNA [55].

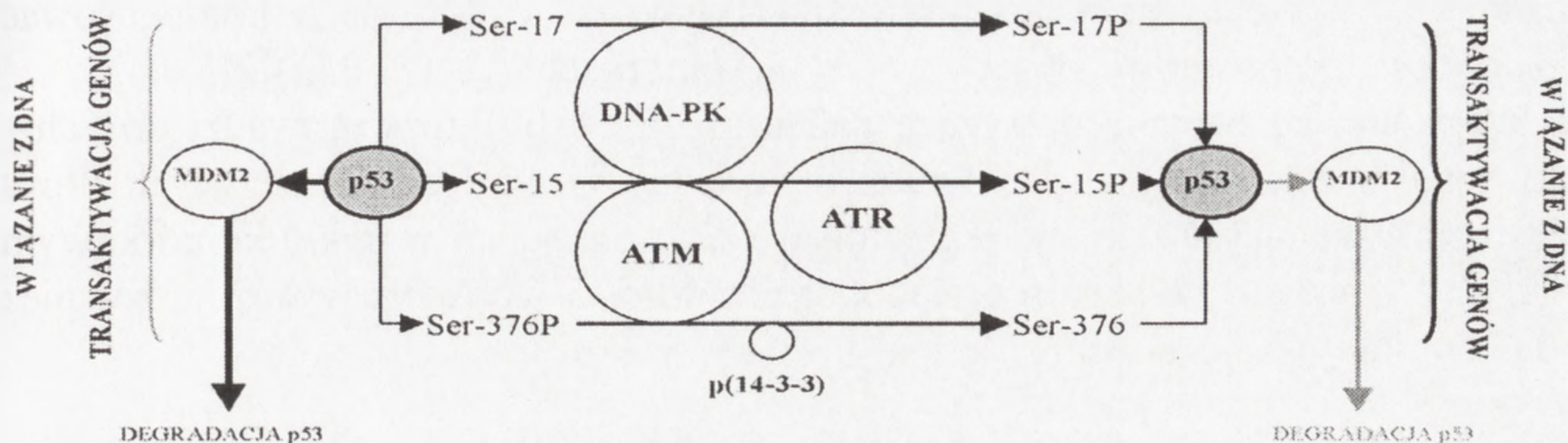
SUBSTRATY KINAZY ATM

1. Białko p53

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym i supresorem nowotworowym. W odpowiedzi na uszkodzenie DNA białko p53 wiąże się z określonymi motywami sekwencji DNA i powoduje transaktywację licznych genów, a na poziomie komórkowym – zahamowanie cyklu komórkowego lub apoptozę. Swoiste oddziaływanie białka ATM na białko p53 wiąże się z fosforylacją seryny 15 (Ser15) p53 [39]. Pod wpływem promieniowania jonizującego w prawidłowych komórkach następuje autofosforylacja białka ATM, po czym katalizuje ono fosforylację reszt Ser15 białka p53.

W normalnych komórkach poddanych promieniowaniu jonizującemu (IR) białko ATM chroni stabilność i aktywność białka p53. W komórkach AT, w analogicznych warunkach IR, następuje obniżenie aktywności i stabilności białka p53 [27].

ATM jest tylko jednym z wielu białek modyfikujących p53 (rys. 2). Kinaza białkowa zależna od DNA (DNA-PK) stabilizuje p53, również przez fosforylację p53, która w tym przypadku dotyczy Ser15 i Ser17. Fosforylacja p53 przez DNA-PK stabilizuje p53 hamując oddziaływanie tego białka z onkogenem MDM2. Ten ostatni dostarcza białku p53 sygnał do degradacji z udziałem proteaz. Pozostaje nie wyjaśnione, czy sama fosforylacja Ser15 (w przypadku oddziaływania białka ATM)



RYSUNEK 2. Udział białka ATM w aktywności i indukcji kinaz i fosfataz serynowych białka p53 w warunkach ekspozycji na promieniowanie jonizujące; fosforylacja p53 zapobiega jego degradacji przez zahamowanie wiązania z onkogenem MDM2; w konsekwencji zwiększa się wiązanie p53 z DNA i transaktywacja genów

jest wystarczająca do stabilizacji p53 *in vivo* i czy fosforylacja dodatkowych reszt serynowych, szczególnie Ser37, przez inne kinazy aktywowane po IR, wpływa również na oddziaływania między białkami p53 i MDM2 i aktywność białka p53 [43].

Aktywacja białka p53 pod wpływem promieniowania jonizującego zależy nie tylko od wyżej omawianej fosforylacji N-końcowej części białka p53 (Ser15 i 17), ale również od defosforylacji Ser376 w C-końcowej części tego białka [59]. Ta defosforylacja nie jest obserwowana w komórkach chorych z AT, co wskazuje, że białko ATM prawdopodobnie bierze udział w defosforylacji Ser376. Proces defosforylacji Ser376 białka p53 prowadzi do jego asocjacji z białkiem określonym jako 14-3-3, co powoduje zmianę konformacji p53 i zwiększone oddziaływanie z DNA [27].

Badania Canman [7] i Banina [2] wykazały oddziaływanie mutacji genu *ATM* na kinazowe aktywności białka ATM. Z drugiej strony dla powstawania takich objawów zespołu AT, jak: hypogonadyzm czy rozszerzenia naczyń krwionośnych, istotne mogą być inne funkcje białka ATM, odrębne wobec funkcji kinazowej (fosforylacji p53).

2. Białko c-ABL

W zależnej od ATM reakcji na uszkodzenie DNA uczestniczy również nie receptorowa, zależna od tyrozyny kinaza c-Abl. Białka ATM i c-Abl są wytrącane z lizatów komórek przeciwciałami w jednym kompleksie [3].

W komórkach AT indukcja kinazy c-Abl pod wpływem promieni jonizujących jest obniżona. Prawdopodobnie wpływa to na obniżenie w tych warunkach również indukowanej przez promieniowanie jonizujące kinazy Jun (JNK) [19].

W komórkach AT nadekspresja domeny kinazy ATM, tj. końca karboksylowego białka ATM, może przywracać zarówno aktywność c-Abl, jak i kompensować niedobory czynnościowe obserwowane w komórkach AT [3, 25, 42].

Wcześniejsze badania dotyczące nadekspresji c-Abl, która prowadzi do zahamowania zależnej od p53 proliferacji mysich lub szczurzych zarodkowych fibroblastów, wskazują na funkcje regulatorowe tego onkogenu w cyklu komórkowym [12, 53]. Komórki wykazujące niedobór aktywności DNA-PK wykazują również obniżoną aktywację c-Abl.

3. Białko p34

Białko p34 jest podjednostką kompleksu replikowanego białka A (RPA) i zostało zidentyfikowane jako substrat kinazy ATM w roku 1996 [10].

4. Białko Chk2

Zaburzenie fosforylacji białka Chk2 w komórkach AT wskazuje na to, że białko to jest fosforylowane przez kinazę ATM. Białko Chk2 jest homologiem występującego u drożdży białka Rad53 [24].

HOMOLOGIE FUNKCJONALNE BIAŁKA ATM

Homologia funkcjonalna między białkiem ATM a DNA-PK wynika z podobnej specyficzności substratowej [12, 28]. Do substratów obu tych kinaz poza p53 należy podjednostka kompleksu replikowanego białka A (RPA) wielkości 34 kD (p34). Zarówno p53, jak i podjednostka RPA (p34) są fosforylowane w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące, w sposób zależny od ATM [10, 23, 35, 45].

Z drugiej strony istnieją istotne różnice między DNA-PK i białkiem ATM jako kinazami. Po pierwsze aktywność kinazy białkowej ATM jest ściśle zależna od Mn^{2+} , który nie jest wymagany przez DNA-PK [2, 7, 21]. Po drugie do aktywacji kinazowej aktywności białka ATM *in vitro* zbędna jest obecność wolnych końców nici DNA [2, 7]. Tym, co łączy aktywności kinazowe DNA-PK i białka ATM, jest ich wrażliwość na inhibitor PI3-kinazy – wortmanninę [14, 37].

Podsumowując oddziaływania białek ATM i DNA-PK w reakcji na promieniowanie jonizujące fosforylują one te same substraty, tj. p53, c-Abl i RPA, a efekty ich aktywności mogą być wzajemnie od siebie zależne [8].

Homologie funkcjonalne między białkami ATM i ATR wyrażają się oddziaływaniem na te same mechanizmy kontrolne (rys. 2), a także wrażliwością obydwu kinaz na hamowanie przez kofeinę [36]. Hamowanie kinazy ATM przez kofeinę wyjaśnia mechanizm podwyższonej częstości aberacji chromosomowych w lim-

focytach heterozygot zespołu AT pod wpływem kofeiny *in vitro* i uzasadnia postulowaną przydatność tego parametru do oceny nosicielstwa mutacji genu *ATM* [30]. Z drugiej strony, w odróżnieniu od ATM i DNA-PK, które fosforylują białko p53, substratem kinazy c-Abl jest prawdopodobnie białko p73 uważane za homolog funkcjonalny białka p53 [1, 54, 63].

UTRATA GENU *ATM* A GENEZA NOWOTWORÓW

Poza wrażliwością na promieniowanie jonizujące inną cechą dzieci chorych z zespołem AT jest podatność na nowotwory, która w 10–15% przypadków wyraża się rozwojem chłoniaka lub białaczki limfoblastycznej (ALL) [51]. W białaczce prolimfocytowej T (T-PLL), która często jest skojarzona z mutacjami somatycznymi w locus *ATM*, niedobór białka ATM może oznaczać brak funkcji supresora nowotworowego [56]. Dzieci chore na AT wykazują również zwiększoną częstość nowotworów nabłonkowych, a kobiety – heterozygoty mutacji *ATM* charakteryzuje zwiększone ryzyko raka piersi [48, 52].

Mutacje somatyczne genu *ATM* występują stosunkowo często zarówno w rodzinnych, jak i w sporadycznych nowotworach piersi [50, 57, 58]. Z drugiej strony nie stwierdzono germinalnych mutacji genu *ATM* w rodzinach z rodzinnymi nowotworami piersi oraz żołądka [4]. Pomimo wysokiej częstości występowania w badanych guzach piersi utraty heterozygotyczności (*loss of heterozygosity* – LOH) w regionie chromosomu 11q22–23, analizą zlokalizowanego w tym regionie genu *ATM* nie wykazano LOH, czyli zmiany obydwóch alleli tego genu [47].

Niedobór funkcji białka ATM zwiększa podatność chorych z zespołem AT na rozwój nowotworów w wyniku kombinacji defektów dwóch mechanizmów: wadliwej naprawy uszkodzeń DNA i defektu kontroli cyklu życiowego komórki. Wymieniona kombinacja zmian sprzyja utrwaleniu mutacji somatycznych stanowiących etapy procesu transformacji nowotworowej [16].

Myszy z unieczynnionym jednym z genów: *p53* lub *ATM*, wykazują stosunkowo niewielki wzrost wrażliwości na nowotwory. Z drugiej strony, myszy z unieczynnionymi oboma genami, tzn. o genotypie *atm⁻/atm⁻*; *p53⁻/p53⁻* wykazują dramatycznie przyspieszony wzrost guza. Opisane interakcje między mutacjami genów *p53* i *ATM* sugerują, że w genezie powstawania nowotworu wymienione białka nie tylko współdziałają i działają w sekwencji, ale odgrywają również niezależne role [61].

PIŚMIENNICTWO

- [1] AGAMI R, BLANDINO G, OREN M, SHAUL Y. Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 1999; **399**: 809–813.

- [2] BANIN S, SHIED SY, ANDERSON CW, CHESSA L, SMORODINSKI NI, PRINCES C, REISS Y, SHILOH Y, ZIV Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998; **281**: 1674–1677.
- [3] BASKARAN R, WOOD LD, WHITAKER LL, CANMAN CE, MORGAN SE, XU Y, BARLOW C, BALTIMORE D, WYNshaw-BORIS A, KASTAN MB, WANG JY. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation [see comments] *Nature* 1997; **387**: 516–519.
- [4] BAY JO, GRANCHOM, PERNIND, PRESNEAU N, RIO P, TCHIRKOV A, UHRHAMMER N, VERRELLE P, GATTI RA, BIGNON YJ. No evidence for constitutional ATM mutation in breast/gastric cancer families. *Int J Oncol* 1998; **12**: 1385–1390.
- [5] BEAMISH H, KHANNA K, LAVIN M. Ionizing radiation and cell cycle progression in ataxia telangiectasia. *Radiation Res* 1994; **138**: S130–S133.
- [6] BROWN KE, ZIVY, SADANANDAN SN, CHESSA L, COLLINS FS, SHILOH Y, TAGLE DA. The ataxia-telangiectasia gene product, a constitutively expressed nuclear protein that is not up-regulated following genome damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 1840–1845.
- [7] CANMAN CE, LIM D-S, CIMPRICH KA, TAYA Y, TAMARUS M, SAKAGUCHI K, APPELLA E, KASTAN MB, SILICIANO JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998; **281**: 1677–1678.
- [8] CANMAN CE, LIM DS. The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene* 1998; **17**: 3301–3308.
- [9] CHEN-G, LEE-EYHP. The product of the ATM gene is a 370-kDa nuclear phosphoprotein. *J Biol Chem* 1996; **271**: 33693–33697.
- [10] CHENG X, CHEONG N, WANG Y, ILIAKIS G. Ionizing radiation-induced phosphorylation of RPA p34 is deficient in ataxia telangiectasia and reduced in aged normal fibroblasts. *Radiother Oncol* 1996; **39**: 43–52.
- [11] GATTI RA, BERKEL I, BODER E, BRAEDT G, CHARMLEY P, CONCANNON P, ERSOY F, FOROUD T, JASPERS NG, LANGE K, et al. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 1988; **336**: 577–580.
- [12] GOGA A, LIU X, HAMBUCH TM, SENECHAL K, MAJOR E, BERK AJ, WITTE ON, SAWYERS CL. p53 dependent growth suppression by the c-Abl nuclear tyrosine kinase. *Oncogene* 1995; **17**: 791–799.
- [13] GREENWELL PW, KRONMAL SL, PORTER SE, GASSENHUBER J, OBERMAIER B, PETES TD. TEL1, a gene involved in controlling telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. *Cell* 1995; **82**: 823–829.
- [14] HARTLEY KO, GELL D, SMITH GC, ZHANG H, DIVECHA N, CONNELLY MA, ADMON A, LEES-MILLER SP, ANDERSON CW, JACKSON SP. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the *ataxia telangiectasia* gene product. *Cell* 1995; **82**: 849–856.
- [15] HAWLEY RS, FRIEND SH. Strange bedfellows in even stranger places: the role of ATM in meiotic cells, lymphocytes, tumors, and its functional links to p53 [comment]. *Genes Dev* 1996; **10**: 2383–2388.
- [16] JEGGO PA, CARR AM, LEHMANN AR. Splitting the ATM: distinct repair and checkpoint defects in ataxia-telangiectasia. *Trends Genet* 1998; **14**: 312–316.
- [17] KATO R, OGAWA H. An essential gene, ESR1, is required for mitotic cell growth, DNA repair and meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 3104–3112.
- [18] KEREM B, ROMMENS JM, BUCHANAN JA, MARKIEWICZ D, COX TK, CHAKRAVARTI A, BUCHWALD M, TSUI LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; **245**: 1073–1080.

- [19] KHARBANDA S, REN R, PANDEY P, SHAFMAN TD, FELLER SM; WEICHSELBAUM RR, KUFEDW. Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature* 1995; **376**: 785–788.
- [20] KNEBEL A, RAHMSDORF HJ, ULLRICH A, HERRLICH P. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J* 1996; **15**: 5314–5325.
- [21] LEES-MILLER SP, SAKAGUCHI K, ULLRICH SJ, APPELLAE, ANDERSON CW. Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 5041–5049.
- [22] LIM DS, KIRSCH DG, CANMAN CE, AHN JH, ZIV Y, NEWMAN LS, DARNELL RB, SHILOH Y, KASTAN MB. ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10146–10151.
- [23] LIU VF, WEAVER DT. The ionizing radiation-induced replication protein A phosphorylation response differs between ataxia telangiectasia and normal human cells. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 7222–7231.
- [24] MATSUOKA S, HUANG M, ELLEDGE SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 1998; **282**: 1893–1897.
- [25] MORGAN SE, LOVLY C, PANDITA TK, SHILOH Y, KASTAN MB. Fragments of ATM which have dominant-negative or complementing activity. *Mol Biol* 1997; **17**: 2020–2029.
- [26] MORROW DM, TAGLE DA, SHILOH Y, COLLINS FS, HIETER P. TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. *Cell* 1995; **82**: 831–840.
- [27] NAKAMURA Y. ATM: the p53 booster. *Nat Med* 1998; **11**: 1231–1232.
- [28] NIU H, ERDJUMENT-BROMAGE H, PAN ZQ, LEE SH, TEMPST P, HURWITZ J. Mapping of amino acid residues in the p34 subunit of human single-stranded DNA-binding protein phosphorylated by DNA-dependent protein kinase and Cdc2 kinase *in vitro*. *J Biol Chem* 1997; **272**: 12634–12641.
- [29] PANDITA TK, WESTPHAL CH, ANGER M, SAWANT SG, GEARD CR, PANDITA RK, SCHERTHAN H. Atm inactivation results in aberrant telomere clustering during meiotic prophase. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 5096–5105.
- [30] PAWLAK AL, KOTECKI M, IGNATOWICZ R. Increased frequency of chromatid breaks in lymphocytes of heterozygotes of ataxia telangiectasia after *in vitro* treatment with caffeine. *Mutat Res* 1990; **230**: 197–204.
- [31] ROMMENS JM, IANNUZZI MC, KEREM B, DRUMM ML, MELMER G, DEAN M, ROZMAHEL R, COLE JL, KENNEDY D, HIDAKA N et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; **245**: 1059–1065.
- [32] ROYER-POKORA B, KUNKEL LM, MONACO AP, GOFF SC, NEWBURGER PE, BAEHNER RL, COLE FS, CURNUTTE JT, ORKIN SH. Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* 1986; **322**: 32–38.
- [33] RYBCZYNSKA M, PAWLAK AL, SIKORSKA E, IGNATOWICZ R. Ataxia telangiectasia heterozygotes and patients display increased fluidity and decrease in contents of sulfhydryl groups in red blood cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1302**: 231–235.
- [34] SABATINI DM, ERDJUMENT-BROMAGE H, LUI M, TEMPST P, SNYDER SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 1994; **78**: 35–43.
- [35] SAKAGUCHI K, HERRERA JE, SAITO S, MIKI T, BUSTIN M, VASSILEV A, ANDERSON CW, APPELLA E. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 1998; **12**: 2831–2841.

- [36] SARKARIA JN, BUSBY EC, TIBBETTS RS, ROOS P, TAYA Y, KARNITZ LM, ABRAHAM RT. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res* 1999; **59**: 4375–4382.
- [37] SARKARIA JN, TIBBETTS RS, BUSBY EC, KENNEDY AP, HILL DE, ABRAHAM RT. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res* 1998; **58**: 4375–4382.
- [38] SAVITSKY K, BAR-SHIRA A, GILAD S, ROTMAN G, ZIV Y, VANAGAITE L, TAGLE DA, SMITH S, UZIEL T, SFEZ S, ET AL. A single *ataxia telangiectasia* gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995; **268**: 1749–1753.
- [39] SAVITSKY K, SFEZ S, TAGLE DA, ZIV Y, SARTIEL A, COLLINS FS, SHILOH Y, ROTMAN G. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 2025–2032.
- [40] SCHMIDT A, BICKLE M, BECK T, HALL MN. The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* 1997; **88**: 531–542.
- [41] SCHMIDT A, KUNZJ, HALL MN. TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 13780–13785.
- [42] SHAFMAN T, KHANNA KK, KEDAR P, SPRING K, KOZLOV S, YEN T, HOBSON K, GATEI M, ZHANG N, WATTERS D, EGERTON M, SHILOH Y, KHARBANDA S, KUFE D, LAVIN MF. Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature* 1997; **387**: 520–523.
- [43] SHIEH SY, IKEDA M, TAYA Y, PRIVES C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997; **91**: 325–334.
- [44] SHIGETA T, TAKAGI M, DELIA D, CHESSA L, IWATA S, KANKE Y, ASADA M, EGUCHI M, MIZUTANI S. Defective control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint in heterozygous carriers of ATM mutations. *Cancer Res* 1999; **59**: 2602–2607.
- [45] SILICIANO JD, CANMAN CE, TAYA Y, SAKAGUCHI K, APPELLA E, KASTAN MB. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev* 1997; **11**: 3471–3481.
- [46] SMILENOV LB, MORGAN SE, MELLADO W, SAWANT SG, KASTAN MB, PANDITA TK. Influence of ATM function on telomere metabolism. *Oncogene* 1997; **15**: 2659–2665.
- [47] STOPPA-LYNNET D, SOULIER J, LAUGE A, DASTOT H, GARAND R, SIGAUX F, STERN M-H. Inactivation of the ATM gene in T-cell prolymphocytic leukemias. *Blood* 1998; **91**: 3920–3926.
- [48] SWIFT M, REITNUER PJ, MORRELL D, CHASE CL. Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N Eng J Med* 1987; **316**: 1289–1294.
- [49] TAKAGI M, DELIA D, CHESSA L, IWATA S, SHIGETA T, KANKE Y, GOI K, ASADA M, EGUCHI M, KODAMA C, MIZUTANI S. Defective control of apoptosis, radiosensitivity, and spindle checkpoint in ataxia telangiectasia. *Cancer Res* 1998; **58**: 4923–4929.
- [50] TAKEUCHI S, KOIKE M, PARK S, SERIUT, BARTMAM CR, TAUB HE, WILLIAMSON IK, GREWAL J, TAGUCHI H, KOEFFLER HP. The ATM gene and susceptibility to childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Brit J Haem* 1998; **103**: 536–538.
- [51] TAYLOR AMR, METCALFE JA, THICK J, MAK YF. Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood* 1996; **87**: 423–438.
- [52] UHRHAMMER N, BAY JO, BIGNON YJ. Seventh International Workshop on Ataxia-Telangiectasia. *Cancer Res* 1998; **58**: 3480–3485.
- [53] YUAN ZM, HUANG Y, WHANG Y, SAWYERS C, WEICHSELBAUM R, KHARBANDA S, KUFE D. Role for c-Abl tyrosine kinase in growth arrest response to DNA damage. *Nature* 1996; **382**: 272–274.

- [54] YUAN ZM, SHIOYA H, ISHIKO T, SUN X, GU J, HUANG YY, LU H, KHARBANDA S, WEICHSELBAUM R, KUFE D. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 1999; **399**: 814–817.
- [55] YAVUZER U, SMITH GC, BLISS T, WERNER D, JACKSON SP. DNA end-independent activation of DNA-PK mediated via association with the DNA-binding protein C1D. *Genes Dev* 1998; **12**: 2188–2199.
- [56] VORECHOVSKY I, LUO L, DYER MJ, CATOVSKY D, AMLLOT PL, YAXLEY JC, FORONI L, HAMMARSTROM L, WEBSTER AD, YUILLE MA. Clustering of missense mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukaemia. *Nat Genet* 1997; **17**: 96–99.
- [57] VORECHOVSKY I, LUO L, LINDBLOM A, NEGRINI M, WEBSTER AD, CROCE CM, HAMMARSTROM L. ATM mutations in cancer families. *Cancer Res* 1996; **56**: 4130–4133.
- [58] VORECHOVSKY I, RASIO D, LUO L, MONACO C, HAMMARSTROM L, WEBSTER AD, ZALOUDIK J, BARBANTI-BRODANI G, JAMES M, RUSSO G et al. The ATM gene and susceptibility to breast cancer: analysis of 38 breast tumors reveals no evidence for mutation. *Cancer Res* 1996; **56**: 2726–2732.
- [59] WATERMAN MJ, STAVRIDIS ES, WATERMAN JLF, HALAZONETIS TD. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nature Genet* 1998; **19**: 175–178.
- [60] WATTERS D, KHANNA KK, BEAMISH H, BIRRELL G, SPRING K, KEDAR P, GATEI M, STENZEL D, HOBSON K, KOZLOV S, ZHANG N, FARRELL A, RAMSAY J, GATTI R, LAVIN M. Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene* 1997; **14**: 1911–1921.
- [61] WESTPHAL CH, HOYES KP, CANMAN CE, HUANG X, KASTAN MB, HENDRY JH, LEDER P. Loss of atm radiosensitizes multiple p53 null tissues. *Cancer Res* 1998; **58**: 5637–5639.
- [62] WEINERT TA, KISER GL, HARTWELL LH. Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev* 1994; **8**: 652–665.
- [63] ZENG X, CHEN L, JOST CA, MAYA R, KELLER D, WANG X, KAELIN WG JR, OREN M, CHEN J, LU H. MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 3257–3266.
- [64] ZHANG N, CHEN P, KHANNA KK, SCOTT S, GATEI M, KOZLOV S, WATTERS D, SPRING K, YEN T, LAVIN MF. Isolation of full-length ATM cDNA and correction of the ataxia-telangiectasia cellular phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 8021–8026.
- [65] ZIV Y, BAR-SHIRA A, PECKER I, RUSSELL P, JORGENSEN TJ, TSARFATI I, SHILOH Y. Recombinant ATM protein complements the cellular A-T phenotype. *Oncogene* 1997; **15**: 159–167.

Adresy autorów: ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań;

e-mail: mrybczyn@eucalyptus.usoms.poznan.pl (MR)

ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań;

email: pawlakal@mon.poznan.pl (ALP)

PODŁOŻE GENETYCZNE OSTEOPOROZY. AKTUALNY STAN BADAŃ

GENETIC BASIS OF OSTEOPOROSIS. CURRENT STATE OF RESEARCH

Robert KALAK*, Wanda HORST-SIKORSKA**, Ryszard SŁOMSKI*

*Zakład Genetyki Człowieka PAN, Katedra Biochemii i Biotechnologii,
Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, Poznań; **Klinika Endokrynologii,
Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, Poznań

Streszczenie: W pracy przedstawiono aktualny stan badań związanych z poszukiwaniem genów odpowiedzialnych za rozwój osteoporozy. Choroba ta jest coraz powszechniejsza i prowadzi do niebezpiecznych, trudnych w leczeniu złamań. Uważa się, że uwarunkowania genetyczne są w znacznym stopniu odpowiedzialne za rozwój choroby. Niemniej wielogenowy charakter oraz wpływ czynników środowiskowych bardzo utrudnia wskazanie genów, które mają znaczący wpływ. Poznanie podłoża genetycznego osteoporozy pozwoli wprowadzić skuteczną profilaktykę oraz zwiększy skuteczność leczenia.

Słowa kluczowe: osteoporoza, polimorfizmy, analiza asocjacji, choroba wielogenowa

Summary: Current knowledge concerning searching for osteoporosis genes is described. Osteoporosis and subsequent fractures is growing major health problem. Genetic background is believed as the most important factor for development of the disease. However, finding of genes is difficult because of polygenic determination and environmental factors, which influence the phenotype. Understanding the genetic basis of osteoporosis will likely be the starting-point of effective prophylactic and more specific treatment.

Key words: osteoporosis, polymorphisms, association analysis, polygenic disease

WPROWADZENIE

Olbrzymi postęp, jaki dokonał się w biologii molekularnej w ostatnich dekadach XX wieku, a szczególnie zmapowanie polimorficznych markerów rozłożonych równomiernie w całym genomie (mapa genetyczna) oraz rozwój nowoczesnych technik

ułatwiających analizę sprzężeń z wykorzystaniem tych markerów pozwolił określić położenie genów dla ok. 400 chorób warunkowanych genetycznie i dziedziczonych zgodnie z prawami Mendla [37]. Obecnie coraz większą uwagę kieruje się na schorzenia, których podłoże molekularne jest znacznie trudniejsze do poznania. Rozwój tych chorób determinowany jest najczęściej nie przez pojedyncze geny, ale wiele genów, których efekt może być dodatkowo w znacznym stopniu modyfikowany przez ich wzajemne epistatyczne oddziaływania oraz wpływ czynników egzogennych. Do chorób, u których podłoża leżą takie złożone uwarunkowania genetyczno-środowiskowe, należy szereg najczęściej występujących chorób stanowiących duży problem społeczny, takich jak: choroba wieńcowa, otyłość, nadciśnienie, czy wreszcie osteoporoza. W niniejszym artykule przedstawiono aktualny stan badań zmierzających do określenia wpływu czynników dziedzicznych na rozwój osteoporozy, a także scharakteryzowano poszczególne geny, których sprzężenie z tą chorobą jest obecnie intensywnie badane i dyskutowane. Ustalenie podłoża genetycznego osteoporozy jest ważne z dwóch względów: po pierwsze przyniesie pełne wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw tej choroby, a ta wiedza jest niezbędna do opracowania lepszych, bardziej skutecznych leków i terapii, po drugie umożliwi prowadzenie diagnostyki molekularnej, która dostarczy więcej informacji o rozwoju choroby, a przez to umożliwi zastosowanie odpowiednich leków dobranych do danego genotypu chorego. W przypadku chorób, na których rozwój oprócz uwarunkowań genetycznych wpływają także czynniki środowiskowe, możliwa jest profilaktyka, a więc manipulowanie tymi ostatnimi w celu zapobieżenia chorobie lub opóźnienia jej powstania. Diagnostyka molekularna pozwoli wykryć podatność na osteoporozę dużo wcześniej, niż umożliwiają to obecne metody, a dzięki wcześniej rozpoczętej, ukierunkowanej prewencji w znacznym stopniu zapobiec chorobie.

CHARAKTERYSTYKA OSTEOPOROZY

Osteoporoza dotyka blisko 40% kobiet i 12% mężczyzn [30] prowadząc do występowania złamań, których leczenie jest długotrwałe i często kończy się trwałym kalectwem, a przy złamaniach szyjki kości udowej w kilkunastu procentach kończy się śmiercią spowodowaną wtórnymi zmianami układu naczyniowego. Opieka nad chorymi, u których wystąpiło złamanie, jest trudna i kosztowna. Bezpośrednim objawem choroby są złamania kości zwykle nie spowodowane poważnymi urazami, ale zwyczajną codzienną aktywnością. Przyczyną tych złamań jest zmniejszenie się mineralnej gęstości kości (ang. *bone-mineral density* – BMD) obserwowane głównie w miejscach o dużej zawartości kości gąbczastej (beleczkowatej) oraz nieprawidłowości w mikroarchitekturze tkanki kostnej. Rozwój choroby jest dłu-

gotrwały i upływa wiele lat, zanim dojdzie do takiego osłabienia kości, że nie wytrzymują one normalnych obciążeń.

Rozwój układu kostnego w ciągu życia można podzielić na okres kształtowania się układu kostnego wraz z jego mineralizacją, kończący się uzyskaniem tzw. szczytowej masy kostnej (ang. *peak bone mass*) oraz następującego po nim okresu powolnego ubytku tej masy. Mineralizacja tkanki kostnej osiąga swój szczytowy punkt w trzeciej lub czwartej dekadzie życia, aby później stopniowo spadać. U kobiet proces utraty masy kostnej nasila się znacznie po okresie menopauzy. Na przykład, u mężczyzn w starszym wieku ubytek masy kostnej dla kości promieniowej wynosi w ciągu dekady ok. 2%, natomiast u kobiet w tym samym wieku aż 10% [45]. Wiek, w którym dochodzi do nadmiernego osłabienia kości, czyli do powstania osteoporozy, zależy jest więc od uzyskanej w pierwszej połowie życia masy kostnej oraz tempa jej ubytku w późniejszych latach. Ponieważ mężczyźni uzyskują wyższą szczytową masę kostną, a jednocześnie ubytek tej masy w okresie starości jest u nich wolniejszy, tłumaczy to rzadsze występowanie osteoporozy u mężczyzn.

Wiadomo, że tkanka kostna jest strukturą dynamiczną podlegającą ciągłym procesom resorpcji i odbudowy prowadzonym przez wyspecjalizowane komórki. W dużym uproszczeniu: osteoklasty – wielojądrzaste komórki kościogubne wydzielając jony wodorowe oraz zespół enzymów proteolitycznych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej powodują resorpcję kości, powstałe ubytki są następnie odbudowywane przez osteoblasty. Osteoblasty odtwarzają macierz kolagenową, która następnie ulega mineralizacji głównie poprzez odkładanie fosforanu wapnia, same zaś stają się komórkami kości – osteocytami. Cały proces odnowy u dorosłego człowieka obejmuje ok. 16% całej tkanki kostnej w ciągu roku, nie jest jednak jednakowy dla całego szkieletu, lecz najintensywniej zachodzi w tzw. kości gąbczastej (ok. 80%), a znacznie słabiej w kości zbitej (ok. 20%). Jest to bardzo złożony proces i podlega ścisłej kontroli przez szereg hormonów i czynników wzrostu. Jego zaburzenia spowodowane czynnikami genetycznymi lub środowiskowymi mogą spowodować zachwianie równowagi pomiędzy procesami resorpcji i odbudowy, a gdy resorpcja jest zbyt duża lub odbudowa zbyt wolna, wtedy organizm uzyska mniejszą masę kostną, lub – jeżeli brak równowagi ma miejsce w późniejszym okresie życia – dochodzi do zbyt szybkiego ubytku masy kostnej i ostatecznie osteoporozy. Im intensywniejsza jest przebudowa tkanki kostnej, tym szybciej nieznaczna przewaga resorpcji spowoduje jej osłabienie, dlatego złamania spowodowane osteoporozą występują w obszarach o największym udziale tkanki kostnej gąbczastej, jak np.: szyjka kości udowej, odcinek lędźwiowy kręgosłupa czy kości przedramienia.

Powszechnie stosowanym badaniem wykrywającym oraz określającym stopień zaawansowania choroby jest pomiar gęstości mineralnej kości (BMD) w obszarach, gdzie gąbczasta budowa kości ma duży udział. Uzyskane wyniki odnosi się do średniej wartości BMD dla zdrowych dorosłych osób. Zgodnie z wytycznymi WHO spadek BMD powyżej 2,5 SD (standardowego odchylenia) od wartości średniej

dla młodych kobiet uważa się za osteoporozę [57]. Bierze się pod uwagę także ewentualne wystąpienie złamań u danej osoby. Metoda ta nie odzwierciedla jednak pełnego obrazu stanu kości, na który składają się także inne parametry, takie jak: mikroarchitektura tkanki kostnej (liczba beleczek kostnych kości gąbczastej i ich postać, zaburzenia w układzie macierzy kostnej itd.) czy geometria kości [41]. Znaczenie innych parametrów podkreśla fakt, że w ciągu roku tylko u 1–2% kobiet w wieku 65–70 lat i z BMD co najmniej 2,5 SD poniżej normy występuje złamanie [58]. Oznacza to, że niskie BMD nie jest jedynym czynnikiem, sprzyjającym złamaniom. Jednak z uwagi na trudności związane z badaniem strukturalnym kości, gdzie konieczna jest biopsja, zwykle dostępne są jedynie wyniki pomiaru BMD i sam fakt wystąpienia złamania.

Z czynników środowiskowych wpływających na rozwój tkanki kostnej można wymienić: nawyki żywieniowe, a w tym głównie spożycie wapnia oraz witaminy D, których niedostatek w pożywieniu jest zdecydowanie niekorzystny [31], poza tym masa ciała oraz aktywność fizyczna. Aktywność fizyczna sprzyja mineralizacji, tym niemniej zbyt intensywna może u niektórych kobiet prowadzić do zmniejszenia poziomu estrogenów i obniżenia mineralizacji kości [56]. Na metabolizm kostny niekorzystny wpływ mają zaburzenia funkcji jajników (amenorrhea, dłuższe przerwy w miesiączkowaniu itp.) oraz długi okres karmienia piersią przy braku suplementacji wapniowej. Sama ciąża nie wpływa natomiast ujemnie na układ kostny [61]. Oprócz wyżej wymienionych czynników stwierdzono także niekorzystny wpływ na tkankę kostną nadmiernego spożycia kofeiny i alkoholu oraz palenia papierosów [24, 35, 43]. Jedną z dróg oddziaływania alkoholu na stan kości może przebiegać poprzez aktywację promotora dla interleukiny 6 (IL-6), która z kolei wpływa na rozwój osteoklastów [33].

UDZIAŁ CZYNNIKÓW GENETYCZNYCH W ROZWOJU OSTEOPOROZY

Badania zmierzające do w miarę obiektywnego ustalenia udziału czynników genetycznych w rozwoju osteoporozy należą do trudnych. Są one jednak ważne dla uzasadnienia poszukiwania genów sprzyjających rozwojowi tej choroby. Dziedziczne predyspozycje genotypowe, na które nakładają się czynniki środowiskowe modyfikujące fenotyp. Jeżeli oszacowany wpływ czynników dziedzicznych okazałby się bardzo mały, to znalezienie genów stałoby się bardzo trudne, a poza tym taki wynik oznaczałby brak jednego z głównych praktycznych celów poszukiwania genów osteoporozy, tj. możliwość wczesnego wykrywania podatności genetycznej i zapobiegania rozwojowi choroby u osób z taką podatnością.

Pierwszym krokiem przy badaniu udziału czynników genetycznych jest ustalenie kryteriów rozpoznania choroby, pozwalających odróżnić osoby zdrowe od chorych lub ocenić stopień zaawansowania choroby, co zwykle nie jest łatwe przy chorobach warunkowanych wielogenowo. Przydatna jest także możliwość analizy czynników lub procesów bezpośrednio wpływających na rozwój choroby. W przypadku osteoporozy podstawowym kryterium brany pod uwagę w większości przeprowadzonych badań jest mineralna gęstość kości (BMD) i złamania. Ponieważ osteoporoza jest chorobą wynikającą z zachwiania dynamicznego procesu formowania i resorpcji tkanki kostnej, można także badać nasilenie tych dwóch przeciwstawnych procesów przez pomiar uwalnianych w ich przebiegu markerów biochemicznych zawartych w osoczu lub w moczu. Takimi markerami dla odbudowy są np.: alkaliczna fosfataza, osteokalcyna czy propeptyd kolagenu I, a dla resorpcji zawarte w moczu pirydynolina, deoksypirydynolina, hydroksyprolina, wapń i inne [13].

Sama jednostka chorobowa podobnie jak powodowane przez nią złamanie jest cechą nieciągłą (tzn. jest albo nie), natomiast BMD lub poziomy różnych markerów biochemicznych są typowymi ciągłymi cechami ilościowymi. Tak więc badania uwzględniające wystąpienie lub brak choroby będą wymagały nieco innego podejścia niż badania oparte o cechy ilościowe.

Drugim ważnym zagadnieniem jest dobór grupy badanych osób, która pozwoli oszacować wpływ czynników genetycznych na obserwowaną zmienność gęstości mineralnej kości czy innych czynników. Dla osteoporozy przeprowadzono badania rodzinne głównie w układach rodzice-dzieci, na grupach bliźniąt jedno- i dwujajowych (*MZ* i *DZ*), a także porównywano populacje różnych ras. Badania rodzinne porównują częstość występowania choroby u najbliższych krewnych chorej osoby do częstości jej występowania w ogólnej populacji (współczynnik λ_R – ang. *relative risk*). Dla cech ilościowych, a właśnie taką cechą jest gęstość mineralna kości, oblicza się odziedziczalność (h^2 – ang. *heritability*). Badania rodzinne są ograniczone przez wspólne warunki środowiskowe, które są zwykle bardzo podobne dla członków danej rodziny. Ten problem staje się zaletą przy badaniu bliźniąt jedno- i dwujajowych. Przyjmuje się, że warunki środowiskowe dla bliźniąt danej pary są identyczne. Jeżeli czynniki genetyczne rzeczywiście mają wpływ na obserwowaną zmienność cechy (gęstość mineralną kości), to w parach bliźniąt jednojajowych będzie ona istotnie mniejsza w porównaniu ze zmiennością w parach bliźniąt dwujajowych, średnio tylko w połowie identycznych genetycznie. Przyjmuje się, że różnica pomiędzy zmiennością wewnątrz par bliźniąt jednojajowych a zmiennością wewnątrz par bliźniąt dwujajowych jest spowodowana przez czynniki genetyczne. Trzeba jednak pamiętać, że bliźnięta jednojajowe w rzeczywistości nie są całkowicie identyczne genetycznie (genom mitochondrialny, imprinting, mutacje somatyczne itp.) oraz że bliźnięta jednojajowe zwykle mają warunki środowiskowe bardziej podobne niż dwujajowe.

Przeprowadzono szereg badań, których celem było ustalenie wpływu czynników genetycznych na rozwój osteoporozy. Badania zróżnicowania BMD odcinka lędźwiowego kręgosłupa, proksymalnej części kości udowej oraz dystalnej części kości łokciowej dla par bliźniąt jedno- i dwujajowych obu płci w wieku od 24 do 75 lat pozwoliły oszacować odziedziczalność tej cechy na $h^2 = 0,4-0,6$, a dla samego odcinka lędźwiowego nawet 0,85 [53]. W innym badaniu dotyczącym zmienności BMC (ang. *bone mineral content* – zawartość mineralna kości) dla par bliźniąt jedno- i dwujajowych podzielonych na dwie grupy – do 25 roku życia oraz powyżej, stwierdzono większą odziedziczalność dla odcinka lędźwiowego kręgosłupa w młodszej grupie $h^2 = 0,88$, z kolei w drugim miejscu szkieletu – kości promieniowej, odziedziczalność była wyższa w starszej grupie i wynosiła 0,75 [6]. Duży wpływ czynników genetycznych wykazano także dla dynamiki zmian w gęstości mineralnej kości głównie obszaru lędźwiowego kręgosłupa [34]. Badania te obejmowały grupy bliźniąt jedno- i dwujajowych w średnim wieku. Analizy markerów biochemicznych kościotworzenia i resorpcji kości u kobiet w wieku pomenopauzalnym wykazały jednak nieznaczny wpływ podłoża genetycznego na zmienność poziomu tych markerów [13]. Był on znaczący jedynie dla markerów, których poziom nie zmienia się istotnie po okresie menopauzy.

Poza pracami badawczymi obejmującymi bliźnięta jedno- i dwujajowe przeprowadzono także szereg badań rodzinnych. Mniejsze BMD stwierdzono dla osób należących do rodzin, w których wystąpiła osteoporoza w porównaniu z osobami bez osteoporozy w rodzinie [9]. Trzeba pamiętać, że w tych przypadkach obok czynników genetycznych duże znaczenie mają czynniki środowiskowe, na ogół podobne dla członków jednej rodziny. Inny projekt badawczy obejmujący pomiary BMD zdrowych rodziców i ich dzieci, uwzględniający czynniki środowiskowe, pozwolił oszacować odziedziczalność BMD na $h^2 = 0,85$ [20]. Ważny wynik uzyskano w niedawnych badaniach BMD dla par matka – córka [11]. Badano córki w wieku 6,6–11,1 lat, a więc przed okresem dojrzewania, a pomiary BMD były powtarzane co roku przez dwa lata. Brano pod uwagę także podaż wapnia w żywieniu, masę ciała i wzrost. Pomimo tak młodej grupy poddanej analizie autorzy potwierdzili wysoką odziedziczalność BMD dla miejsc szkieletu bogatych w tkankę kostną gąbczastą. Badania te pozwalają także sądzić, że gęstość mineralna kości jest cechą, dla której występuje tzw. *tracking*, czyli utrzymywanie się fenotypu cechy danej osoby w niezmienionej postaci względem populacji do i w czasie wieku dorosłego. Ta własność umożliwia poszukiwanie genów predysponujących do osteoporozy także u młodych osób, co może być ważne przy analizie asocjacji.

Za wpływem czynników genetycznych na BMD przemawiają także badania różnic międzyrasowych tej cechy. Wiadomo bowiem, że rasa czarna ma wyższe BMD niż rasa biała. Można jednak zakładać, że wynika to z różnic środowiskowych. Badania przeprowadzone na grupach młodych osób rasy czarnej i białej wykazały wyższe BMD dla osób rasy czarnej, nawet po uwzględnieniu czynników, takich

jak: styl życia, w tym aktywność fizyczna, dieta i wiele innych oraz masa ciała, wzrost, a nawet różnice w poziomie różnych czynników biochemicznych [8]. Autorzy tych badań sądzą, że różnice BMD są kształtowane najprawdopodobniej już we wczesnym dzieciństwie.

Oprócz badań wyżej wymienionych, przeprowadzono jeszcze szereg innych analiz, których celem było ustalenie wpływu czynników genetycznych na rozwój osteoporozy [4, 29, 44, 59, 60]. Chociaż zdarzają się prace przypisujące większy wpływ czynnikom środowiskowym, to jednak większość wskazuje na podłoże genetyczne jako decydującą determinantę rozwoju osteoporozy. Wydaje się, że czynniki genetyczne mają decydujące znaczenie dla uzyskania szczytowej masy kostnej, natomiast w oddziaływaniu na tempo ubytku tej masy po okresie menopauzy u kobiet czynniki hormonalne przeważają nad genetycznymi.

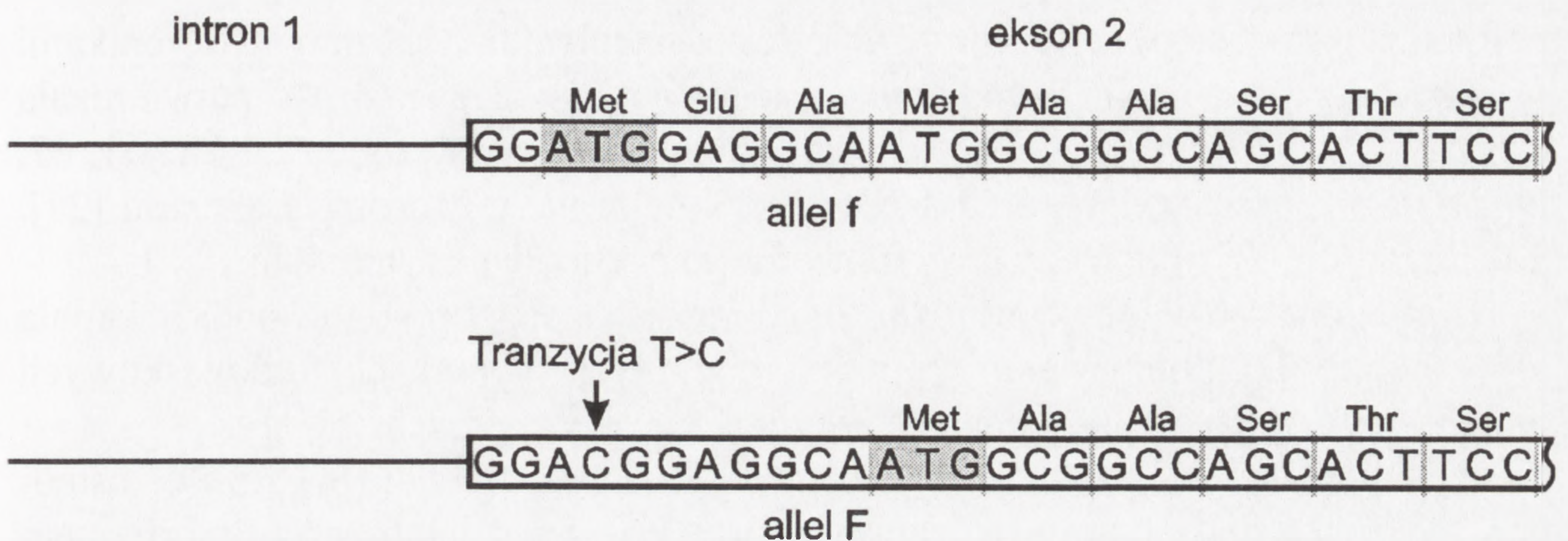
STRATEGIE POSZUKIWANIA GENÓW OSTEOPOROZY

Choroby warunkowane wielogenowo, takie jak osteoporoza, wymagają innego podejścia przy poszukiwaniu genów niż choroby jednogenowe, gdzie głównie wykorzystuje się analizę sprzężeń. Analiza sprzężeń wymaga ustalenia modelu, zgodnie z którym badana cecha dziedziczy się, co dla cech ilościowych warunkowanych wielogenowo, takich jak BMD, jest praktycznie niemożliwe. Poza tym pojedynczy gen ma tylko częściowy wpływ na zmienności cechy, dlatego wykazanie sprzężenia ze wskaźnikiem LOD większym niż 3, istotnego ze statystycznego punktu widzenia, wymaga badań obejmujących bardzo dużą liczbę rodzin. Dlatego w poszukiwaniu genów wpływających na cechy ilościowe częściej wykorzystywane są dwie inne metody: analiza wspólnych alleli spokrewnionych chorych (ang. *allele-sharing method*) lub analiza asocjacji. Pierwsza z metod dotyczy najczęściej rodzeństwa. Istota analizy polega na tym, że w badaniu obejmującym dużą liczbę par rodzeństwa dotkniętego chorobą w locus markera leżącego w obrębie lub w sąsiedztwie genu wpływającego na badaną cechę częściej występuje ten sam allel u poszczególnych par rodzeństwa, niż wynika to z praw Mendla. Dzięki temu można określić obszar chromosomu, w którym znajduje się poszukiwany gen, oczywiście analizę można także przeprowadzić dla polimorfizmu podejrzanego o bezpośredni wpływ na chorobę. Druga metoda, analiza asocjacji, porównuje częstość poszczególnych alleli dla markerów polimorficznych między grupą nie spokrewnionych chorych a grupą kontrolną. Istotnie częstsze występowanie danego allelu w grupie chorych można stwierdzić, gdy wpływa on bezpośrednio na rozwój choroby lub gdy któryś z alleli markera polimorficznego jest w nierównowadze sprzężeń z położonym w niewielkiej odległości (zwykle do 1cM) właściwym allelem sprzyjającym rozwojowi choroby. Ze względu na olbrzymią liczbę polimorfizmów, które trzeba by zbadać przy prze-

szukiwaniu całego genomu oraz trudności z uzyskaniem istotności statystycznej takich badań, analizę asocjacji przeprowadza się dla genów kandydatów to znaczy genów, dla których przypuszcza się (ze względu na funkcje ich produktów białkowych), że są zaangażowane w rozwój choroby. Niekorzystną cechą asocjacji jest to, że może być spowodowana niejednorodnością genetyczną populacji, a nie prawdziwym sąsiedztwem genu warunkującego chorobę. Można ten problem ominąć tworząc sztuczną grupę kontrolną przez badanie rodziców chorych. Genotyp kontrolny tworzony jest wtedy z alleli nie przekazanych choremu potomkowi. Dzięki temu nie ma ryzyka wystąpienia fałszywych asocjacji spowodowanych niejednorodnością populacyjną. Jednak dla takich chorób, jak osteoporoza, które rozwijają się w późniejszym okresie życia zwykle nie ma możliwości badania rodziców chorej osoby. Wyniki niedawnych badań [11] wskazują, że możliwe będzie szukanie genów związanych z rozwojem osteoporozy dla bardzo młodych grup, a więc można będzie zastosować wyżej wymienioną metodę. Szerokie omówienie strategii poszukiwania genów chorób uwarunkowanych genetycznie, ale nie dziedziczących się zgodnie z prawami Mendla jest przedmiotem artykułu Landera i Schorka [37].

RECEPTOR WITAMINY D

Gen receptora witaminy D (ang. *vitamin D receptor gene – VDR gene*) jest pierwszym genem kandydującym badanym pod względem asocjacji z osteoporozą. Witamina D₃, a dokładnie jej aktywna pochodna, tj. 1,25-dihydroksycholekalcyferol (kalcytriol) jest hormonem sekosteroidowym wpływającym głównie na wchłanianie wapnia w jelicie, jego resorpcję w kanalikach nerkowych oraz uwalnianie z kości. Receptor witaminy D₃ jest, jak wszystkie receptory hormonów steroidowych, receptorem jądrowym. Po połączeniu się z aktywnym metabolitem witaminy D₃ bezpośrednio oddziałuje z sekwencjami HRE (ang. *hormone responsive element*), regulując w ten sposób ekspresję różnych genów, w tym przypadku głównie białek wiążących wapń. Receptor witaminy D jest obecny przede wszystkim w komórkach nabłonka jelit, nerek, osteoblastach, a także w wielu innych tkankach. Mutacje powodujące całkowitą utratę funkcji tego receptora prowadzą do krzywicy witamino-D-opornej, co jest związane z niewłaściwą mineralizacją kości przy prawidłowo wykształconej macierzy białkowej. W poszukiwaniu wpływu genu *VDR* na rozwój osteoporozy analizowano dotąd pięć różnych polimorfizmów RFLP położonych w jego obrębie. Tylko jeden z nich, polimorfizm związany z miejscem restrykcyjnym dla restryktazy FokI, powoduje istotną zmianę produktu białkowego wpływając na miejsce startu translacji (rys. 1). W drugim eksonie genu *VDR* znajdują się dwa potencjalne miejsca inicjacji translacji oddalone od siebie o trzy kodony. Tranzycja T>C w pierwszym kodonie ATG „wyłącza” ten kodon i translacja rozpoczyna



RYSUNEK 1 Polimorfizm FokI genu *VDR*. Substytucja 2T>C powoduje przesunięcie miejsca startu translacji i skrócenie produktu białkowego o 3 aminokwasy

się od drugiego ATG, przez co produkt białkowy jest krótszy o trzy aminokwasy [19]. Enzym restrykcyjny FokI rozpoznaje obecność T w pierwszym kodonie Start jako właściwe miejsce restrykcyjne (oznaczone w literaturze jako allele f), natomiast obecność nukleotydu C sprawia, że miejsce to nie jest rozpoznawane i hydrolizowane (allele F). Pozostałe cztery polimorfizmy nie mają wpływu na sekwencję aminokwasów w białku receptora. Trzy z nich, rozpoznawane przez enzymy BsmI, ApaI i EcoRV, zlokalizowane są w intronie 8, a jeden – rozpoznawany przez restryktazę TaqI w eksonie 9.

Pierwsze badania obejmujące grupę 91 mieszkańców Australii pochodzenia europejskiego wykazały dużą asocjację poziomu osteokalcyny – białka macierzy kostnej, którego ekspresja jest regulowana przez witaminę D, z allelami dla trzech miejsc polimorficznych: Bsm I, Apa I i EcoR V [48]. Osoby z genotypami BB, AA i EE (dużymi literami oznaczono brak miejsca restrykcyjnego) miały wyższe poziomy osteokalcyny we krwi w przeciwieństwie do osób z genotypami bb, aa i ee. Najbardziej istotna asocjacja widoczna była dla polimorfizmu Bsm I. Wszystkie trzy polimorfizmy wykazywały względem siebie nierównowagę sprzężeń i autorzy nie wykluczyli możliwości takiego sprzężenia z innymi zmianami polimorficznymi. Ta sama grupa badawcza opublikowała wyniki modyfikowanej analizy wspólnych alleli polimorfizmu Bsm I w grupie bliźniąt dwujajowych, które dodatkowo porównano z wynikami w grupie bliźniąt jednojajowych [46, 47]. Badano BMD odcinka lędźwiowego oraz szyjki kości udowej. Uzyskany wynik, pokazujący wyraźną asocjację badanego polimorfizmu z BMD dodatkowo potwierdzono badając grupę pomenopauzalnych kobiet z regionu Sydney. Zaobserwowano bardzo dużą asocjację genotypu bb z wyższym BMD. Sumaryczne wyniki pozwoliły autorom stwierdzić, że polimorfizm Bsm I jest skorelowany z ponad połową genetycznego uwarunkowania gęstości mineralnej kości. Poza wyżej przedstawionymi przeprowadzono jeszcze szereg innych badań, których celem było sprawdzenie stopnia asocjacji

polimorfizmów z obszaru 3' genu *VDR* z gęstością mineralną lub innymi czynnikami w różnych populacjach. Wyniki tych badań były rozbieżne: część potwierdzała asocjację [15, 70], część nie wykazywała żadnych zależności [12, 23, 28, 64, 67, 68], a jeszcze inne wykazywały asocjację z innymi niż u Morrisona allelami [27]. Tak rozbieżne wyniki mogą być spowodowane kilkoma czynnikami:

(I) Różnice żywieniowe w różnych populacjach, a szczególnie podaż wapnia lub witaminy D w pożywieniu lub różnice w innych czynnikach środowiskowych mogą wpływać na różną penetrację czynników genetycznych [5, 16].

(II) Jeżeli badane polimorfizmy nie wpływają bezpośrednio na rozwój osteoporozy, a wykazują jedynie nierównowagę sprzężeń z innym istotnym polimorfizmem genu *VDR* lub nawet z innym blisko położonym genem, to w różnych populacjach może występować nierównowaga sprzężeń z innym allelem takiego polimorfizmu lub brak takiego sprzężenia.

(III) Także niewielka liczebność badanych grup zmniejsza moc testów statystycznych, co może prowadzić do odrzucania jako nieistotnych niewielkich różnic.

Badano także polimorfizm FokI, który jako jedyny dla genu *VDR* wpływa na sekwencję białka. Badania wykonane na grupie 100 kobiet pomenopauzalnych pochodzenia meksykańskiego wykazały asocjację allelu f (produkt białkowy dłuższy o trzy aminokwasy) z niższą wartością BMD. Homozygoty ff miały o 12,8% niższe BMD odcinka lędźwiowego kręgosłupa niż homozygoty FF z heterozygotami mającymi pośrednie wartości BMD [19]. Zmniejszoną gęstość mineralną kości dla genotypu ff potwierdziły także badania premenopauzalnych kobiet populacji japońskiej [1] oraz amerykańskiej [25]. Jednak badania populacji europejskiej nie wykazały istotnej różnicy w BMD dla poszczególnych genotypów tego polimorfizmu [10]. Pomimo braku pełnej zgodności uzyskanych wyników wydaje się, że właśnie ten polimorfizm ma bezpośredni wpływ na rozwój osteoporozy tym bardziej, że badania funkcjonalności białka wykazały 1,7 razy wyższy poziom transkrypcji indukowanej przez krótszą formę receptora (allel F) [1].

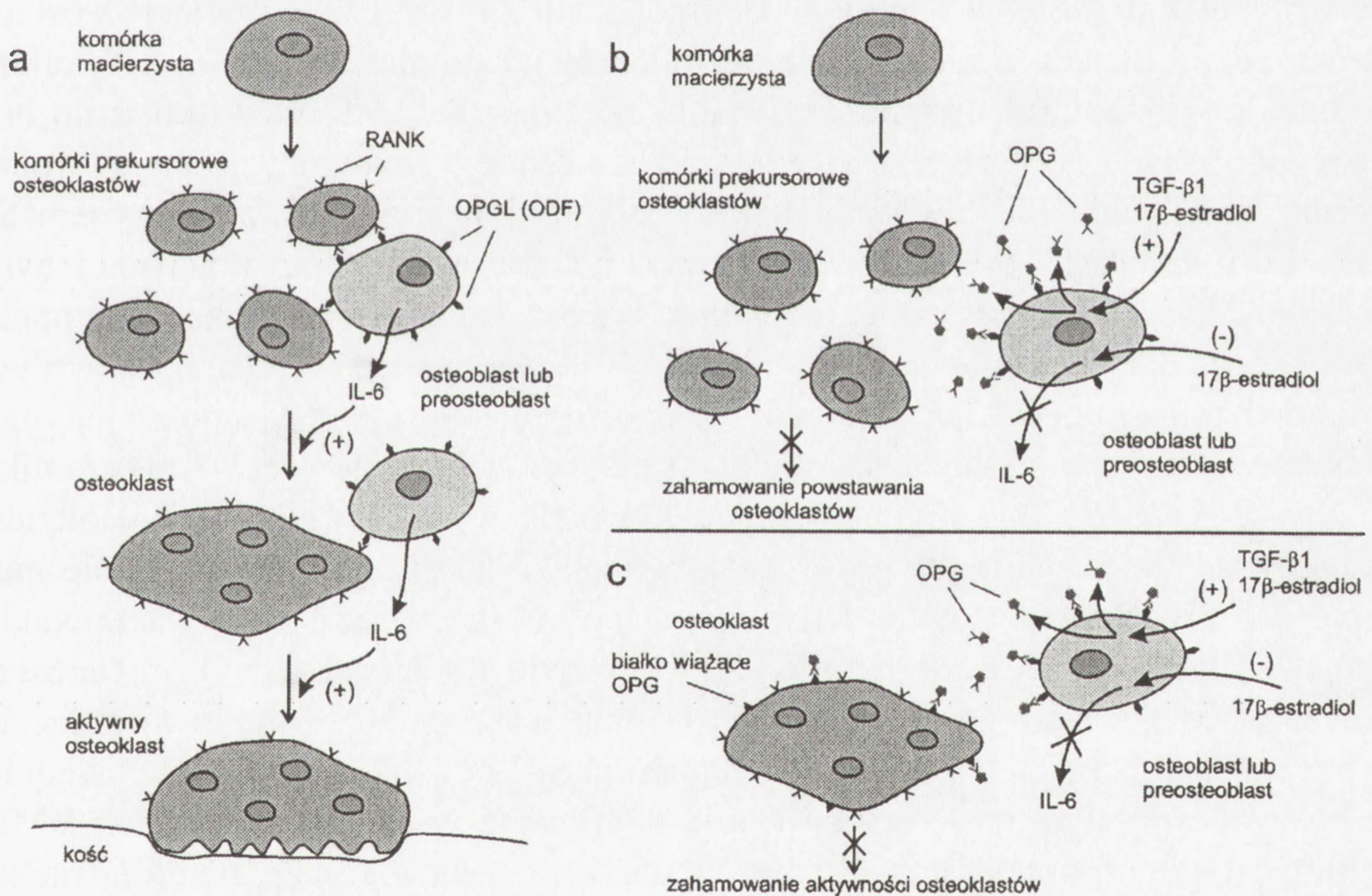
Podsumowując, z badań dotyczących genu *VDR* wynika, że polimorfizmy z jego końca 3' są raczej markerami, których przydatność w diagnostyce jest ograniczona tylko do niektórych populacji. Dlatego konieczne jest poszukiwanie zmian bezpośrednio wpływających na ekspresję genu lub aktywność produktu białkowego. Ciekawy jest polimorfizm miejsca restrykcyjnego Fok I, potrzeba jednak dalszych badań dla potwierdzenia jego wpływu.

RECEPTOR ESTROGENOWY

Estrogeny (głównie 17β -estradiol) są hormonami istotnymi dla metabolizmu tkanki kostnej. Po okresie menopauzy, gdy jajniki przestają wytwarzać 17β -estradiol, występuje zwiększona resorpcja tkanki kostnej. Wpływ estrogenów potwierdza zahamowanie utraty masy kostnej przy stosowaniu hormonalnej terapii zastępczej

(ang. *hormone replacement therapy* – HRT) po okresie menopauzy. Ochronny mechanizm działania estrogenów na tkankę kostną nie jest jeszcze dokładnie poznany i stanowi obecnie przedmiot intensywnych badań, których rezultaty wskazują, że w osteoblastach estrogeny indukują ekspresję osteoprotegeryny (OPG) oraz hamują ekspresję IL-6 (rys. 2). Osteoprotegeryna blokuje powstawanie i aktywność osteoklastów [26], a IL-6 ma działanie odwrotne [62].

W poszukiwaniu korelacji między osteoporozą a genem dla receptora estrogenów (ER) analizowano kilka różnych polimorfizmów. Najczęściej badanymi polimorfizmami były miejsca restrykcyjne dla enzymów Pvu II i Xba I zlokalizowane w intronie 1. Wyniki badań są niejednoznaczne. Część badań wykazała asocjację niektórych haplotypów tych polimorfizmów z BMD [36, 68], inne z kolei nie wykazały żadnych asocjacji [15, 22]. Sytuacja jest analogiczna jak dla polimorfizmów końca 3' enu *VDR*, gdzie również nie wpływały one na sekwencję białka, a rezultaty



RYSUNEK 2. Prawdopodobny mechanizm wpływu estrogenów i TGF- β 1 na zahamowanie rozwoju i aktywności osteoklastów [21, 26, 50, 62, 63]. (-) – symbolizuje oddziaływanie hamujące, (+) – symbolizuje oddziaływanie indukujące: a – sygnałem pobudzającym komórki prekursorowe do rozwoju jest ich interakcja z osteoblastem, która zachodzi za pośrednictwem białka OPGL (ODF) i swoistych dla niego receptorów RANK; aktywacja dojrzałych osteoklastów zachodzi w ten sam sposób; na schemacie przedstawiono interleukinę 6, która również wpływa na indukcję i aktywację osteoklastów, dokładny mechanizm jej działania nie jest jednak poznany; b – 17 β -estradiol i TGF- β 1 indukują ekspresję osteoprotegeryny (OPG), która łączy się z OPGL i uniemożliwia w ten sposób interakcję osteoblastów z komórkami prekursorowymi; 17 β -estradiol hamuje także ekspresję IL-6; c – OPG poza blokowaniem interakcji między komórkami, hamuje aktywność dojrzałych osteoklastów przez bezpośrednie związanie ze słabo dotychczas poznany białkiem o m.c. 140 kDa na ich powierzchni

badania były różne. Możliwe przyczyny takich niezgodności dla polimorfizmów genu ER są takie same, jak te przedstawione przy genie receptora witaminy D.

KOLAGEN I α 1

Gen kolagenu I α 1 (*COL1A1*) jest innym genem, dla którego stwierdzono asocjacje z osteoporozą. Obok dużej liczby różnych białek, takich jak: osteokalcyna, osteonektyna, osteoponina, biglikan itd., kolagen typu I jest podstawowym składnikiem macierzy kostnej stanowiąc ponad 90% jej białka [7]. Mutacje występujące w dwóch genach dla kolagenu typu I: *COL1A1* i *COL1A2*, powodujące niewłaściwą strukturę trójniciowej helisy kolagenu, są przyczyną wrodzonej łamliwości kości (*osteogenesis imperfecta*), która w zależności od mutacji ma różną postać i przebieg. Dlatego gdy odkryto polimorfizm G/T w intronie pierwszym *COL1A1*, w miejscu przyłączenia czynnika transkrypcyjnego Sp1, natychmiast rozpoczęto badania zmierzające do wyjaśnienia, czy któryś z alleli tego polimorfizmu nie wykazuje asocjacji z osteoporozą [17]. Pierwsze badania przeprowadzone na grupie 299 kobiet z Wielkiej Brytanii wykazały zmniejszenie BMD u heterozygot Ss (G/T) w stosunku do homozygot SS (G/G). Także porównanie rozkładu genotypów między grupą kontrolną a grupą ze złamaniami kręgow wykazało istotne różnice. Osoby z genotypem Ss i ss (T/T) stanowiły 54% pierwszej grupy, natomiast w grupie kontrolnej było ich tylko 27%. Wyniki pozwoliły oszacować ryzyko względne wystąpienia złamania u osób posiadających allel s na $\lambda_r = 2,97$ [17]. Mechanizm wyjaśniający wpływ polimorfizmu w miejscu Sp1 na rozwój osteoporozy nie jest znany. Wiadomo jedynie, że oligonukleotyd odpowiadający allelowi s ma wyższe powinowactwo do czynnika transkrypcyjnego Sp1 niż oligonukleotyd odpowiadający allelowi S [18]. W Holandii przeprowadzono badania dla grupy obejmującej 1778 osób kobiet po okresie menopauzy [65]. Wyniki potwierdziły wpływ polimorfizmu Sp1 na występowanie złamań. Jednak oszacowane ryzyko względne było mniejsze: $\lambda_r = 1,5$. Zaobserwowano także wpływ genotypu na BMD oraz masę ciała. Może to świadczyć, że przynajmniej częściowo polimorfizm miejsca Sp1 oddziałuje na BMD pośrednio przez swój wpływ na masę ciała. Wyniki tych badań wskazują na związek BMD z polimorfizmem, szczególnie u osób w starszym wieku, a więc sugerują raczej wpływ na szybkość utraty masy kostnej niż na uzyskaną szczytową masę kostną. Kilka innych prac potwierdziło asocjację allelu s polimorfizmu genu *COL1A1* z występowaniem złamań w innych populacjach [14, 39, 55, 66], ale nie zawsze widoczna była asocjacja z BMD, zwłaszcza przy uwzględnieniu masy ciała i wzrostu. Bardzo interesujące wyniki dało porównanie częstości allelu s z występowaniem złamań u kobiet w różnych populacjach [2]. Autorzy zaobserwowali wyraźny związek między tymi wartościami. Populacje afrykańska i azjatyckie [40], gdzie częstość allelu s jest bardzo mała, cechują się znacznie niższą liczbą złamań w porównaniu z populacjami europejskimi mającymi wyższą częstość allelu s. Po-

wyższe wyniki potwierdzają wpływ opisywanego polimorfizmu na występowanie złamań, mimo że nie zawsze był on istotnie skorelowany z gęstością mineralną kości. Dlatego nie można wykluczyć możliwości oddziaływania tego polimorfizmu na inne parametry związane z małą wytrzymałością kości.

TRANSFORMUJĄCY CZYNNIK WZROSTU (TGF- β 1)

Transformujący czynnik wzrostu β 1 (TGF- β 1) jest jednym z czynników regulujących m.in. procesy resorpcji i odbudowy tkanki kostnej. Badania *in vitro* wykazały, że czynnik ten hamuje podziały komórek progenitorowych osteoklastów, a także blokuje działanie dojrzałych osteoklastów (rys. 2); równocześnie TGF- β 1 pobudza proliferację preosteoblastów [3]. TGF- β 1 jest produkowany przez osteoblasty w nieaktywnej postaci i blokowany w nowo tworzonej przez nie strukturze tkanki kostnej. Późniejsze uwalnianie TGF- β 1 następuje podczas resorpcji macierzy kostnej przez osteoklasty, wtedy też następuje jego aktywacja przez niskie pH w obszarze resorpcji [51, 52].

W poszukiwaniu wpływu genu *TGF- β 1* na rozwój osteoporozy przeprowadzono analizę asocjacji dla kilku jego polimorfizmów [38, 69], z których jeden – tranzycja T>C w pozycji 29 – wydaje się być niezwykle obiecujący. Polimorfizm ten związany jest ze zmianą leucyny (allel T) w prolinę (allel C) w obszarze hydrofobowym sekwencji sygnałnej TGF- β 1 [69]. Badania dotyczyły 287 kobiet w wieku pomenopauzalnym z dwóch miast Japonii. Wykazano znacznie wyższą gęstość mineralną kości obszaru lędźwiowego kręgosłupa u kobiet z genotypem CC w porównaniu do genotypu TT i TC. Porównanie częstości występowania alleli między grupą kobiet chorych na osteoporozę a dobraną wiekowo grupą kobiet zdrowych pozwoliło na oszacowanie ilorazu szans wystąpienia osteoporozy dla osób mających allel T na poziomie od 3 do 33 w zależności od miasta, z którego pochodziły oraz tego, czy grupa chorych obejmowała również kobiety z osteopenią. Uzyskane wyniki dla tego polimorfizmu sugerują, że ma on duże znaczenie przy wykrywaniu podatności na osteoporozę. Zmiana dotyczy sekwencji sygnałnej i może wpływać na sekrecję tego białka, co potwierdzają analizy poziomu czynnika TGF- β 1 w osoczu [69]. Ciekawy jest jednak fakt, że rozwojowi choroby sprzyja allel T determinujący obecność leucyny, która wydaje się być „bardziej właściwa” w obszarze hydrofobowym sekwencji sygnałnej niż prolina determinowana przez allel C. Trzeba jednak podkreślić, że dla potwierdzenia tych obiecujących wyników konieczne będą badania tego polimorfizmu w innych populacjach oraz badania wpływu polimorfizmu na wydzielanie lub funkcję TGF- β 1.

INNE GENY

Gospodarka wapniowa organizmu oraz procesy resorpcji i odbudowy kości są regulowane przez wiele różnorodnych czynników białkowych i niebiałkowych, powiązanych skomplikowanymi wzajemnymi interakcjami utrzymującymi dynamiczny stan równowagi tkanki kostnej. Wszystkie geny tych czynników lub receptorów dla tych czynników są genami kandydatami, których mutacje lub polimorfizmy mogą mieć wpływ na rozwój osteoporozy. Nic więc dziwnego, że rozpoczęto badania populacyjne zmierzające do znalezienia zmian w sekwencji DNA genów związanych z osteoporozą lub przynajmniej będących markerami predyspozycji genetycznej do osteoporozy. Rozpoczęto badania genu receptora kalcytoniny, genu IL-6, genu IGF-I oraz genu antagonisty receptora IL-1 [32, 42, 49, 54]. Choć znaleziono asocjacje alleli różnych polimorfizmów z gęstością mineralną kości lub innymi wskaźnikami rozwoju osteoporozy, to ze względu na ich położenie poza obszarem kodującym, mają one małe szanse na stanie się dogodnym celem diagnostyki molekularnej. Niemniej sygnalizują istnienie zmian bezpośrednio wpływających na rozwój choroby. Istnieje więc potrzeba dalszych badań przesiewowych w poszukiwaniu takich polimorfizmów, po których badania ekspresji lub aktywności białka potwierdzą ich rzeczywisty wpływ, a badania asocjacji zweryfikują ich wpływ na rozwój osteoporozy. W tabeli 1 przedstawiono najlepiej zbadane polimorfizmy opisanych w poprzednich rozdziałach genów kandydujących.

TABELA 1. Polimorfizm genów analizowanych w aspekcie asocjacji z osteoporozą

Gen kandydujący	Polimorfizm	Charakter zmiany
<i>VDR</i>	TaqI	zmiana w eksonie 9 – brak wpływu na sekwencję produktu białkowego
	Apal	zmiana w intronie 8 – brak wpływu na sekwencję produktu białkowego
	BsmI	jw.
	EcoRV	jw.
	FokI	tranzycja T>C w pierwszym kodonie – produkt białkowy krótszy o trzy aminokwasy
<i>ER</i>	PvuII	zmiana w intronie 1 – brak wpływu na sekwencję produktu białkowego
	XbaI	jw.
<i>COL1A1</i>	polimorfizm miejsca Sp1	transwersja G>T w intronie 1 – brak wpływu na sekwencję produktu białkowego
<i>TGFβ1</i>	polimorfizm 29 T>C	zamiana leucyny w prolinę w obszarze hydrofobowym sekwencji sygnałnej

PODSUMOWANIE

Poznanie genów, których polimorfizmy i mutacje sprzyjają rozwojowi osteoporozy, jest pierwszym krokiem w opracowaniu skutecznej i pewnej metody diagnostycznej. W chorobach wielogenowych metoda taka powinna być oparta na badaniu polimorfizmów bezpośrednio wpływających na rozwój choroby, których dany allel ma jednoznacznie korzystny lub niekorzystny wpływ, a interpretacja jest jednakowa lub zbliżona w różnych populacjach. Ponieważ w chorobie wielogenowej wpływ pojedynczego polimorfizmu jest na ogół mały, konieczne jest badanie wielu polimorfizmów w różnych genach jednocześnie, co zwiększy pewność w oszacowaniu ryzyka i pozwoli na skuteczną prewencję u osób o genotypie najbardziej podatnym na rozwój osteoporozy. Poza tym, chorobie u różnych osób mogą sprzyjać zmiany w różnych genach, a więc podłoże molekularne predysponujące do jej powstania może być inne. Znajomość genotypu danej osoby pozwoli na zastosowanie odpowiednio dobranej do predyspozycji genetycznych i dlatego najskuteczniejszej profilaktyki lub terapii. Szybkie tempo rozwoju technik molekularnych, którego jesteśmy świadkami, pozwala sądzić, że w przyszłości diagnostyka molekularna będzie tańsza i szybsza, przez co stanie się możliwe diagnozowanie także chorób wielogenowych. Aby to jednak było możliwe konieczne jest poznanie genów oraz ich polimorfizmów lub mutacji, które sprzyjają rozwojowi danej choroby. Prace badawcze nad genetycznym uwarunkowaniem osteoporozy są najlepszym przykładem realizacji tego celu.

LITERATURA

- [1] ARAI H, MIYAMOTO K, TAKETANI Y, YAMAMOTO H, IEMORI Y, MORITA K, TONAI T, NISHISHO T, MORI S, TAKEDA E. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: Effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res* 1997; **12**: 915–921.
- [2] BEAVAN S, PRENTICE A, DIBBA B, YAN L, COOPER C, RALSTON SH. Polymorphism of the collagen type II gene and ethnic differences in hip-fracture rates. *N Engl J Med* 1998; **339**: 351–352.
- [3] BONEWALD LF, MUNDY GR. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop* 1990; **250**: 261–276.
- [4] CHRISTIAN JC, YU P, SLEMENDA CW, JOHNSTON JR. CC. Heritability of bone mass: a longitudinal study in aging male twins. *Am J Hum Genet* 1989; **44**: 429–433.
- [5] DAWSON-HUGHES B, HARRIS SS, FINNERAN S. Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to vitamin D receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 3657–3661.
- [6] DEQUEKER J, NIJS J, VERSTRAETEN A, GEUSENS P, GEVERS G. Genetic determinants of bone mineral content at the spine and radius: a twin study. *Bone* 1987; **8**: 207–209.
- [7] ERIKSEN EF, KASSEM M. The cellular basis of bone remodeling. *Trinagle* 1992; **31** 2/3: 45–57.
- [8] ETTINGER B, SIDNEY S, CUMMINGS SR, LIBANATI C, BIKLE DD, TEKAWA IS, TOLAN K, STEIGER P. Racial differences in bone density between young adult black and

- white subjects persist after adjustment for anthropometric, life style, and biochemical differences. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 429–434.
- [9] EVANS RA, MAREL GM, LANCASTER EK, KOS S, EVANS M, WONG SY. Bone mass is low in relatives of osteoporotic patients. *Ann Intern Med* 1988; **109**: 870–873.
- [10] FERRARI S, RIZZOLI R, MANEN D, SLOSMAN D, BONJOUR J-P. Vitamin D receptor gene start codon polymorphisms (FokI) and bone mineral density: Interaction with age, dietary calcium, and 3'-end region polymorphisms. *J Bone Miner Res* 1998; **13**: 925–930.
- [11] FERRARI S, RIZZOLI R, SLOSMAN D, BONJOUR JP. Familial resemblance for bone mineral mass is expressed before puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 358–361.
- [12] FRANCIS RM, HARRINGTON F, TURNER E, PAPIHA SS, DATTA HK. Vitamin D receptor gene polymorphism in men and its effect on bone density and calcium absorption. *Clin Endocrinol* 1997; **46**: 83–86.
- [13] GARNERO P, ARDEN NK, GRIFFITHS G, DELMAS PD, SPECTOR TD. Genetic influence on bone turnover in postmenopausal twins. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 140–146.
- [14] GARNERO P, BOREL O, GRANT SF, RALSTON SH, DELMAS PD. Collagen Ialpha1 Sp1 polymorphism, bone mass, and bone turnover in healthy French premenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 1998; **13**: 813–817.
- [15] GENNARI L, BECHERINI L, MASI L, MANSANI R, GONNELLI S, CEPOLLARO C, MARTINI S, MONTAGNANI A, LENTINI G, BECORPI AM, BRANDI ML. Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 939–944.
- [16] GRAAFMANS WC, LIPS P, OOMS ME, VAN LEEUWEN JPTM, POLS HAP, UITTERLINDEN AG. The effect of vitamin D supplementation on the bone mineral density of the femoral neck is associated with vitamin D receptor genotype. *J Bone Miner Res* 1997; **12**: 1241–1245.
- [17] GRANT SFA, REID DM, BLAKE G, HERD R, FOGELMAN I, RALSTON SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I α 1 gene. *Nat Genet* 1996; **14**: 203–205.
- [18] GRANT SFA. Studies on the genetic susceptibility to osteoporosis: analysis of cis-acting sequences in the collagen I α 1 gene. (Ph.D. thesis. Aberdeen, Scotland: University of Aberdeen, 1996).
- [19] GROSS C, ECCLESHALL TR, MALLOY PJ, VILLA ML, MARCUS R, FELDMAN D. The presence of polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 1996; **11**: 1850–1855.
- [20] GUEGUEN R, JOUANNY P, GUILLEMIN F, KUNTZ C, POUREL J, SIEST G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *J Bone Miner Res* 1995; **10**: 2017–2022.
- [21] HAKEDA Y, KOBAYASHI Y, YAMAGHUCHI K, YASUDA H, TSUDA E, HIGASHIO K, MIYATA T, KUMEGAWA M. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **251**: 796–801.
- [22] HAN KO, MOON IG, KANG YS, CHUNG HY, MIN HK, HAN IK. Nonassociation of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and estrogen responsiveness to hormone replacement therapy in Korean postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 991–995.
- [23] HANSEN TS, ABRAHAMSEN B, HENRIKSEN FL, HERMANN AP, JENSEN LB, HORDER M, GRAM J. Vitamin D receptor alleles do not predict bone mineral density or bone loss in Danish perimenopausal women. *Bone* 1998; **22**: 571–575.
- [24] HARRIS SS, DAWSON-HUGHES B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1994; **60**: 573–578.

- [25] HARRIS SS, ECCLESHALL TR, GROSS C, DAWSON-HUGHES B, FELDMAN D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res* 1997; **12**: 1043–1048.
- [26] HOFBAUER LC, KHOSLA S, DUNSTAN CR, LACEY DL, SPELSBERG TC, RIGGS BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999; **140**: 4367–4370.
- [27] HOUSTON LA, GRANT SFA, REID DM, RALSTON SH. Vitamin D receptor polymorphism, bone mineral density, and osteoporotic vertebral fracture: studies in a UK population. *Bone* 1996; **18**: 249–252.
- [28] HUSTMYER FG, PEACOCK M, HUI S, JOHNSTON CC, CHRISTIAN J. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J Clin Invest* 1994; **94**: 2130–2134.
- [29] KAHN SA, PACE JE, COX ML, GAU DW, COX SA, HODKINSON HM. Osteoporosis and genetic influence: a three-generation study. *Postgrad Med J* 1994; **70**: 798–800.
- [30] KANIS JA, MELTON LJ, CHRISTIANSEN C, JOHNSTON CC, KHALTAEV N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994; **9**: 1137–1141.
- [31] KAREN M, PRESTWOOD MD, CAROL C, PILBEAM MD, LAWRENCE G, RAISZ MD. Treatment of osteoporosis. *Annu Rev Med* 1995; **46**: 249–256.
- [32] KEEN RW, WOODFORD-RICHENS KL, LANCHBURY JS, SPECTOR TD. Allelic variation at the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with early postmenopausal bone loss at the spine. *Bone* 1998; **23**: 367–371.
- [33] KELLER ET, ZHANG J, ERSHLER WB. Ethanol activates the interleukin-6 promoter in a human bone marrow stromal cell line. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1997; **52**: 311–317.
- [34] KELLY PJ, NGUYEN T, HOPPER J, POCOCK N, SAMBROOK P, EISMAN J. Changes in axial bone density with age: a twin study. *J Bone Miner Res* 1993; **8**: 11–17.
- [35] KIEL DP, ZHANG Y, HANNAN MT, ANDERSON JJ, BARON JA, FELSON DT. The effect of smoking at different life stages on bone mineral density in elderly men and women. *Osteoporos Int* 1996; **6**: 240–248.
- [36] KOBAYASHI S, INOUE S, HOSOI T, OUCHI Y, SHIRAKI M, ORIMO H. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res* 1996; **11**: 306–311.
- [37] LANDER ES I SCHORK NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; **265**: 2037–2048.
- [38] LANGDAHL BL, KNUDSEN JY, JENSEN HK, GREGERSEN N, ERIKSEN EF. A sequence variation: 713-8delC in the transforming growth factor-beta 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women. *Bone* 1997; **20**: 289–294.
- [39] LANGDAHL BL, RALSTON SH, GRANT SF, ERIKSEN EF. An Sp1 binding site polymorphism in the COL1A1 gene predicts osteoporotic fractures in both men and women. *J Bone Miner Res* 1998; **13**: 1384–1389.
- [40] LIM S, LI SZ, WON YJ, SHIN W, LEE HC, HUH KB. Lack of association between a polymorphic Sp1 binding site in collagen type I alpha 1 gene and osteoporosis in Korean. *J Bone Miner Res* 1997; **12**: Suppl 1: S491.
- [41] MARCUS R. The nature of osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **64**: 209–214.
- [42] MASIL, BECHERINI L, COLLIE, GENNARIL, MANSANIR, FALCHETTI A, BECORPI AM, CEPOLLARO C, GONNELLI S, TANINI A, BRANDI ML. Polymorphisms of the calcitonin receptor gene are associated with bone mineral density in postmenopausal Italian women. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **248**: 190–195.
- [43] MAY H, MURPHY S, KHAW KT. Alcohol consumption and bone mineral density in older men. *Gerontology* 1995; **41**: 152–158.

- [44] MCKAY HA, BAILEY DA, WILKINSON AA, HOUSTON CS. Familial comparison of bone mineral density at the proximal femur and lumbar spine. *Bone Miner* 1994; **24**: 95–107.
- [45] MEIR DE, ORWOLL ES, JONES JM. Marked disparity between trabecular and cortical bone loss with age in healthy men: measurement by vertebral computed tomography and radial photon absorptiometry. *Ann Int Med* 1984; **101**: 605–612.
- [46] MORRISON NL, QI JC, TOKITA A, KELLY PJ, CROFTS L, NGUYEN TV, SAMBROOK PN, EISMAN JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; **367**: 284–287.
- [47] MORRISON NL, QI JC, TOKITA A, KELLY PJ, CROFTS L, NGUYEN TV, SAMBROOK PN, EISMAN JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles (correction). *Nature* 1997; **387**: 106.
- [48] MORRISON NL, YEOMAN R, KELLY PJ, EISMAN JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci* 1992; **89**: 6665–6669.
- [49] MURRAY RE, MCGUIGAN F, GRANT SFA, REID DM, RALSTON SH. Polymorphism of the interleukin-6 gene are associated with bone mineral density. *Bone* 1997; **21**: 89–92.
- [50] NAKAGAWA N, KINOSAKI M, YAMAGUCHI K, SHIMA N, YASUDA H, YANO K, MORINAGA T, HIGASHIO K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **253**: 395–400.
- [51] OREFFO ROC, MUNDY GR, SEYEDIN SM, BONEWALD LF. Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **158**: 817–823.
- [52] OURSLER MJ. Osteoclast synthesis and secretion and activation of latent transforming growth factor β . *J Bone Miner Res* 1994; **9**: 443–452.
- [53] POCOCK NA, EISMAN JA, HOPPER JL, YEATES MG, SAMBROOK PN, EBERI S. Genetic determinants of bone mass in adults (A twin study). *J Clin Invest* 1987; **80**: 706–710.
- [54] ROSEN CJ, KURLAND ES, VERAULT D, ADLER RA, RACKOFF PJ, CRAIG WY, WITTE S, ROGERS J, BILEZIKIAN JP. Association between serum insulin growth factor-I (IGF-I) and a simple sequence repeat in IGF-I gene: Implications for genetic studies of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 2286–2290.
- [55] ROUX C, DOUGADOS M, ABEL L, MERCIER G, LUCOTTE G. Association of a polymorphism in the collagen I 1 gene with osteoporosis in French women. *Arthritis Rheum* 1998; **41**: 187–188.
- [56] RUTHERFORD OM. Spine and total body bone mineral density in amenorrheic endurance athletes. *J Appl Physiol* 1993; **74**: 2904–2908.
- [57] SAMSIOE G. Osteoporosis – un update. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; **76**: 189–199.
- [58] SEEMAN E, HOPPER JL. Genetic and environmental components of the population variance in bone density. *Osteoporos Int* 1997; **7**: Suppl 3: S10–16.
- [59] SEEMAN E, TSALAMANDRIS C, FORMICA C, HOPPER JL, MCKAY J. Reduced femoral neck bone density in the daughters of women with hip fractures: the role of low peak bone density in the pathogenesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994; **9**: 739–743.
- [60] SLEMENDA CW, CHRISTIAN JC, WILLIAMS CJ, NORTON JA, JOHNSTON JR. CC. Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner Res* 1991; **6**: 561–567.
- [61] SOWERS M, CORTON G, SHAPIRO B, JANNAUSCH ML, CRUTCHFIELD M, SMITH ML, RANDOLPH JF, HOLLIS B. Changes in bone density with lactation. *J Am Med Assoc* 1993; **269**: 3130–3135.
- [62] SUN WH, KELLER ET, STEBLER BS, ERSHLER WB. Estrogen inhibits phorbol ester-induced I κ B α transcription and protein degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **244**: 691–695.

- [63] TAKAI H, KANEMATSU M, YANO K, TSUDA E, HIGASHIO K, IKEDA K, WATANABE K, YAMADA Y. *J Biol Chem* 1998; **273**: 27091–27096.
- [64] TSAI KS, HSU SHJ, CHENG WC, CHEN CK, CHIENG PU, PAN WH. Bone mineral density and bone markers in relation to vitamin D receptor gene polymorphism in Chinese men and women. *Bone* 1996; **19**: 513–518.
- [65] UITTERLINDEN AG, BURGER H, HUANG Q, YUE F, MCGUIGAN FEA, GRANT SFA, HOFMAN A, VAN LEEUWEN JPTM, POLS HAP, RALSTON SH. Relation of alleles of the collagen type I α 1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1016–1021.
- [66] UITTERLINDEN AG, GRANT SFA, HUANG Q, BURGER H, VAN LEEUWEN JPT, POLS HAP et al. Sp1 binding site polymorphism in the COL1A1 gene is associated with BMD. *Osteoporosis Int* 1996; **6**: 124.
- [67] VANDEVYVER C, WYLIN T, CASSIMAN JJ, RAUS J, GEUSENS P. Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 1997; **12**: 241–247.
- [68] WILLING M, SOWERS M, ARON D, CLARK MK, BURNS T, BUNTEN C, CRUTCHFIELD M, D'AGOSTINO D, JANNAUSCH M. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *J Bone Miner Res* 1998; **13**: 695–705.
- [69] YAMADA Y, MIYAUCHI A, GOTO J, TAKAGI Y, OKUIZUMI H, KANEMATSU M, HASE M, TAKAI H, HARADA A, IKEDA K. Association of a polymorphism of the transforming growth factor- β 1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 1998; **13**: 1569–1576.
- [70] YANAGI H, TOMURA S, KAWANAMI K, HOSOKAWA M, TANAKA M, KOBAYASHI K, TSUCHIYA S, AMAGAI H, HAYASHI K, HAMAGUCHI H. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with osteoporosis in Japanese women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 4179–4180.

Adres autora: ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań,
e-mail: slomski@au.poznan.pl

ZASTOSOWANIE BADAŃ HYBRYDYZACYJNYCH W DIAGNOSTYCE MOLEKULARNEJ

APPLICATION OF HYBRIDIZATION ANALYSIS IN MOLECULAR DIAGNOSTICS

Barbara SIEMIENIAKO¹, Jolanta KWIATKOWSKA², Marta KACZMAREK²,
Ryszard SŁOMSKI^{1,2,3}

¹Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego,
Poznań, ²Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań, ³Laboratorium Genetyki
Molekularnej, Poznań

Streszczenie: Diagnostyka molekularna została wykonana po raz pierwszy przez hybrydyzację badanego DNA z sondami molekularnymi. W latach osiemdziesiątych stanowiła podstawową metodę badań w diagnostyce chorób genetycznie uwarunkowanych. Znalazła również praktyczne zastosowanie w badaniach poznawczych dotyczących uorganizowania genomów. Stopniowo wiele badań hybrydyzacyjnych zostało zastąpionych techniką PCR, umożliwiającą uzyskanie wyniku w krótszym czasie i przy znacznym obniżeniu kosztów. Badania hybrydyzacyjne przebiegają bez amplifikacji DNA *in vitro* i nadal znajdują zastosowanie w badaniach dotyczących człowieka, zwierząt i roślin. W pracy przedstawiono przykłady praktycznego zastosowania hybrydyzacji w różnych dziedzinach.

Słowa kluczowe: DNA, hybrydyzacja, powtórzenia DNA, diagnostyka molekularna, wykrywanie patogenów, mutacje, polimorfizm.

Summary: Molecular diagnostics was performed for the first time on the basis of hybridization of examined DNA with molecular probes. In eighties hybridization was the most commonly used procedure in diagnostics of inherited diseases. Hybridization found practical application in studies of genomes organization. With time many analyses based on hybridization have been replaced by PCR technique, which shortened time of analysis and reduced costs. Hybridization analyses are performed without amplification of DNA *in vitro* and are used in studies related to humans, animals and plants. In this paper examples of practical application of hybridization analysis are presented.

Key words: DNA, hybridization, DNA repeats, molecular diagnostics, pathogen detection, mutation, polymorphism.

Wykrycie enzymów restrykcyjnych i opracowanie technik rekombinacji DNA z wykorzystaniem wektorów spowodowało lawinowy postęp w biologii molekularnej i dało początek inżynierii genetycznej. Wprowadzono szereg nowych technik badawczych, takich jak: klonowanie, sekwencjonowanie, transfer Southerna, znakowanie i detekcja DNA, PCR oraz synteza oligonukleotydów. Opracowano biblioteki genów i banki DNA, z których bez przeszkód można przygotowywać rekombinanty w ilości wystarczającej do prac biochemicznych i genetycznych. Wraz z rozwojem technik molekularnych pojawiła się potrzeba praktycznego zastosowania inżynierii genetycznej w różnych dziedzinach nauk biologicznych, przemyśle korzystającym z osiągnięć biotechnologii, medycynie i hodowli. Jednym z głównych nurtów badań z tego zakresu, w obrębie medycyny jest wykorzystanie sond molekularnych do rozpoznawania chorób, a w obrębie medycyny weterynaryjnej do rozpoznawania chorób zakaźnych.

Przed wprowadzeniem badań molekularnych diagnostyka chorób genetycznych opierała się na badaniach cytogenetycznych, a w przypadku chorób metabolicznych polegała głównie na oznaczaniu aktywności enzymów, których niedobór warunkował te choroby. Obecnie diagnostyka molekularna obejmuje poza genetyką człowieka, immunologię, onkologię, choroby krążenia, medycynę sądową, a także hodowlę zwierząt i roślin. Analizy wykonywane są głównie przy wykorzystaniu metody hybrydyzacji kwasów nukleinowych i amplifikacji DNA w reakcji PCR. Wiele testów diagnostycznych opartych jest na PCR z jednoczesną weryfikacją wyniku przez hybrydyzację z sondą molekularną. Ogromny postęp, który doprowadził do zwiększenia czułości i skrócenia czasu hybrydyzacji oraz wprowadzenia nieradioaktywnych metod znakowania sond, sprawił, że takie testy stały się bardzo atrakcyjnym narzędziem w diagnostyce molekularnej.

Istotą hybrydyzacji jest wzajemne oddziaływanie między cząsteczką badanego kwasu nukleinowego a cząsteczką sondy molekularnej, które prowadzi do utworzenia hybrydu (dupleksu). Tworzenie hybrydu poprzedza zjawisko denaturacji pod wpływem zasad lub ogrzewania, a następnie renaturacji. Łączenie się z sondą w odpowiednich warunkach jest wysoce specyficzne. Badany DNA lub RNA jest zwykle unieruchamiany na filtrach nylonowych lub nitrocelulozowych, a następnie identyfikowany za pomocą sondy molekularnej. Sonda jest cząsteczką o silnym powinowactwie do ściśle określonej cząsteczki badanej, mającą radioaktywny bądź nieradioaktywny znacznik umożliwiający jej wykrywanie po zakończeniu reakcji. W zależności od potrzeb, stosowane są krótkie (20–150 pz) lub długie polinukleotydy komplementarne do unikalnej sekwencji badanego DNA lub RNA. Mogą to być syntetyczne oligomery, syntetyczne bądź naturalne geny lub ich fragmenty, cDNA, fragmenty chromosomów, sondę mogą też stanowić małe genomy. W ostatnich latach coraz częściej w diagnostyce bakteriologicznej stosuje się sondy będące odcinkami DNA komplementarnymi do unikatowych sekwencji rybosomalnego RNA (rRNA). Czułość reakcji w dużym stopniu zależy od metody wyznakowania sondy.

Schemat postępowania jest podobny, niezależnie od technicznego wariantu hybrydyzacji i obejmuje etap immobilizacji zdenaturowanego DNA lub RNA na nośniku, inkubację w roztworze sondy, odpłukanie nie związanej sondy oraz wykrywanie hybrydów metodami określonymi przez wyznacznik wprowadzony do sondy np. przez autoradiografię. Powszechnie stosowane metody hybrydyzacyjne różnią się od siebie przede wszystkim technicznie i obejmują w zależności od potrzeb: hybrydyzację w roztworach (głównie w badaniach nad strukturą genomu), hybrydyzację na nośniku stałym (hybrydyzacja z replikami kolonii bakteryjnych i fagowych, metoda Southerna, metoda Northern, hybrydyzacja punktowa, *DNA-fingerprinting*) oraz hybrydyzację *in situ*.

HISTORIA BADAŃ HYBRYDYZACYJNYCH

Obecnie bardzo wiele projektów badawczych z zakresu genetyki i biotechnologii stosuje metodę Southerna, metodę Northern, sondy cDNA i pokrewne techniki, które polegają na tworzeniu podwójnieniowych struktur zbudowanych z DNA i RNA. Interesujące wydaje się nie tylko spojrzenie na obecny stan wiedzy w tym zakresie, lecz również na przesłanki, które doprowadziły do szerokiego zastosowania badań hybrydyzacyjnych w diagnostyce w drugiej połowie lat siedemdziesiątych. Po raz pierwszy hybrydy między DNA i RNA (DNA:RNA) uzyskano w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu w Illinois w Urbanie w laboratorium Spiegelmana [13]. Możliwość tworzenia takich struktur między syntetycznymi polinukleotydami a polidezoksynukleotydami wykazał jako pierwszy w 1960 roku Rich z Instytutu Technologii Massachusetts w Cambridge [45]. Powodem rozpoczęcia prac w zakresie formowania hybrydów DNA:RNA była potrzeba udowodnienia, że bakterie *E. coli* zainfekowane fagiem T2 zawierały informacyjny RNA, którego sekwencja ściśle odpowiadała sekwencji DNA faga T2. Występowanie takiego RNA przewidzieli w tym samym czasie Jacob i Monod z Instytutu Pasteura w Paryżu, nazywając go *messenger RNA* [14]. Kolejnym wielkim uczonym, który przyczynił się do ogromnego postępu w badaniach hybrydów RNA i DNA, jest Crick, który określił jako Centralny Dogmat przekazywanie informacji genetycznej do białek od kwasów nukleinowych [8]. Podczas gdy jedna grupa uczonych brała udział w badaniach funkcji kwasów nukleinowych, druga grupa zajmowała się biologicznymi i fizyko-chemicznymi właściwościami DNA. Bardzo ważne okazały się wcześniejsze obserwacje Kurnicka, który zaobserwował, że ogrzewanie podwyższa absorpcję światła UV przez roztwór DNA [20]. Obecnie wiemy, że za zjawisko to odpowiedzialne było rozłączanie łańcuchów DNA. Ogrzewanie prowadziło również do zaniku aktywności biologicznej bakteriofagów mierzonej ich zdolnością do transformacji bakterii. Zamenoff zaobserwował, że temperatura, w której zaczyna

obniżyć się aktywność biologiczna, ściśle koresponduje z temperaturą, w której zaczyna obniżyć się lepkość DNA [60]. Denaturacja DNA przez ogrzewanie była aktywnie badana przez Doty'ego i Marmura z Uniwersytetu Harvarda, którzy w 1959 roku ustalili, że temperatura denaturacji DNA zależy od składu nukleotydowego [37]. Bardzo ciekawe były również badania nad DNA z *Pneumococcus*, w których po powolnym oziębianiu rozdzielonych łańcuchów DNA uzyskiwano zarówno zdolność do transformacji, jak również natywną strukturę, co potwierdziło obniżenie absorpcji przy 260 nm, pomiar gęstości w gradiencie chlorku cezu, mikroskopia elektronowa i ocena właściwości hydrodynamicznych [30].

Jak już zaznaczono wstępnie, pierwsze hybrydy DNA:RNA między naturalnie występującymi kwasami nukleinowymi uzyskane zostały przez Spiegelmana i Halla. Autorzy ci założyli, że jeśli RNA faga T2 ma identyczną strukturę pierwszorzędową co jedna z nici DNA tego faga, to obydwie cząsteczki muszą być komplementarne. Zmodyfikowali oni doświadczenia wykonane przez Doty'ego i Marmura w tym sensie, że w renaturacji użyli radioaktywnej RNA. Eksperyment był stosunkowo prosty – T2-RNA znakowany ^{32}P zmieszano w probówce ze zdenaturowanym przez ogrzanie, znakowanym ^3H -T2-DNA, w buforze zawierającym 0,3-molowy chlorek sodu i inkubowano w łaźni wodnej w temp. 65°C . Z kolei temperaturę obniżano do temperatury pokojowej w ciągu trzydziestu godzin. W tym czasie RNA utworzył struktury dwuniciowe z niektórymi pojedynczoniciowymi DNA. Hybrydy RNA:DNA rozdzielano od wolnego RNA poprzez wirowanie w gradiencie chlorku cezu [32]. W tamtych latach było to nie lada przedsięwzięcie, gdyż wirowanie hybrydów DNA:RNA w gradiencie CsCl trwało od 3 do 5 dni przy $100.000\times g$. Następnym krokiem było zebranie frakcji i pomiar radioaktywności ^3H i ^{32}P . Zidentyfikowano frakcje zarówno ^3H , jak i ^{32}P , co wskazywało, że powstały hybrydy RNA:DNA. Do rozróżnienia frakcji RNA od DNA zastosowano hydrolizę alkaliczną, której ulegał RNA. Najważniejszą obserwacją było jednak to, że DNA uzyskany z innych źródeł niż fag T2 nie tworzył takich hybrydów. Spiegelman i Hall stwierdzili: „Fakt, że T2 RNA i DNA ulegają hybrydyzacji wskazuje na występowanie komplementarnych sekwencji między nimi i najprawdopodobniej tworzone są struktury przypominające model DNA Watsona i Cricka”. Tak więc badania hybrydyzacyjne zostały najpierw wykonane *in vitro*, a dopiero w kolejnych badaniach rozpoczęto zadawać sobie pytania, czy hybrydy RNA i DNA występują *in vivo* i czy proces przekazywania informacji genetycznej z DNA do białek obejmuje również tworzenie hybrydów DNA:RNA, w których DNA służy jako matryca do polimeryzacji komplementarnego polirybonukleotydu. Odpowiedź uzyskano w badaniach, w których *E. coli* zainfekowano ^{32}P -T2 i hodowano w obecności ^3H -urydyny. Po izolacji kwasy nukleinowe frakcjonowano w gradiencie CsCl, obserwując występowanie obydwu radioaktywności w tej samej frakcji [55].

Badania *in vitro* na syntetycznych polidezoksyrybonukleotydach i polirybonukleotydach prowadzone były równocześnie przez Richa. Pracował on głównie z

kwasem polidezoksytymidylowym (poli-dT) i poliadenylowym (poli-A). Gdy dwa polimery zostały zmieszane w temperaturze pokojowej, tworzyły hybryd, który cechował się zmniejszeniem absorpcji przy 260 nm i zwiększeniem współczynnika sedimentacji. Celem tych badań było podobnie jak u Halla i Spiegelmana wykazanie, że sekwencja nukleotydów w RNA odpowiada sekwencji nukleotydów w DNA. Rich uważał, że prowadzone przez niego badania hybrydizacyjne poli(dT):poli(A) są badaniami modelowymi, które mogą wyjaśnić, w jaki sposób syntetyzowany jest RNA w bakteriach *E. coli* zainfekowanych bakteriofagiem i czy RNA ma taką samą strukturę jak infekcyjny DNA. Ponadto zakładał, że możliwe jest, iż DNA bakteriofaga rozdziela się w komórce na pojedyncze nici i każda z nich służy za matrycę dla komplementarnego RNA. Interesujące było założenie, że jeśli zaobserwuje się cząsteczkę hybrydową RNA:DNA, to będzie oznaczało, że zjawisko jest powszechne i dotyczy różnego rodzaju komórek. Warte podkreślenia jest, że powyższe rozważania Rich prowadził rok przed ukazaniem się publikacji Jacoba i Monoda na temat mechanizmów regulujących syntezę białek. Jednakże prace eksperymentalne z tego zakresu ograniczył do oddziaływań modelowych. W 1962 roku Rich wykazał przy współpracy z Goodmanem występowanie hybrydów tRNA:DNA [10]. Dalsze badania nad występowaniem hybrydów między naturalnie występującymi polimerami nie zostały w pracach Richa rozwinięte z tego względu, iż główny nacisk położył on na prace zmierzające do wykrycia polirybosomów [57].

Wczesne techniki hybrydizacji DNA:RNA były kosztowne i pracochłonne. Polegały na inkubacji DNA i radioaktywnego RNA, dodaniu CsCl do mieszaniny inkubacyjnej, przeniesienia do ultrawirówki preparatywnej i wirowania przy 100000xg przez okres kilku dni. Przez nakłucie dna probówki zbierano frakcje, określano w nich radioaktywność i zawartość DNA. Oczywiście stosując tego rodzaju postępowanie nie można było oczekiwać dużego postępu badań w krótkim czasie. Dlatego też pojawiły się inne rozwiązania, jak na przykład uzyskanie DNA-celulozy, w której zastosowano pojedyncze nici DNA faga T4 do połączenia z acetylowaną fosfocelulozą. W ten sposób umożliwione zostały badania chromatografią kolumnową. RNA, który uległ hybrydizacji, można było w stosunkowo łatwy sposób odmyć z kolumny, a zhybrydizowany RNA eluowany był w temp. 65°C [3].

Równolegle do badań hybrydizacji RNA i DNA rozwijały się badania hybrydizacyjne z zastosowaniem sond molekularnych. Zainteresowanie badaniami hybrydizacyjnymi wzrosło po wykazaniu przez Smitha [53], że endonukleaza restrykcyjna z *Haemophilus influenzae* hydrolizuje dwuniciowy DNA w ściśle określonych sekwencjach. Ten enzym i wiele innych, o podobnych właściwościach znalazły wznrastające zastosowanie w badaniach struktury DNA. Powstałe fragmenty można było rozdzielić metodą elektroforezy w żelach agarozowych.

W 1975 roku Ed Southern z uniwersytetu w Edynburgu wykonał pionierskie doświadczenia, w których dokonał przeniesienia fragmentów restrykcyjnych, roz-

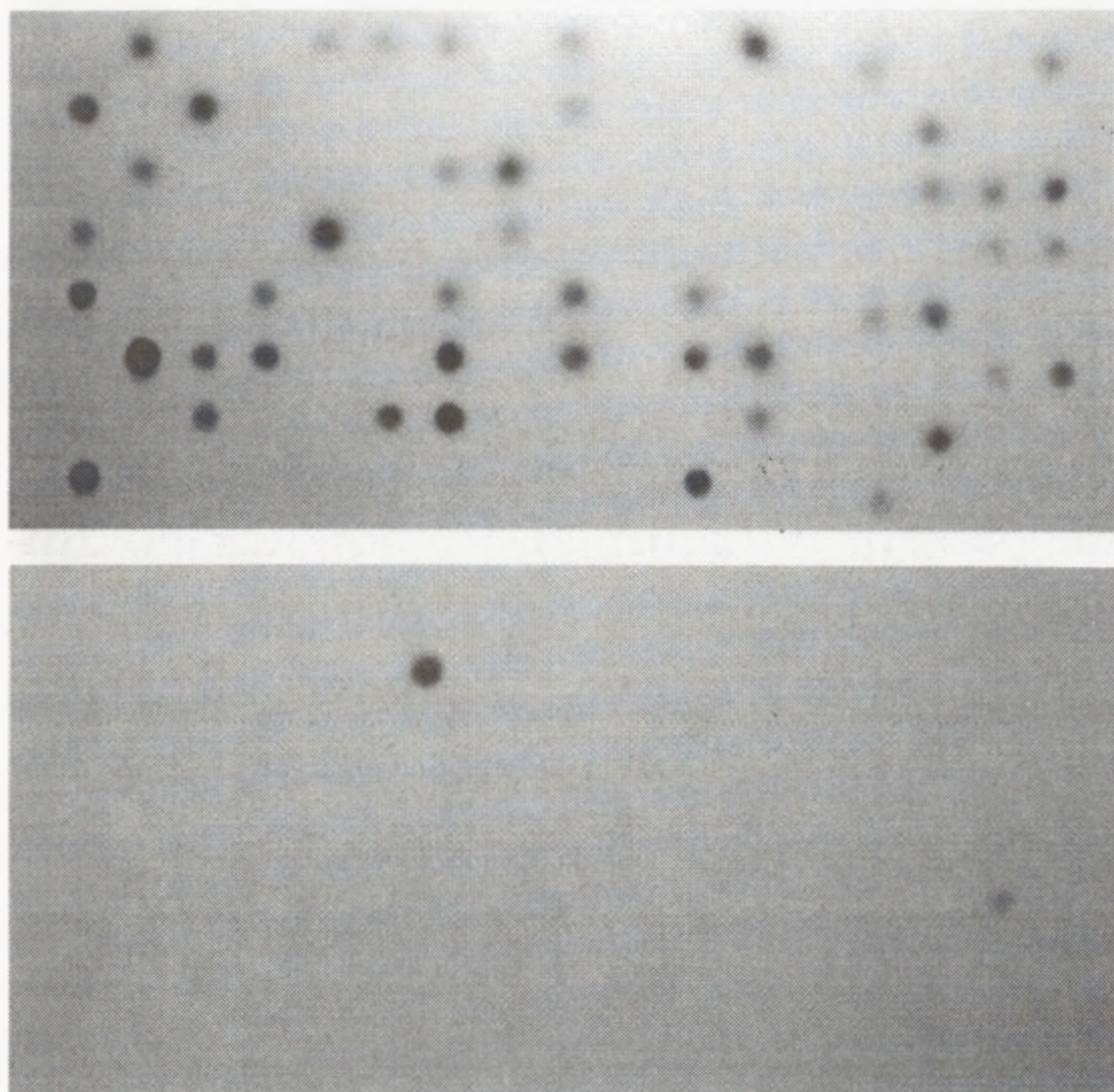
dzielonych w żelu agarozowym na filtr celulozowy [54]. W tym miejscu należy dodać, że większość analiz RNA i DNA wykonywanych w owym czasie przebiegała z zastosowaniem żeli poliakryloamidowych. Autor niniejszego opracowania (R.S.) przebywał w 1974 roku na stażu naukowym w wyżej wymienionym ośrodku, gdzie miał możliwość zapoznania się z opisywanymi procedurami. Elektroforeza w żelach poliakryloamidowych wykonywana była systemem rurkowym, a ośrodek w Edynburgu znany już był szeroko z opracowania bardzo dobrej metody rozdzielania kwasów nukleinowych w żelach poliakryloamidowych przez Loeninga [28]. Bezpośrednie przeniesienie fragmentów DNA rozdzielonych w rurkach na filtr nitrocelulozowy było mniej wydajne niż w przypadku fragmentów rozdzielonych w żelach agarozowych. W krótkim czasie można było zaobserwować zanik elektroforezy rurkowej i zastąpienie jej elektroforezą płytową.

TECHNIKI HYBRYDYZACJI

Podstawową cechą hybrydyzacji jest stabilność formowanego dupleksu. Początkowo fakt ten wykorzystano w badaniach struktury DNA i RNA, z czasem doprowadziło to do odkrycia sekwencji powtórzonych [25,26]. Badanie stabilności termicznej dupleksów natomiast okazało się cenne w określaniu pokrewieństwa pomiędzy genami różnych gatunków roślin i zwierząt. Wprowadzono metodę lokalizowania specyficznych sekwencji nukleotydowych na chromosomach, w jądrze komórkowym lub cytoplazmie poprzez hybrydyzację sondy do materiału utrwalonego na szkiełku mikroskopowym. Potrzeba wykrywania interesujących sekwencji w rekombinowanych klonach doprowadziła do zastosowania hybrydyzacji do identyfikacji kolonii bakteryjnych i analizowania łysinek fagowych [44].

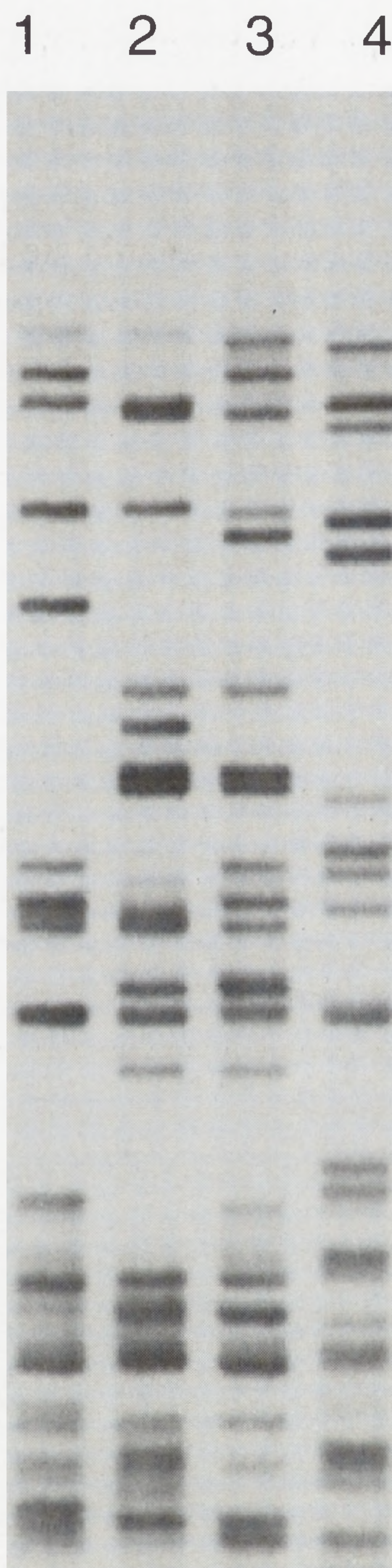
Najprostszą techniką hybrydyzacji na nośniku stałym jest hybrydyzacja punktowa (ang. *dot blot hybridization*). Mieszanina DNA lub RNA bez uprzedniego trawienia enzymami restrykcyjnymi i rozdzielania elektroforetycznego jest nakładana na membranę, unieruchomiana przez ogrzewanie lub naświetlanie promieniami UV, a następnie wykonywana jest inkubacja z sondą. Hybrydyzacja punktowa pozwala na jednoczesne wykrywanie i identyfikację wielu próbek na tym samym filtrze oraz półilościową ocenę ich stężenia (rys. 1). Obecnie technika ta jest szeroko stosowana do wykrywania wirusów w diagnostyce chorób zakaźnych zwierząt hodowlanych [58] lub jako weryfikacja wyniku uzyskanego metodą PCR.

Jedną z najczęściej stosowanych jest metoda hybrydyzacji Southerna (ang. *Southern blot hybridization*). Jest to hybrydyzacja DNA:DNA, której głównym zadaniem jest identyfikacja poszukiwanych sekwencji DNA w mieszaninie fragmentów otrzymanych po trawieniu enzymami restrykcyjnymi. DNA po trawieniu frakcjonuje się w żelu agarozowym, a uwidocznienie produktów trawienia przez barwienie bromkiem etydyny, szczególnie w przypadku genomowego DNA organizmów wyższych, nie daje żadnych informacji ze względu na ogromną liczbę prążków, wśród



RYSUNEK 1. Wykrycie mozaiki genu prawidłowego *TSC1* i mutacji w eksonie 15 u chorej na stwardnienie guzowate metodą hybrydyzacji punktowej: Produkt PCR – fragment eksonu 15 genu *TSC1* wklonowano w wektor pUC18, po czym nałożono punktowo na filtr nylonowy w dwóch kopiach. Jedną kopię hybrydyzowano z sondą molekularną (oligonukleotydem) z regionu mutacji, zawierającą prawidłową (dziką) sekwencję, drugą kopię hybrydyzowano z sondą molekularną (oligonukleotydem) specyficzną dla allelu z delecją CA. Uzyskano 46 pozytywnych sygnałów z sondą prawidłową (górna część rysunku) i tylko 2 sygnały z sondą dla allelu z delecją (dolna część rysunku)

których występują poszukiwane sekwencje. Dopiero hybrydyzacja z sondą molekularną pozwala na jego zlokalizowanie. Żel po elektroforezie poddaje się denaturacji, a rozdzielone nici DNA poprzez sączenie kapilarne przenoszone są na filtr nylonowy lub nitrocelulozowy. Następnie, unieruchomiony (w temp. 80°C) na filtrze DNA jest hybrydyzowany z sondą wg ogólnego schematu. W porównaniu do hybrydyzacji punktowej w metodzie Southerna uzyskuje się dodatkowe informacje o pozycji elektroforetycznej i wielkości fragmentu DNA, w którym zlo-



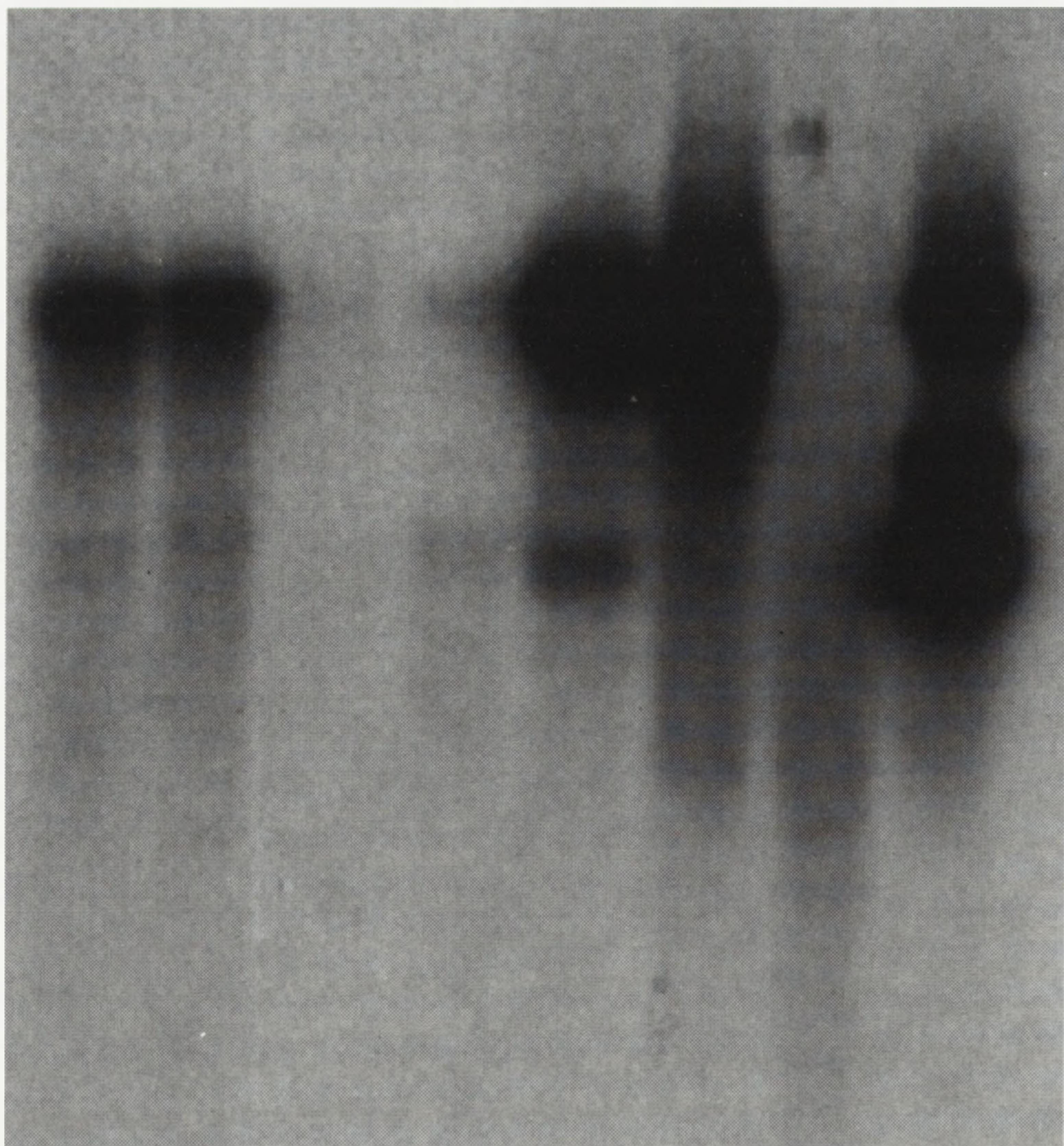
RYSUNEK 2. DNA fingerprinting uzyskany poprzez hybrydyzację wg Southerna z sondą molekularną (CAC)₅: DNA badanych osób trawiono enzymem restrykcyjnym *HinfI*, a następnie rozdzielono w 0,9% żelu agarozowym i hybrydyzowano z sondą molekularną (CAC)₅. Ten rodzaj analizy obejmuje jednocześnie ponad 70 loci dając charakterystyczny układ prążków hybrydyzacyjnych. Tor 1, matka; tor 2, dziecko I; tor 3, dziecko II; tor 4, domniemany ojciec, którego ojcostwo badanie wykluczyło. Dzieci są bliźniętami dizygotycznymi (z analiz Laboratorium Genetyki Molekularnej)

kalizowana jest poszukiwana sekwencja (rys. 2).

Badania hybrydyzacyjne znajdują również zastosowanie w analizach dotyczących poziomu ekspresji genów. W tym przypadku informacja dostarcza hybrydyzacja RNA:DNA określona jako metoda Northern. Wykonywana jest ona podobnie jak Southern *blotting* z tym jednak, że frakcjonowany jest RNA, a denaturacja zachodzi w obecności formamidu. W porównaniu do hybrydyzacji Southerna metoda ta dostarcza dodatkowych informacji o występowaniu w badanych komórkach poszukiwanego RNA (rys. 3).

Hybrydyzacja *in situ* jest metodą szeroko stosowaną do wykrywania specyficznych sekwencji w skrawkach tkanek, pojedynczych komórkach lub strukturach subkomórkowych, np. chromosomach (rys. 4) [19a,b, 27a]. Od poprzednich metod różni się tym, że prowadzona jest bezpośrednio na szkiełku mikroskopowym bez przenoszenia na nośnik, po hybrydyzacji preparaty ocenia się pod mikroskopem. Przeprowadzenie hybrydyzacji na materiale z zachowaną strukturą tkankową umożliwia nie tylko wykrywanie poszukiwanych sekwencji, lecz także precyzyjne określenie ich lokalizacji w komórce. Hybrydyzacja *in situ* znalazła zastosowanie do wykrywania RNA występującego w niewielkiej subpopulacji komórek. W takich przypadkach zagwarantowana jest większa czułość niż w metodzie Northern.

1 2 3 4 5 6 7 8



RYSUNEK 3. Ekspresja genu *TSC1* u myszy metodą hybrydyzacji typu Northern: Całkowity mRNA wyizolowano z różnych tkanek myszy, oczyszczono na kolumnie z oligo(dT)-celulozą i frakcjonowano w warunkach denaturujących w 1% żelu agarozowym, po czym przenoszono RNA na filtr nylonowy. Hybrydyzację wykonano z sondą molekularną stanowiącą fragment PstI/PstI cDNA genu *TSC1* myszy, odpowiadający nukleotydom 1386-2176 cDNA człowieka. Sondę wyznakowano ^{32}P -dCTP metodą heksamerową. Wykryty u myszy transkrypt jest, tak jak w przypadku transkryptu genu *TSC1* człowieka, wielkości 8,6 tys. nukleotydów. Zaobserwowano dodatkowe prążki hybrydyzacyjne wielkości 4,1 i 5,2 tys. nukleotydów, które mogą być wynikiem alternatywnego składania – Tor 1, mRNA z serca; tor 2, mRNA z mózgu; tor 3, mRNA ze śledziony; tor 4, mRNA z płuc; tor 5, mRNA z wątroby; tor 6, mRNA z mięśni szkieletowych; tor 7, mRNA z nerki; tor 8, mRNA z jąder

Hybrydyzacja *in situ* bardzo często stosowana jest w diagnostyce wirusologicznej i badaniach cytologicznych. Z powodzeniem została też zastosowana do wykrywania wielu wirusów zwierzęcych [44,58].

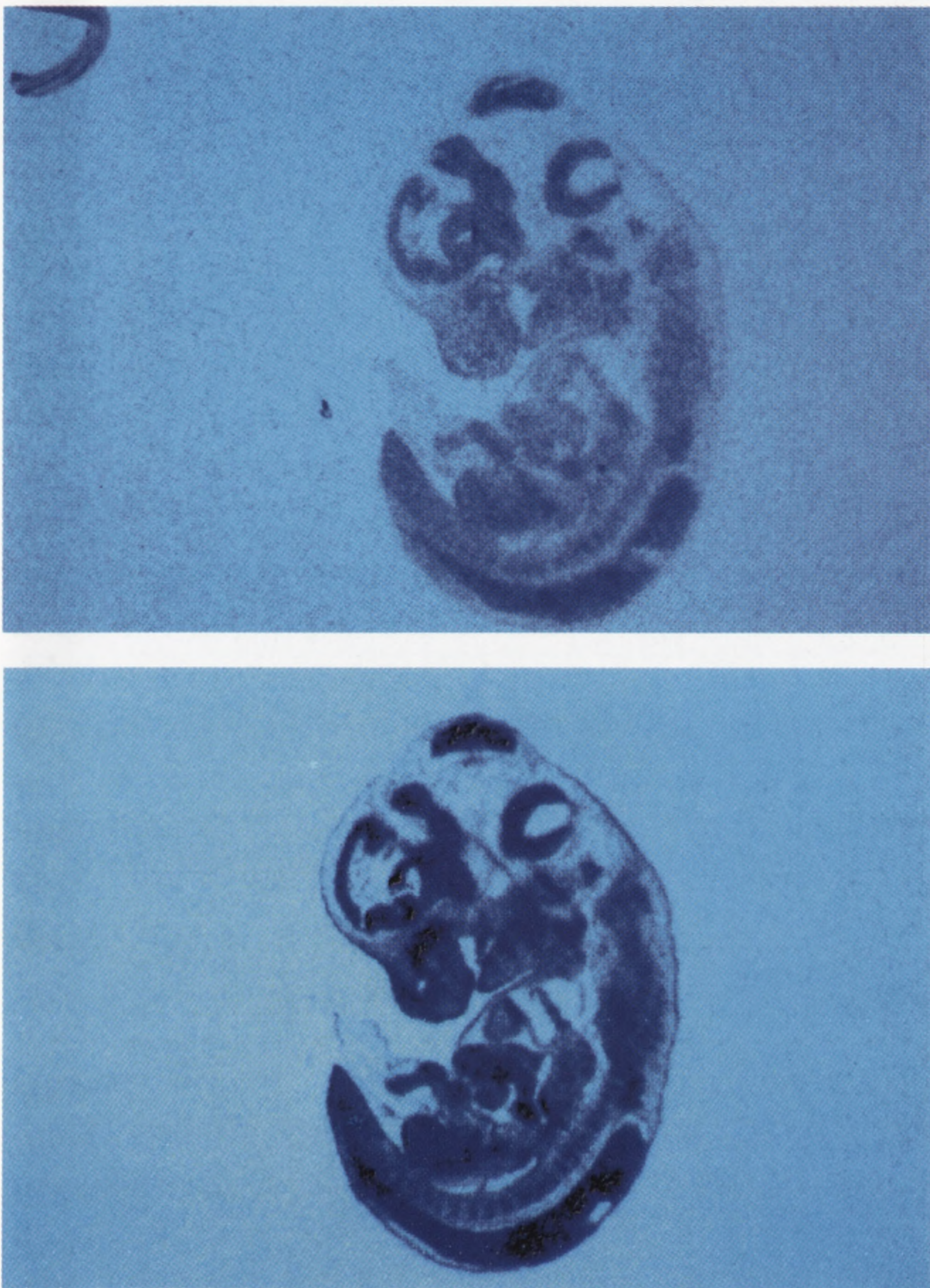
Hybrydyzacja wg Southerna stosowana jest także do uzyskiwania odcisku DNA (*DNA fingerprinting*) i ma duże znaczenie diagnostyczne. Obecność w eukariotycznym DNA sekwencji powtórzonych, cechujących się dużą zmiennością nadaje DNA poszczególnych osobników cechy indywidualne, podobnie jak w przypadku układu linii papilarnych człowieka. Prawdopodobnie u podstaw tej zmienności leży mechanizm rekombinacji genetycznej w trakcie mejozy lub mitozy, polegający na nierównym rozdziale sekwencji powtórzonych, a co za tym idzie powstawaniu polimorficznych alleli. Po hybrydyzacji strawionego enzymem restrykcyjnym i rozdzielonego elektroforetycznie DNA z sondą molekularną wyraża się to obecnością lub brakiem poszczególnych prążków uwidocznionych na autoradiogramach (rys. 2).

Jednym z głównych, rozwiązywanych obecnie celów jest poznanie podłoża defektów genetycznych, jak również zlokalizowanie genów odpowiedzialnych za występowanie chorób. Wymaga to zastosowania metod prowadzących do określenia sekwencji kodujących na poszczególnych chromosomach. Stosowane są różnorodne techniki, wszystkie jednak prowadzą do opracowania map transkrypcyjnych dużych regionów genomów poszczególnych organizmów. Na każdym etapie hybrydyzacja i różne jej warianty okazują się niezwykle przydatne. Przygotowanie mapy transkrypcyjnej poprzedzone jest przygotowaniem biblioteki DNA. Wzajemne ułożenie zachodzących na siebie klonów sprawdzane jest przez hybrydyzację klonu z genomowym DNA i innymi klonami. Celem detekcji nowych klonów, w których poza wspólną sekwencją końca insertu występuje nowa sekwencja, jako sondy wykorzystuje się tylko końce insertów z wcześniej wykrytych klonów. Jest to „spacer po chromosomie” (ang. *chromosome walking*). Dokładna mapa transkrypcyjna jest jednak dopiero wstępem do żmudnych poszukiwań sekwencji kodujących. Stosowanie innych metod, jak „zoologiczny” *blot*, zawierający DNA różnych gatunków zwierząt, w którym jako sondę molekularną wykorzystuje się klon genomowego DNA, pozwala wykryć wysoce konserwatywne sekwencje kodujące, najczęściej są to geny do dalszej analizy. Ważnym wskaźnikiem występowania genów jest również zidentyfikowanie sekwencji CpG. Wyspy metylowanych sekwencji CpG powszechnie występują na końcu 5' genów kręgowców i są one rozpoznawane przez rzadko tnące enzymy restrykcyjne, co pozwala na ich identyfikację przez hybrydyzację. Poszukiwanie sekwencji kodującej z wykorzystaniem klonów genomowego DNA jako sond do hybrydyzacji można również prowadzić metodą Northern z mRNA lub całkowitym RNA pochodzącym z różnych tkanek. Pozytywny sygnał stanowi dowód na występowanie sekwencji kodującej.

Hybrydyzacja często łączona jest z reakcją PCR, czego przykładem jest metoda określana jako selekcja cDNA. W wyniku hybrydyzacji genomowego DNA (w

wektorze) z biblioteką cDNA tworzone są heterodupleksy DNA:cDNA. Do końców fragmentów genomowego DNA przyłączone zostają krótkie oligomery (na podstawie których przygotowane zostają wyznakowane biotyną startery reakcji PCR) i prowadzona jest amplifikacja. Jednocześnie reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla wektora poddane są inserty cDNA. Następnie produkty obydwu reakcji poddawane są hybrydyzacji. Powstałe heterodupleksy między nicią genomowego DNA z biotyną i komplementarnym cDNA, po połączeniu ze streptawidyną, są wychwytywane na ziarnach magnetycznych. Kolejne cykle PCR i hybrydyzacji prowadzą do uzyskania specyficznego cDNA [23].

Zastosowanie hybrydyzacji w diagnostyce nie jest ograniczone do stosowania sond molekularnych. W przypadkach chorób warunkowanych mutacjami dziedzicznymi w układzie heterozygotycznym obserwuje się dwa allele genu: allel zmutowany i prawidłowy. Zależnie od typu mutacji mogą wystąpić różnice w sekwencji w przypadku substytucji lub długości w przypadku delecji lub insercji. Podczas denaturacji, a następnie powolnego ochładzania produktów poszczególne nici renaturują losowo i dochodzi do sparowania nici komplementarnych, jak również nie w pełni komplementarnych, co prowadzi do wytworzenia heterodupleksu. Na niekomplementarnym odcinku nici DNA wytwarzają się struktury przybierające postać pęcherza, zagięcia nici DNA lub wybrzuszenia. Tworzenie tych struktur jest uzależnione od rodzaju mutacji, jak również od stężenia czynników denaturujących. Mutacje typu substytucji powodują powstanie obustronnego wybrzuszenia (pęcherza), a insercje lub delecje powodują powstawanie jednostronnego wybrzuszenia lub ugięcia nici DNA. Molekularne podłoże powstawania heterodupleksów zostało wyjaśnione na podstawie badań heterodupleksów prawidłowego i zmutowanego genu CFTR, którego mutacje prowadzą do mukowiscydozy. Allel genu CFTR z mutacją $\Delta F508$ różni się od genu prawidłowego delecją trójnukleotydu kodującego fenyloalaninę. Okazało się, że w heterodupleksie dochodzi do ugięcia osi helisy o 70° . Heterodupleksy migrują w żelach poliakryloamidowych wolniej niż homodupleksy. Zmiana szybkości migracji jest szczególnie dobrze widoczna przy ugięciu nici DNA. Na skuteczność wykrywania zmian wpływa ich rodzaj, jak również położenie względem końca produktu. Delecje lub insercje powyżej trzech nukleotydów powodują powstawanie stabilnych heterodupleksów i można obserwować ich występowanie podczas rozdziału na dowolnym żelu poliakryloamidowym. W przypadku zmian jednej pary zasad duży wpływ na powodzenie ma dobranie warunków elektroforezy. Ważnym czynnikiem powodzenia w poszukiwaniu zmian w sekwencji DNA jest rozdzielczość elektroforezy (rys. 5).



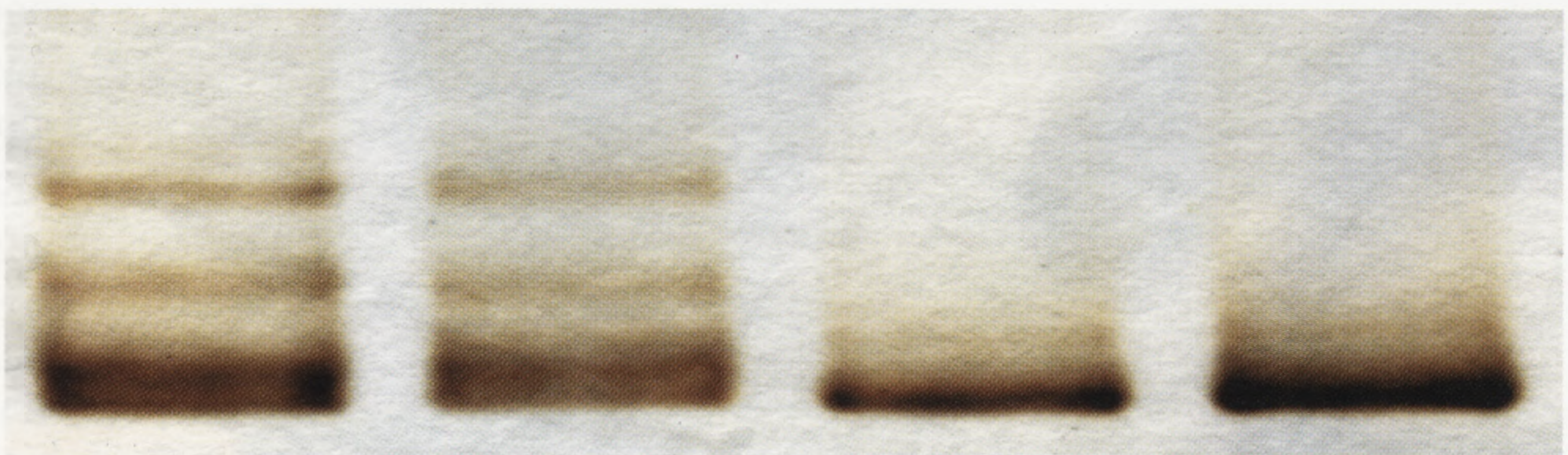
RYSUNEK 4. Analiza ekspresji genów *TSC1* i *TSC2* metodą hybrydyzacji *in situ* na przekrojach embrionów myszy: Hybrydyzację *in situ* wykonano na przekrojach embrionów myszy w 12,5-dniowym stadium rozwojowym. Sondę molekularną stanowił fragment cDNA genu *TSC1* i *TSC2* myszy, wklonowany w wektor pGEMBlue, zawierający miejsca inicjacji transkrypcji dla polimeraz RNA SP6, T7, T3, co umożliwiło przygotowanie sond molekularnych. Sonda niekodująca RNA (antysensowa) łączyła się komplementarnie z RNA (pozytywny wynik), natomiast sonda kodująca RNA (sensowa) stanowiła kontrolę negatywną. Sondę znakowano ^{35}S -UTP. Hybrydyzację wykonywano w temperaturze 50°C , przez 12 godz., po czym z preparatów odplukiwano nie specyficznie związaną sondę $0,2\times\text{SSC}$ o temp. $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$. Wynik uwidaczniano przez autoradiografię. Analiza ekspresji genu *TSC1* (góra) i *TSC2* (dół) w preparatach (przekrojach) 12,5-dniowego embrionu myszy

1

2

3

4



RYSUNEK 5. Określenie polimorfizmu mitochondrialnego DNA metodą heterodupleksów: Fragment mitochondrialnego DNA amplifikowano metodą PCR, a następnie produkty PCR poddano denaturacji przez ogrzanie (5 min, 95°C) i powolnej renaturacji (30 min, 60°C). Uzyskane homodupleksy i heterodupleksy rozdzielono w 8% żelu poliakryloamidowym i wybarwiono srebrem. Heterodupleksy utworzone między fragmentami mitochondrialnego DNA człowieka widoczne są powyżej prawidłowego fragmentu – homodupleksu. Tor 1 i 2 heteroplazmia, tor 3 i 4 homoplazmia (z analiz Laboratorium Genetyki Molekularnej)

ZASTOSOWANIE BADAŃ HYBRYDYZACYJNYCH W DIAGNOSTYCE MOLEKULARNEJ CHORÓB GENETYCZNYCH

Mutacja punktowa, rozpoznawana przez enzym restrykcyjny, może spowodować zmianę wielkości fragmentów restrykcyjnych po trawieniu DNA. Różnica w wielkości fragmentów restrykcyjnych może być również spowodowana pojawieniem się dodatkowego miejsca restrykcji. Jednak większość defektów genetycznych powodują mutacje nie zmieniające miejsc restrykcyjnych i bezpośrednia analiza restrykcyjna staje się nieprzydatna. W takich przypadkach diagnostykę często opiera się na naturalnie występującym w populacji zjawisku zmienności i wykorzystuje polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych DNA (RFLP). Łączy się to z koniecznością wykonania badań rodzinnych obejmujących rodzeństwo i rodziców chorego. Nie określa się defektu genu, lecz jedynie dziedziczenie genu zawierającego mutację [19].

Do niedawna najczęściej stosowane były sondy znakowane radioizotopami fosforu (^{32}P i ^{33}P), obecnie stosuje się sondy z ligandami rozpoznawanymi przez swoiste przeciwciała, sondy biotynylowane, jak również takie, dla których końcowym etapem detekcji jest chemiluminescencja.

Najlepszymi przykładami zastosowania sond molekularnych w diagnostyce chorób są różnego rodzaju hemoglobinopatie. Należy do nich również anemia sierpowata powodowana pojedynczą tranzycją A→T w szóstym kodonie beta globiny. Konsekwencją tej mutacji jest zmieniona cząsteczka globiny z walina zamiast kwasu glutaminowego. Mutacja powoduje zmianę w długości fragmentów restrykcyjnych po trawieniu przez enzymy MstII i DdeI. Zastosowanie hybrydyzacji z sondą, którą jest fragment AluI 5' końca genu beta globiny, pozwala na wykrywanie homozygot recesywnych i heterozygot będących nosicielami choroby. Mutacja w genie beta globiny może być również wykrywana za pomocą syntetycznych sond komplementarnych do prawidłowej i zmutowanej sekwencji. Genomowy DNA wówczas poddaje się hybrydyzacji z obiema sondami jednocześnie. W przypadku homozygot tworzy się jeden trwały hybryd z jednym oligomerem, DNA heterozygot natomiast tworzy nieco mniej trwałe hybrydy z obiema sondami. Inną grupę hemoglobinopatii stanowią talasemie, polegające na zaburzeniach w syntezie łańcuchów globiny. Najbardziej znana beta talasemia spowodowana jest pojedynczą substytucją G→A w pierwszym intronie genu beta globiny. W tej sytuacji nie występuje więc zmiana sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny i wykrycie mutacji tą drogą nie jest możliwe. W diagnostyce talasemii stosuje się hybrydyzację badanego DNA z syntetycznymi 19-nukleotydowymi sondami komplementarnymi do sekwencji prawidłowej i do zmutowanej. Postępowanie metodyczne jest podobne do opisanego powyżej z tą tylko różnicą, że wymaga wcześniejszego badania rodziców

i ustalenia mutacji powodującej beta talasemię. Analiza hybrydyzacyjna DNA stosowana była szeroko w latach osiemdziesiątych w celu diagnozowania i określania nosicielstwa licznej grupy chorób, m.in. fenyloketonurii, płasawicy Huntingtona, dystrofii mięśniowej Duchenne'a i wielu innych. Obecnie większość analiz diagnostycznych przebiega z zastosowaniem PCR. Obie metody wykrywania mutacji są porównywalne i mogą być zamiennie stosowane.

ZASTOSOWANIE BADAŃ HYBRYDYZACYJNYCH W NOWOCZESNEJ HODOWLI ZWIERZĄT

Postępy w dziedzinie biologii molekularnej i genetyki dały o sobie znać również w hodowli zwierząt użytkowych i coraz częściej pozwalają uzyskać wyższą wydajność i skład mleka, jakość mięsa, płodność, plenność, odporność lub podatność na infekcje. Cechy te są efektem oddziaływania wielu genów, a ich mutacje lub sprzężone z nimi markery są przedmiotem intensywnych badań [21]. Odkąd okazało się, że sondy molekularne wykorzystywane do identyfikacji genów człowieka przydatne są również w badaniach genów zwierząt, hybrydyzacja wniosła wiele cennych informacji w zakresie nowoczesnej hodowli i pozwoliła na uzyskanie zwierząt o określonym, korzystnym dla hodowcy genotypie. Dzięki zastosowaniu techniki RFLP i hybrydyzacji z sondą molekularną, którą stanowił cDNA zawierający fragment sekwencji genu DQ β 1 człowieka uzyskano w przypadku bydła wzór prążkowy dla danego allelu, co pozwala na identyfikację genów dla antygenów II klasy głównego kompleksu zgodności tkankowej [1]. Ma to ogromne znaczenie ze względu na korelację między określonymi antygenami a odpornością na określone jednostki chorobowe zwierząt [56]. Polimorfizm obejmuje również regiony niekodujące genomowego DNA i dotyczy sekwencji powtórzonych. Chociaż znaczenie tych sekwencji nadal pozostaje nie wyjaśnione, wiadomo, że mogą stanowić one niezwykle ważne markery genetyczne w hodowli i selekcji zwierząt. Szczególne znaczenie przypisuje się minitelitom i mikrosatelitom, przy czym najczęściej wykorzystywane sondy minisatelitarne 33.5, 33.6, i 33.15, opracowane przez Jeffreysa i wsp. [18], które stosowane są z równym powodzeniem u człowieka, jak i u zwierząt. Drugą grupą sekwencji powtarzających się i rozproszonych w całym genomie są mikrosatelity, identyfikowane przez hybrydyzację z sondami (GATA) $_n$, (GACA) $_n$, (GT) $_n$, (CAC) $_n$. Dobór właściwego enzymu restrykcyjnego oraz sondy molekularnej umożliwia otrzymanie wzoru prążków (*fingerprint* charakterystyczny dla danego osobnika) o dużym zróżnicowaniu międzyosobniczym [5]. W nowoczesnej hodowli zwierząt badania dotyczące polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych oraz sekwencji mini- i mikrosatelitarnych wypierają coraz bardziej badania związane z grupami krwi i polimorfizmem białek krwi ze względu na możliwość identyfikacji nie-

współmiernie liczniejszych markerów genetycznych. Mikrosatelity zidentyfikowane u bydła [29], koni [11], świń [46] i owiec [7] są zarejestrowane w międzynarodowym banku genów (GenBank lub EMBL) [35]. Stanowią one markery przydatne nie tylko w badaniach podstawowych, takich jak: charakterystyka struktury populacji i stopnia inbredu, ocena dystansu genetycznego pomiędzy liniami, rasami i populacjami zwierząt, ale przede wszystkim w badaniach mających bezpośredni związek z praktyką hodowlaną.

Jednym z problemów hodowlanych jest zjawisko frymartynizmu często powodujące nieplodność zwierząt pochodzących z ciąży mnogich [40]. Szczegóły tego zjawiska opisano w pracy Słomskiego i wsp. [52]. Identyfikacja sekwencji DNA zlokalizowanych na chromosomie Y pozwalająca określić płęć jest niezwykle istotna w przypadku wyboru zarodków do transferu. W strukturze tego chromosomu obok typowych sekwencji DNA występują sekwencje powtórzone swoiste dla danego gatunku [4,6,27]. Sekwencje te zostały wyizolowane i sklonowane, a następnie użyte jako sondy molekularne w hybrydyzacji *in situ*, hybrydyzacji punktowej lub wg Southerna, między innymi do określania płci zarodków.

Poważny problem w hodowli stanowią również infekcje wirusowe u zwierząt, zwykle diagnozowane na podstawie obecności w surowicy przeciwciał dla białek wirusowych. Metody dotąd stosowane, takie jak test immunodyfuzyjny, pozwalają na ich wykrycie w okresie 1–3 tygodni po infekcji, testy wykorzystujące metodę PCR znacznie przyspieszają wykrycie zakażenia. Techniki oparte na hybrydyzacji z sondami molekularnymi są jednak dziesięciokrotnie bardziej czułe niż metody tradycyjne i stwarzają możliwość wykrycia wirusa nawet w bardzo małych stężeniach. Takie testy do wykrywania szeregu wirusów atakujących zwierzęta domowe zostały już opracowane [38].

Większość biologicznie i ekonomicznie istotnych cech żywych organizmów jest sumą oddziaływań genów i czynników środowiskowych. Nowoczesna hodowla dąży do uzyskania jak najkorzystniejszych efektów selekcyjnych, a gwałtowny rozwój genetyki molekularnej, obserwowany w ostatnich latach daje możliwość wyboru pożądanych genotypów. Przykładem tego mogą być badania loci mikrosatelitarnych, które w przypadku kurcząt doprowadziły do uzyskania markerów genetycznych mających posłużyć w selekcji określonego genomu w danej populacji [47]. Rozpoznane mutacje niektórych genów pozwalają odpowiednio przygotować program kojarzeń, a metody diagnozowania infekcji wirusowych stwarzają szansę podjęcia skutecznego przeciwdziałania. Osiągnięcia współczesnej genetyki molekularnej doprowadziły również do intensywnego rozwoju prac nad mapowaniem genomów zwierzęcych i uruchomienia międzynarodowych programów mapowania genomów świń, bydła i innych zwierząt domowych.

ZASTOSOWANIE TECHNIK HYBRYDYZACYJNYCH W BADANIACH DOTYCZĄCYCH ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ ROŚLIN

Odkrycie i wykorzystanie molekularnych systemów markerowych jest również jednym z ważniejszych osiągnięć w poznaniu struktury i organizacji genomów roślinnych. Zastosowanie markerów, zasadniczo eliminuje trudności występujące w klasycznych testach fenotypowych poprzez bezpośrednie wykrywanie różnic w strukturze alleli na poziomie sekwencji DNA [9,52]. Markery genetyczne powstają w toku badań opartych zasadniczo na dwóch najważniejszych systemach. Pierwszą grupę oznaczeń stanowią analizy bazujące na RFLP (najczęściej stosowana technika w konstruowaniu map genetycznych oraz mapowaniu ważniejszych cech u roślin o znaczeniu gospodarczym). Polimorfizm DNA wykazywany jest przez trawienie DNA restryktazą i uwidocznienie fragmentów po hybrydyzacji z sondą. Uzyskane tą drogą markery są bardzo przydatne do dalszych analiz, wykazują bowiem kodominację, co jest szczególnie ważne w różnicowaniu homozygot od heterozygot i daje możliwość detekcji alleli polimorficznych. Ponadto markery RFLP wykorzystuje się do detekcji polimorfizmów specyficznych dla danego locus w toku badań odrębnych gatunków, dzięki czemu opisano zależności występujące u traw i u roślin strączkowych wskazujące na analogię budowy genomów charakterystyczną dla tych gatunków [9,43]. Technika ta ponadto ma dodatkową zaletę, mimo stosunkowo dużej ilości (5–10 µg) potrzebnego materiału do analizy, ten sam filtr może być hybrydyzowany wielokrotnie. Co więcej wiele próbek DNA może być hybrydyzowane równocześnie, co pozwala na tworzenie map RLFP o wysokim nasyceniu [9,43].

Drugą grupę oznaczeń stanowią metody oparte na amplifikacji DNA, takie jak: RAPD (ang. *random amplified polymorphic DNA*), AP-PCR (ang. *arbitrarily primed PCR*), SSR (ang. *simple sequence repeat*), DAF (ang. *DNA amplification fingerprinting*), CAPS (ang. *cleaved amplified polymorphic sequence*) [9]. Badania wykorzystujące wymienione techniki umożliwiły zebranie wielu informacji dotyczących struktury i organizacji genomów wielu roślin uprawnych, co jest szczególnie istotne w przypadku dużego udziału niektórych roślin w światowej produkcji żywności.

Rośliny charakteryzują się wielką różnorodnością reprodukcji. Większość rozmnaża się głównie poprzez wytwarzanie nasion, lecz znaczna liczba gatunków jest zdolna również do reprodukcji w sposób wegetatywny, co bardzo komplikuje badania struktury populacji roślinnych [52]. Dokładne oszacowanie występowania i zróżnicowania genetycznego jest niezwykle ważne dla taksonomii roślin, ekologii czy genetyki populacyjnej. W przypadku gatunków, które utraciły zdolność rozmnażania wegetatywnego, każda roślina potomna jest wynikiem rekombinacji, co znacznie ułatwia badania. Rozmnażanie wegetatywne natomiast powoduje wiele trudności

związanych z rozróżnieniem pochodzenia poszczególnych roślin potomnych, podobnie jak zazwyczaj niemożliwe jest rozróżnienie między nasionami i sadzonkami pochodzenia apomiktycznego a tymi powstałymi drogą płciową [36,12]. Wystąpiła więc potrzeba znalezienia metod, które pozwolą identyfikować poszczególne genotypy z dużą dozą pewności. Badania oparte na hybrydyzacji typu MLS *DNA fingerprinting* (ang. *multilocus system*) z zastosowaniem sond specyficznych dla sekwencji minisatelitarnych i prostych sekwencji powtórzonych okazały się bardzo czułą metodą detekcji zmienności genetycznej także w świecie roślin [48]. Przykładem mogą być badania Nyboma i Krafta [37] dotyczące gatunków jeżyn rozprzestrzenionych w różnych częściach Europy. Autorzy wykazali, że mimo ogromnych podobieństw populacji szwedzkiej, duńskiej i niemieckiej, na podstawie badań hybrydyzacyjnych można oszacować poziom zmienności genetycznej w poszczególnych populacjach, a co więcej odróżnić apomiktyczne nasiona od powstałych w trakcie procesu rekombinacji [37].

Identyfikacja, rozróżnianie i klasyfikacja gatunków lub ras niższych Eukariota, oparta wyłącznie na cechach morfologicznych lub charakterystyce hodowlanej jest bardzo trudna. Grzyby i drożdże są często patogenami ludzi i roślin i stają się również coraz ważniejsze dla celów przemysłowych. Od kiedy infekcje grzybicze stały się poważnym problemem w hodowli roślin i zwierząt dotykając również ludzi, w szczególności chorych z AIDS lub przeszczepami narządów, poszukiwanie prostych i szybkich metod identyfikacji uległo znacznemu przyspieszeniu. Nowsze techniki, takie jak RLFP i hybrydyzacja, znajdują tu coraz częstsze zastosowanie. Dwie metody okazały się bardzo skuteczne: *DNA fingerprinting* opisany przez Jeffreysa i RAPD, obie doskonale nadające się do identyfikacji poszczególnych osobników. Metoda RAPD ma jednak pewną przewagę, jest przede wszystkim szybsza i może objąć analizą większą liczbę osobników. Połączono więc obie metody poprzez użycie sond, stosowanych w klasycznym *fingerprinting*, jako starterów w amplifikacji zmiennych sekwencji DNA grzybów. *PCR-fingerprinting* stała się szybką, czułą i wiarygodną metodą, która może być stosowana w eksperymentach na większą skalę [33]. Dzięki zastosowaniu *DNA fingerprinting* udało się np. wykazać genetyczne różnice pomiędzy agresywnymi i nieagresywnymi izolatami *Leptosphaeria maculans*, przez co metoda stała się narzędziem w diagnostyce ważnych patogenów roślinnych. Podobnie, zastosowanie *PCR-fingerprinting* z użyciem sond: (CA)₈, (CT)₈, (GTG)₅ i (GACA)₄ jako starterów pozwoliło na rozróżnienie między patogenami człowieka [33].

Badania sekwencji mikrosatelitarnych u roślin mają coraz istotniejsze znaczenie w analizach genomów [41]. Duża częstość, z jaką sekwencje te występują w DNA, oraz ich wysoki polimorfizm czynią je niezwykle przydatnymi markerami genetycznymi znajdującymi zastosowanie do mapowania, genetycznej analizy sprzężeń, określania czystości nasion i jakości hybrydów. Chociaż bazy sekwencji są wyraźnie uboższe w sekwencje roślinne w porównaniu ze zwierzęcymi, to można na ich

podstawie wykazać zdecydowane różnice ilościowe i jakościowe pomiędzy mikrosatelitami roślinnymi i zwierzęcymi [42,52]. DNA fingerprinting w badaniach roślin nie jest jeszcze w pełni wykorzystaną metodą, lecz wiele obiecujących prac jest już realizowanych. Wielopunktowa analiza DNA (MLS) staje się wygodną i bardzo czułą metodą w identyfikowaniu różnic genetycznych na poziomie osobniczym, klonów i linii wsobnych. Dla bardziej oddalonych genetycznie osobników nadal wykorzystuje się tańsze, szybsze i mniej czułe metody oparte na izoenzymach, a ostatnio również na metodzie RAPD. Jakkolwiek w niektórych grupach roślin wykazujących niższą rekombinację w związku z występowaniem apomiksji i wegetatywnego rozmnażania, badania typu MLS mogą wnieść wiele do taksonomii, także na poziomie gatunku. Potencjalnie profile uzyskiwane po zastosowaniu sond typu SLS są wyjątkowo użytecznym, dodatkowym narzędziem w badaniach przepływu genów [36].

ZASTOSOWANIE BADAŃ HYBRYDYZACYJNYCH W KRYMINALISTYCE I MEDYCYNIE SĄDOWEJ

Jednym z przykładów zastosowania diagnostyki molekularnej poza genetyką człowieka jest kryminalistyka i medycyna sądowa. Tradycyjny materiał do badań stanowią krew obwodowa, nasienie, wymazy cytologiczne, fragmenty tkanek, a także ślady biologiczne, takie jak: włosy, sperma czy ślina pozostawiona podczas zaklejania koperty lub na ustniku papierosa.

Wykonywane badania DNA można podzielić na dwie grupy. Pierwszą stanowią badania SLS dotyczące pojedynczego locus (ang. *single locus system*), druga grupa MLS (ang. *multi locus system*) obejmuje jednoczesną analizę wielu loci. Identyfikacja lub pokrewieństwo badanych osób wnioskowane są na podstawie porównania wielkości fragmentów DNA występujących u tych osób. Wzory prążkowe typu *fingerprint* pozwalają na analizę fenotypu DNA, jednak nie dają informacji o poszczególnych loci czy allelach, a więc o genotypie DNA [39]. Sondy molekularne oparte na sekwencjach minisatelitarnych człowieka, dają specyficzne dla danego locus prążki hybrydizacyjne, na podstawie których można wnioskować o genotypie DNA oraz wykorzystać je w analizie sprzężeń (rys. 2.). Analiza umożliwiająca badanie pojedynczego locus (SLS) jest więc potężnym narzędziem badań między innymi na potrzeby sądownictwa. W odróżnieniu od *fingerprinting* (MLS) próby, takie jak: wymazy z pochwy zawierające nasienie lub krew więcej niż jednej osoby, a więc próby zawierające mieszany DNA, są identyfikowane przy użyciu odpowiednio dobranych sond [15–17].

Odkrycie polimorfizmu DNA otworzyło drogę badaniom dotyczącym identyfikacji zwłok i rekonstrukcji więzów rodzinnych. *Fingerprint* uzyskany dla sekwencji

minisatelitarnych jest unikatowy dla każdej osoby z wyjątkiem bliźniąt monozygotycznych. Możliwa jest rekonstrukcja powiązań rodzinnych przez porównanie uzyskanego wyniku z rodzicielskimi lub osób blisko spokrewnionych z probandem. Wysokocząsteczkowy DNA otrzymywany pośmiertnie z różnych organów z powodzeniem używano w hybrydyzacji. Stabilność DNA uzyskanego z mózgu, limfy czy mięśni była porównywalna z DNA izolowanym z krwi nawet wtedy, kiedy ofiara nie żyła od 3 tygodni. DNA innych narządów, takich jak nerki czy śledziona, po 5 dniach ulegał szybkiej degradacji. Zaobserwowano jednak, że autoliza spowodowana temperaturą otoczenia i infekcjami nie powodowała występowania dodatkowych prążków, lecz stopniowy zanik dużych fragmentów w fingerprincie uzyskanym przy użyciu minisatelitarnej sondy 33.15 [2].

Dzięki analizie profili genetycznych można ustalić lub wykluczyć ojcostwo. Wynik badania hybrydyzacyjnego przypomina kod kreskowy swoisty dla badanej osoby. Jednoczesna analiza ludzkiego DNA w ok. 70 punktach zawiera tyle informacji, że jej ocena klasycznym modelem genetycznym nie jest możliwa. Z tego więc powodu na potrzeby analizy MLS w dochodzeniu ojcostwa rozwinięto analizę statystyczną wyrażoną przez prawdopodobieństwo ojcostwa. W celu umożliwienia jednoznacznego wnioskowania o pokrewieństwo osób na podstawie analizy jednopunktowej konieczne jest zbadanie kilku niezależnych loci. Ojcostwo można wykluczyć, jeżeli nie stwierdza się u dziecka dziedziczenia fragmentów od domniemanego ojca [49,50]. Podobne są badania śladów archeologicznych, np. pozostałości szkieletu. Te jednak, często napotykają przeszkodę w postaci zbyt małej ilości DNA do analiz (na analizę metodą wg Southerna potrzeba ok. μg wysokocząsteczkowego DNA). W tym przypadku badania opierają się na reakcji PCR, gdzie ilość DNA ogranicza się do 10 ng, a możliwa jest również analiza pojedynczych komórek.

PODSUMOWANIE

Badania hybrydyzacji DNA:DNA i DNA:RNA od ponad 20 lat stosowane są w diagnostyce molekularnej. W ostatnich latach wiele testów diagnostycznych przebiega z zastosowaniem metody PCR. Należy pamiętać, że w metodzie PCR dochodzi do amplifikacji badanego materiału genetycznego, stąd uzyskane wyniki nie informują na przykład o poziomie ekspresji danego genu. Inny jest również zakres wielkości analizowanych fragmentów DNA, który w przypadku PCR ulega znacznemu zmniejszeniu. Czy zatem należy oczekiwać zaniechania badań hybrydyzacyjnych? Na pewno nie. Wiele nowoczesnych testów diagnostycznych przebiega obecnie z wykorzystaniem PCR w pierwszym etapie, a następnie weryfikowaniem uzyskanego produktu PCR w drugim etapie poprzez hybrydyzację z sondą mo-

lekularną. Rozwijają się również nowe metody sekwencjonowania DNA oparte na hybrydyzacji z oligonukleotydami, dlatego hybrydyzacja należy nadal do bardzo czułych metod diagnostycznych.

LITERATURA

- [1] ANDERSSON L, BOHME J, RASK L, PETERSON PA. Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility genes: 1. Extensive polymorphism of DQ α and DQ β genes. *Anim Genet* 1986; **17**: 95–112.
- [2] BAR W, KRATZER A, MACHLER M, SCHMIDT W. Postmortem stability of DNA. *Forensic Science International* 1988; **39**: 59–70.
- [3] BAUTZ EKF, HALL B D. The isolation of T4 specific RNA on a DNA-celulose column. *Proc Natl Acad Sci US* 1962; **48**, 400–408.
- [4] BONDIOLI KR, ELLIS SB, PRYOR JH, WILLIAMS MW, HARPOLD MM. The use of male specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* 1989; **31**: 95–104.
- [5] BUITKAMP J, AMMER H, GELDERMANN H. DNA fingerprinting in domestic animals. *Electrophoresis* 1991; **12**: 169–174.
- [6] COTINOT C, KIRSZENBAUM M, LEONARD M, GIANQUINTO L, VAIMAN M. Isolation of bovine Y-derived sequence: potential use in embryo sexing. *Genomics* 1991; **10**: 646–653.
- [7] CRAWFORD AM, DODDS KG, EDE AJ, PIERSON CA, MONTGOMERY GW, GARMONSWAY HG, BEATTIE AE, DAVIES H, MADDOX JF, KAPPES SW, STONE RT, NGUEN TC, PENTY JM, LORDE EA, BROOM JE, BUITKAMP J, SCHWAIGER W, EPPLER JT, MATTHEW P, MATTHEWS ME, HULME DJ, BEH KJ, MCGRAW RA, BEATTIE CW. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics* 1995; **140**: 703–724.
- [8] CRICK F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 1970; **227**: 561–563.
- [9] DENIZIAK M, BARCISZEWSKI J. Diagnostyka molekularna roślin. *Post Biol Kom* 1995; **22** (6): 1–12.
- [10] GOODMAN HM, RICH A. Formation of a DNA – soluble RNA hybrid and its relation to the origin, evolution and degeneracy of soluble RNA. *Proc Natl Acad Sci US* 1962; **48**: 2101–2107.
- [11] GRAVES KT, RANEY N, EUNIS R, COOGLE L, REID R, BAILEY E, Van de GOOR L, COTHRAN EG, GUERIN G, SKOW L, BREEN M., BELL K. Equine gene mapping: synteny mapping DNA markers. *Anim Genet* 1996; **27** Suppl. 2: 73.
- [12] GRIMANELLI D, LEBLANC O, ESPINOSA E, PEROTTI E, GONZALES de LEON D, SAVIDAN Y. Non-Mendelian transmission of apomixis in maize-Tripsacum hybrids caused by a transmission ratio distortion. *Heredity* 1998; **80**: 40–47.
- [13] HALL DB, SPIEGELMAN S. Sequence complementarity of T2 DNA and T2 specific RNA. *Proc Natl Acad Sci US* 1961; **47**: 137–146.
- [14] JACOB F, MONOD J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 1961; **3**: 318–356.
- [15] JEFFREYS AJ, NEUMANN R, WILSON V. Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell* 1990; **60**: 473–485.
- [16] JEFFREYS AJ, ROYLE NJ, PATEL I, ARMOR JAL, MacLEOD A, COLLICK A, GRAY IC, NEUMANN R, GIBBS M, CROSIER M, HILL M, SIGNER E, MONCKTOR D. Principles and recent advances in human DNA fingerprinting. *DNA Fingerprinting Approaches and Applications* (ed. by T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffreys & R. Wolff) 1991: 1–19.

- [17] JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SW. Hypervariable minisatellite region in human DNA. *Nature* 1985; **314**: 67–73.
- [18] JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SW. Individual-specific „fingerprints” of human DNA. *Nature* 1985; **316**: 76–79.
- [19] JUNGEMAN M, SŁOMSKI R. Choroby dziedziczne – diagnostyka metodą polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA i sond molekularnych. *Kosmos* 1987; **36**(2): 201–212.
- [19a] KASPRZAK A, ZABEL M. Hybrydyzacja *in situ*. [W] Immunocytochemia. Zabel M (red.) Warszawa Wyd. Naukowe PWN 1999: 198–217.
- [19b] KASPRZAK A, SEIDEL J, ZABEL M. Localization of palcitonin mRNA in the rat Thyroid C-cells and endocrine cells of the lung by hybridocytochemistry. *Folia Histochem Cytobiol* 1996; **34**, Sup. 1: 9–10.
- [20] KURNICK NB. The determination of desoxyribonuclease activity by Methylgreen: application to serum. *Arch Biochem* 1950; **29**: 41–52.
- [21] KURYŁ J, ŻURKOWSKI M. Markery genetyczne u zwierząt gospodarskich. *Biotechnologia zwierząt* (praca zbiorowa pod redakcją L. Zwierzchowskiego, K. Jaszczaka i J.A. Modlińskiego) 1997: 119–152.
- [22] KWIATKOWSKA J. Identyfikacja genów *RalGDS*, *XPMC2H* i *TSC1* na chromosomie 9q34 człowieka. Rozprawa habilitacyjna. Wyd. OWN PAN Poznań, 1999.
- [23] KWIATKOWSKA J, KWIATKOWSKI DJ, SŁOMSKI R. Strategie poszukiwania nowych genów na przykładzie genów *RalGDS*, *XPMC2H* i *TSC1* człowieka. *Post Biol Kom* 1998; **25**, 81–92.
- [24] KWIATKOWSKA J, LISIECKA D, SOWIŃSKA J, MARSZAŁ E, EMICH-WIDERA E, CIĘSIELSKI T, SZCZEGÓŁA-PRZYMUSIAK A, NUC P, CHLEBOWSKA H, ZIMOWSKI J, ĄALAS-ZGORZALEWICZ B, SŁOMSKI R. Deletion screening and carrier detection in Duchenne muscular dystrophy in Polish population via direct analysis of DNA and RNA transcripts. *Biochimie* 1997; **79**: 439–448.
- [25] KWIATKOWSKA J, SŁOMSKI R. Powtórzenia sekwencji mikrosatelitarnych w genomie człowieka. *Post Biol Kom* 1996; **23** (1): 19–29.
- [26] KWIATKOWSKA J, TRZECIAK T, SŁOMSKI R. Powtórzenia DNA. *Post Biochem* 1995; **41** (1): 15–22.
- [27] LAMAR EE, PALMER E. Y encoded species-specific DNA in mice: Evidence that the Y chromosome exists in two polymorphic forms in inbred strains. *Cell* 1984; **37**: 171–177.
- [27a] LITWIN JA. Hybrydocytochemia. [W] Podstawy technik mikroskopowych. Litwin JA (red.) Collegium Medicum UJ, Kraków 1999: 102–107.
- [28] LOENING UE. The fractionation of low-molecular-weight rybonucleic acid. *Biochem J* 1969; **114** (2): 25–26.
- [29] MA RZ, BEEVER JE, DA Y, GREEN CA, RUSS I, PARK C, HEYEN DW, EVERTS RE, FISHER SR, OVERTON KM, TEALE AJ, KEMP SJ, HINES HC, GUERIN G, LEVIN HA. A male linkage map of the cattle (*Bos taurus*) genome. *J Heredity* 1996; **87**: 261–271.
- [30] MARMUR J, DOTY P, EIGNER J, SCHILDCRAUT C. Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: Physical Chemical Studies. *Proc Natl Acad Sci US* 1960; **46**: 461–476.
- [31] MARMUR J, DOTY P. Heterogenity in deoxyrybonucleic acids: 1. Dependence on composition of the configurational stability of DNAs. *Nature* 1959; **183**: 1427–1431.
- [32] MESELSON M, STAHL FW, VINOGRAD J. Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. *Proc Natl Acad Sci US* 1957; **43**: 581–588.
- [33] MEYER W, LIECKFELDT K, KUHL S, FREEDMAN Z, BORNER T, MITCHELL TG. DNA- and PCR-fingerprinting in fungi. *DNA Fingerprinting: State of the Science* (ed. by Pena S.D.J., Chakraborty R., Epplen J.T. & Jeffreys A.J.) 1993: 311–320.
- [34] MILEWSKI M, BAL J. Dynamic mutations. The role of unstable DNA sequences in human genetic disease. *Post Biochem* 1993; **39** (4): 228–236.

- [35] MOORE SS, BARENDSE W, BERGER KT, ARMITAGE SM, HETZEL DJS. Bovine and ovine DNA microsatellites from EMBL and GENE BANK databases. *Anim Genet* 1992; **23**: 463–467.
- [36] NYBOM H, KRAFT T. Application of DNA fingerprinting to the taxonomy of European blackberry species. *Electrophoresis* 1995; **16** (9): 1731–1735.
- [37] NYBOM H. Applications of DNA fingerprinting in plant population studies *DNA Fingerprinting: State of the Science* (ed, by Pena S.D.J., Chakraborty R., Epplen J.T. & Jeffreys A.J.) 1993: 293–309.
- [38] ORAVEERAKUL K, CHOI CS, MOLITOR TW. Detection of porcine parvovirus using nonradioactive nucleic acid hybridization. *J Vet Diagn Invest* 1990; **2**: 85–91.
- [39] PENA SDJ, CHAKRABORTY R. Paternity testing in the DNA era. *Science* 1994; **19**: 204–209.
- [40] PLANTE Y, SCHMUTE S, LANG KDM, MOKER JS. Detection of leucochimaerism in bovine twins by DNA fingerprinting. *Anim Genet* 1992; **23**: 295–302.
- [41] POWELL W, MACHRAY GC, PROVAN J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1996; **1**: 215–222.
- [42] POWELL W, MORGANTE M, MCDEVITT R, VENDRAMIN GG, RAFALSKI JA. Polymorphism simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7759–7763.
- [43] RAFALSKI AJ, TINGEY SV. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet* 1993; **9**: 275–280.
- [44] REICHERT M, GRUNDBOECK J. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych – zastosowanie w inżynierii genetycznej i diagnostyce. *Med Wet* 1993; **49** (6): 256–260.
- [45] RICH A. A hybrid helix containing both deoxyribose and ribose polynucleotides and its relation to the transfer of information between the nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci US* 1960; **46**: 1044–1053.
- [46] ROHRER GA, ALEXANDER LJ, HU Z, SMITH TPL, KEELE JW, BEATTLE CW. A comprehensive map of porcine genome. *Genome Res* 1996; **6**: 371–391.
- [47] ROSOCHACKI SJ, HILLEL J, JASZCZAK K, ZAWADZKA M. DNA fingerprints generated by R.18.1 DNA probe in two stocks of chicken: Green Legged Partridge (GLP) and Rhode Island Red (RIR). *J Appl Genet* 1997; **38**: 173–178.
- [48] SAKOWICZ T. Sekwencje mikrosatelitarne w genomach roślin. *Post Biol Kom* 1997; **24** (9): 81–92.
- [49] SŁOMSKI R, JANISZEWSKA H, KWIATKOWSKA J, CHLEBOWSKA H. Jednopunktowa a wielopunktowa analiza DNA: własne obserwacje z badań nad dochodzeniem spornego ojcostwa z zastosowaniem wielopunktowej analizy DNA. *Arch Med Sąd i Krym* 1994; **XLIV**: 29–34.
- [50] SŁOMSKI R, KWIATKOWSKA J, CHLEBOWSKA H, SIEMIENIAKO B, SŁOMSKA M. Polimorficzne sekwencje DNA i ich zastosowanie w dochodzeniu spornego ojcostwa. *Kosmos* 1994; **43** (3/4): 479–492.
- [51] SŁOMSKI R, KWIATKOWSKA J. Diagnostyka molekularna chorób genetycznych. *Post Biol Kom* 1995; **22** (6): 27–40.
- [52] SŁOMSKI R, SIEMIENIAKO B, KWIATKOWSKA J, NAPIERAŁA D, GRONEK P. Diagnostyka molekularna. *Post Biol Kom* 1998; **25** (10): 9–28.
- [53] SMITH HO, WILCOX KW. A restriction enzyme from *H. Influenzae*. 1. Purification and general properties. *J Mol Biol* 1970; **51**: 379–391.
- [54] SOUTHERN EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; **98**: 503–517.
- [55] SPIEGELMAN S, HALL BD, STORCK R. The occurrence of natural DNA-RNA complexes in *E. coli* infected with T2. *Proc Natl Acad Sci US* 1961; **47**: 1135–1141.

- [56] TEALE AJ, KEMP SJ, MORRISON WI. The major histocompatibility complex and disease resistance in cattle. W: *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals* J.J.B. Owen RFE Axford C.A.B. International Walingford United Kingdom. 1991: 86–99.
- [57] WARNER RJ, RICH A, HALL CE. Electron microscope studies of ribosomal clusters synthesizing hemoglobin. *Science* 1962; **138**: 1399–1403.
- [58] WINIARCZYK S. Zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce weterynaryjnej. *Medycyna Wet.* 1993; **49** (6): 260–264.
- [59] WROGEMANN K, BIANCALANA V, DEVYS D, IMBERT G, TROTTIER Y, MANDEL J-L. Microsatellites and disease: A new paradigm. *DNA Fingerprinting: State of the Science* (ed, by Pena S.D.J., Chakraborty R., Epplen J.T. & Jeffreys A.J.) 1993: 141–152.
- [60] ZAMENOFF S, HATTIE EA, LEIDY G. Studies on the chemistry of the transforming activity: 1. Resistance to physical and chemical agents. *J Exp Med* 1953; **98**: 373–395.

Adres autorów: ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań

ZAKOŃCZENIA CHROMOSOMÓW: TELOMERY, TELOMERAZA I BIAŁKA WSPÓŁDZIAŁAJĄCE

THE CHROMOSOME ENDS: TELOMERES, TELOMERASE AND TELOMERE BINDING PROTEINS

Marlena SZALATA¹, Ryszard SŁOMSKI^{1,2}

¹Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza
im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań; ²Zakład Genetyki Człowieka, PAN, Poznań

Streszczenie: Telomery stanowiły od dawna obszar zainteresowania cytologów, jako statyczne elementy chroniące końce chromosomów. Odkrycie ich udziału w starzeniu komórek, replikacji, w kontroli cyklu komórkowego oraz przede wszystkim w procesach nowotworowych czyni z telomerów bardzo popularny obiekt badań wielu dziedzin wiedzy.

Summary: Telomeres were for many years of interest to cytologists, as static elements protecting chromosome ends. Discovery of their involvement in cellular aging and replication, cell cycle checkpoint and first of all in tumorigenesis makes the study of telomeres very popular to many areas of science.

Pierwsze obserwacje telomerów zostały przeprowadzone już w latach trzydziestych przez Mullera i McClintock [8,9,79]. W latach siedemdziesiątych zidentyfikowano sekwencje DNA zlokalizowane w telomerach i od tej pory datuje się bardzo żywy rozwój badań nad telomerami. Telomery są dynamicznymi, wyspecjalizowanymi strukturami nukleoproteinowymi występującymi na końcach eukariotycznych chromosomów, o silnie konserwatywnej budowie. Końce te są syntetyzowane przez telomerazę będącą odwrotną transkryptazą [4,5,8,9,17,61,62,64,72,77,79]. Sekwencje telomerowe zbudowane są z krótkich, zazwyczaj 5–8 pz, tandemowo powtórzonych jednostek bogatych w G (nić 3') i odpowiednio w C (nić 5') z jednoniciowym końcem 3', bogatym w G (np. u strunowców powtórzenia TTAGGG) [8,65]. Telomery zapewniają stabilność chromosomów (brak fuzji, rekombinacji i degradacji) i zapobiegają utracie informacji genetycznej w czasie replikacji [10,86,92]. Podczas każdej replikacji komórki dochodzi do utraty krótkiej sekwencji telomerowej, która nie podlega duplikacji. Skracanie telomerów może być wykorzystane jako zegar wewnątrzkomórkowy, co sugeruje ich rolę w starzeniu komórek, kontroli cyklu

komórkowego i prawdopodobnie w procesach nowotworowych. Wszystko to czyni telomery interesującym i bardzo popularnym obiektem badań. Telomery są również miejscem wiązania licznych białek ważnych dla integralności i odpowiednich funkcji końców chromosomalnych. Jednoniciowy koniec jest rozpoznawany jako substrat przez telomerazę. Telomeraza oprócz utrzymania istniejących odcinków telomerowych może tworzyć nowe na złamanych chromosomach w procesie tzw. leczenia chromosomów (ang. *chromosome healing*) [5,94]. Funkcje telomerów nie są jeszcze w pełni poznane, a ich duże znaczenie wynika z następujących obserwacji:

- Wiele typów komórek eukariotycznych wymaga większych odcinków telomerowych powtórzeń niż jest to wymagane dla zapobiegania utracie sekwencji podczas kolejnych replikacji DNA [80].
- Całkowita ilość telomerowego DNA jest charakterystyczna dla gatunków i tkanek [62,80].
- Najmniejsze zmiany w sekwencji DNA regionu telomerowego prowadzą do katastrofalnych konsekwencji dla komórki [58].
- Pewne wirusy i plazmidy występujące w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych mają inne mechanizmy zapobiegania utracie końców (między innymi: struktura szpilki do włosów i/lub rekombinacja), podczas gdy praktycznie wszystkie zwierzęta, rośliny i jednokomórkowe organizmy wykorzystują wydłużanie przez telomerazę [99].

PODZIAŁY KOMÓRKI A TELOMERY

Telomery odgrywają ważną rolę podczas podziałów komórkowych w rozpoznawaniu chromosomów homologicznych [83]. Przed koniugacją chromosomów dochodzi do polaryzacji jądra. Końce chromosomów układają się razem na wewnętrznej powierzchni błony jądrowej – przypuszczalnie telomery ułatwiają w ten sposób wyszukiwanie się chromosomów homologicznych [91]. Parowanie chromosomów nie jest jednak inicjowane na telomerach i centromerach, a ruch telomerów chromosomów homologicznych jest raczej wynikiem niż przyczyną parowania. Inicjacja tworzenia kompleksu synaptonemalnego zachodzi bardziej proksymalnie od telomerów [31,89]. Podczas profazy pierwszego podziału mejotycznego telomery skupiają się w pobliżu centrosomu (zwierzęta i pewne mikroorganizmy) lub biegunów wrzeciona kariokinetycznego (rośliny) tworząc tzw. stadium „bukietu”, a w czasie leptotenu i zygotenu dochodzi do ich zbliżenia. Kondensacja chromosomów w pachytenie prowadzi do powstania biwalentów i rozprasza telomery [91]. W tworzeniu skupień telomerowych biorą przypuszczalnie udział mikrotubule cytoplazmatyczne oraz białko Ndj1 wiążące się z telomerowym DNA [32,89].

Defekty telomerów lub białek związanych z telomerami mogą zaburzyć segregację chromosomów podczas mitozy [44,45]. Obecność białka TRF2 pozwala rozróżnić

naturalne końce chromosomów od powstałych przerw w dwuniciowym DNA, a utrata białka TRF2 prowadzi do wystąpienia fuzji końców chromosomów obserwowanych w czasie metafazy i anafazy [2,53,92]. U *Tetrahymena thermophila* ze zmutowaną sekwencją telomerową dochodzi do opóźnień lub zablokowania anafazy. Chromatydy nie rozdzielają się całkowicie, lecz podlegają rozciąganiu [58]. Brak białka Taz1p u *Schizosaccharomyces pombe* prowadzi do zwiększenia długości telomerów, utraty represji transkrypcyjnej (ang. *silencing*) i zmiany struktury końców chromosomów, a nawet braku mejozy (telomery skupiają się) [80]. Białko Ndj1, wiążące się z telomerami podczas profazy mejotycznej, jest odpowiedzialne u *Saccharomyces cerevisiae* za wydajną segregację chromosomów podczas mejozy [19]. Brak białka powoduje: opóźnione tworzenie się elementów aksjalnych; dłuższe opóźnienia w inicjacji synaps i zakończeniu pierwszego podziału mejotycznego; defekt w telomerowej lokalizacji białka Rap1p; zwiększenie częstotliwości nondysjunkcji i przedwczesnego rozdzielania chromatyd siostrzanych (ang. *precocious sister separation*, PSS); zredukowanie poziomu crossing-over, rekombinacji mejotycznej, a także sporulacji i żywotności spor oraz wadliwą dystrybucję tylko liniowych heterologów [19].

STRUKTURA TELOMERÓW, MECHANIZMY ALTERNATYWNE

Telomery są zbudowane z krótkich sekwencji bogatych w G, specyficznych gatunkowo, związanych z wieloma białkami. Końce chromosomów podlegają replikacji przez enzym telomerazę, będącą odwrotną transkryptazą. Z reguły inne mechanizmy utrzymania długości telomerów występujące przy braku aktywności telomerazy nie są tak efektywne, jednak u niektórych organizmów mogą być równie wydajne. Dobrym przykładem są występujące u *Drosophila* retrotranspozony, a u innych *Diptera* rekombinacje. Telomery człowieka, podobnie jak większości strunowców, *Trypanosoma*, śluzowców, grzybów, skorupiaków i niektórych pierścienic [52], składają się z długich, tandemowych powtórzeń 5'TTAGGG3' o długości około 15 kpz. Wielkość powtórzeń telomerowych wynosi od setek do tysięcy. Tak duże podobieństwo świadczyć może o wysokiej konserwatywności sekwencji telomerowych wśród organizmów, pochodzącej od wspólnego przodka, a istniejące modyfikacje powstawały prawdopodobnie niezależnie u różnych organizmów [52].

Pierwotniaki. U pierwotniaków struktura chromatyny na końcach jest stosunkowo prosta. W makronukleusie występują bardzo liczne minichromosomy odpowiadające pojedynczym genom, mające bardzo krótkie telomery o sekwencji TTTTGGGG. U *Oxytricha* telomery obejmują 20 pz dwuniciowego DNA oraz sekwencję jednoniciową T₄G₄T₄G₄ na końcu 3', a u *Euplotes* 28 pz dwuniciowego DNA zakończonego sekwencją T₄G₄T₄G₂ [33].

U *Paramecium* występują powtórzenia TTGGGG oraz TTTGGG. Tylko jeden gatunek ma telomery zbudowane głównie z sekwencji TTGGGG. Obserwowana różnorodność może wynikać z wprowadzenia dTTP zamiast dGTP przez telomerazę [70]. Inna możliwość to „zacinanie się” telomerazy (ang. *stutters*) i cofnięcie o jedną pozycję podczas syntezy powtórzeń.

Trypanosoma mają typową sekwencję TTAGGG. U *Trypanosoma cruzi* stwierdzono wielką różnorodność długości telomerów u różnych szczepów, co wynika z bardzo wczesnego zróżnicowania ewolucyjnego [32].

Głony (*Chlorarachniophyte*). Glony mają chloroplasty pochodzące od endosymbiotycznych eukariotycznych glonów. Organellum zawiera zredukowane jądro, zwane nukleomorfem, z małymi liniowymi chromosomami. Telomery na ich końcach mają inną sekwencję (TCTAGGG) niż chromosomy jądrowe. Endosymbiont prawdopodobnie koduje własną telomerazę [37].

Płazińce. Podobnie jak strunowce mają sekwencję $(TTAGG)_n$ [52].

Nicienie. Posiadają sekwencje $(TTAGGC)_n$ lub $(TTGCA)_n$ [52].

Owady. U *Drosophila* telomery zbudowane są z długich, powtarzających się sekwencji $(TTAGG)_n$, które jednak są generowane nie przez telomerazę, a przez wielokrotne transpozycje dwóch retrotranspozonów bez LTR, *HeT-A* (~ 6 kpz) i *TART* (~ 10 kpz) [8,23,24]. *HeT-A* przyłącza się do końców chromosomów w procesie „leczenia chromosomów” [23,24].

Retrotranspozony bez LTR mają łańcuch oligo(A) łączący je z chromosomem. *HeT-A* i *TART* kodują polipeptydy z motywem palca cynkowego, co jest typowe dla białka Gag retrowirusów i retrotranspozonów. *HeT-A* stanowi wyjątek, ponieważ nie koduje własnej odwrotnej transkryptazy, ale mimo to występuje częściej od *TART*. Różnią się transpozycją tylko do telomerów i posiadaniem dużych nie kodujących regionów, co może być ważne dla tworzenia chromatyny telomerowej. *HeT-A* tworzą szeregi głowa-ogon na końcach chromosomów. Promotor jest zlokalizowany na końcu 3' elementu, w przeciwieństwie do innych retrotranspozonów bez LTR [24].

Bombyx mori ma sekwencje telomerowe $(TTAGG)_n$ oraz retrotranspozony *TRAS1* i *SART1*. *TRAS1* ma własny promotor w 5'UTR, natomiast u *SART1* promotora nie znaleziono [90].

U *Diptera*, *Lepidoptera*, *Hymenoptera* telomery mają sekwencję $(TTAGG)_n$ uboższą o jedną zasadę na końcu w porównaniu ze strunowcami. Mechanizm ich wydłużania nie jest do tej pory znany, może to być telomeraza, ale nie ma dotąd potwierdzenia o jej udziale [9].

Chironomus, podobnie jak inne owady ma szeregi powtórzeń typu „głowa-ogon”, ale osiągają one bardzo duże rozmiary 340–350 pz. Mechanizm ich powstawania nie jest dotąd znany, nie wykryto u nich aktywności telomerazy zależnych od RNA i retrotranspozonów ani konwersji genów lub rekombinacji obustronnej zależnych

od DNA [9,80]. Przypuszczalnie telomery powstają przez mechanizm konwersji genów.

Moskit *Anopheles gambiae* nie wykazuje sekwencji $(TTAGG)_n$, prawdopodobnie wykorzystywanym mechanizmem, podobnie do *Chironomus*, jest rekombinacja między końcami homologicznych chromosomów [9].

Drożdże. Tandemowe powtórzenia TG_{1-3} , o długości ok. 330 pz, tworzą miejsca wiązania białka Rap1p, wpływającego na długość telomerów. U *S. pombe* telomerowe powtórzenia $TTAC(A)G_{2-5}$ współdziałają z białkiem Taz1p [80, 82].

Mechanizm alternatywny został po raz pierwszy zaobserwowany u drożdży ze zmutowanym genem *est1*, kodującym element telomerazy. Mała subpopulacja *S. cerevisiae* może wydłużać telomery przez amplifikację powtórzeń telomerowych Y' i kodowanych przez telomerazę krótkich powtórzeń TG_{1-3} , które położone są proksymalnie do powtórzeń Y'. Aktywność ta wymaga obecności genu *rad52*, zaangażowanego w większości typów rekombinacji mitotycznych. Podobny mechanizm występuje również u *Kluyveromyces lactis*, jednak nie jest optymalnym rozwiązaniem, a długość telomerów nie jest ustabilizowana.

Eulemur. U lemurów występują pericentromerowe sekwencje telomerowe, a ich zmienność gatunkowa może służyć do określenia kierunku ewolucji. Nietelomerowa dystrybucja powtórzeń $(TTAGGG)_n$ jest unikalna wśród naczelnych. Takie zjawisko nie ma żadnego uzasadnienia selekcyjnego [35].

Człowiek. Sekwencja $(TTAGGG)_n$ jest utrzymywana przez telomerazę. Telomery człowieka mają, w przeciwieństwie do niższych eukariota, długie końce jednoniciowe bogate w reszty G o długości ≥ 45 pz [64,70], co wynika nie tylko z utraty odcinków DNA podczas replikacji, ale także z degradacji nici 5' w trakcie lub tuż po replikacji, niezależnie od obecności lub braku telomerazy.

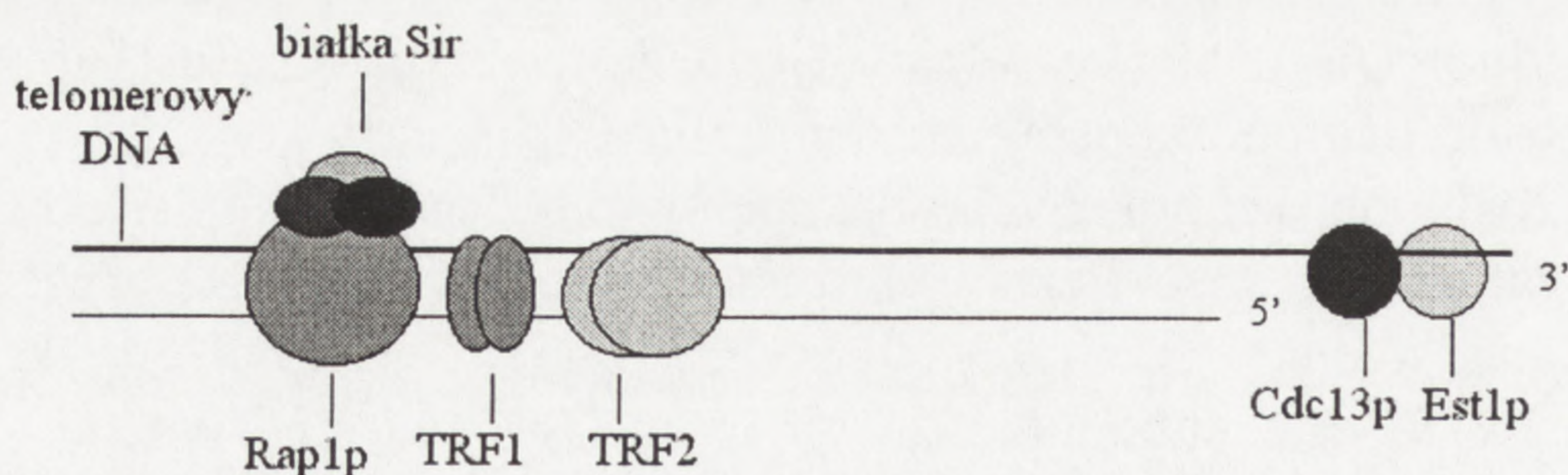
Istnieje również mechanizm alternatywny wydłużania telomerów przez rekombinacje, ale nie jest on tak wydajny jak w przypadku telomerazy. W niektórych nieśmiertelnych liniach komórek człowieka, nie wykazujących aktywności telomerazy również proponowana jest rekombinacja, ale telomery są wyjątkowo długie i heterogenne [27,99].

Arabidopsis. Sekwencja $(TTAGGG)_n$ jest typowa dla wielu roślin. Wyjątkiem są *Alliaceae*, które mają na końcach chromosomów wysoce powtarzalne sekwencje satelitarne i/lub rDNA, bogate w pary GC. Częste rekombinacje i/lub konwersje mogą zapewnić ochronę końców chromosomów [81].

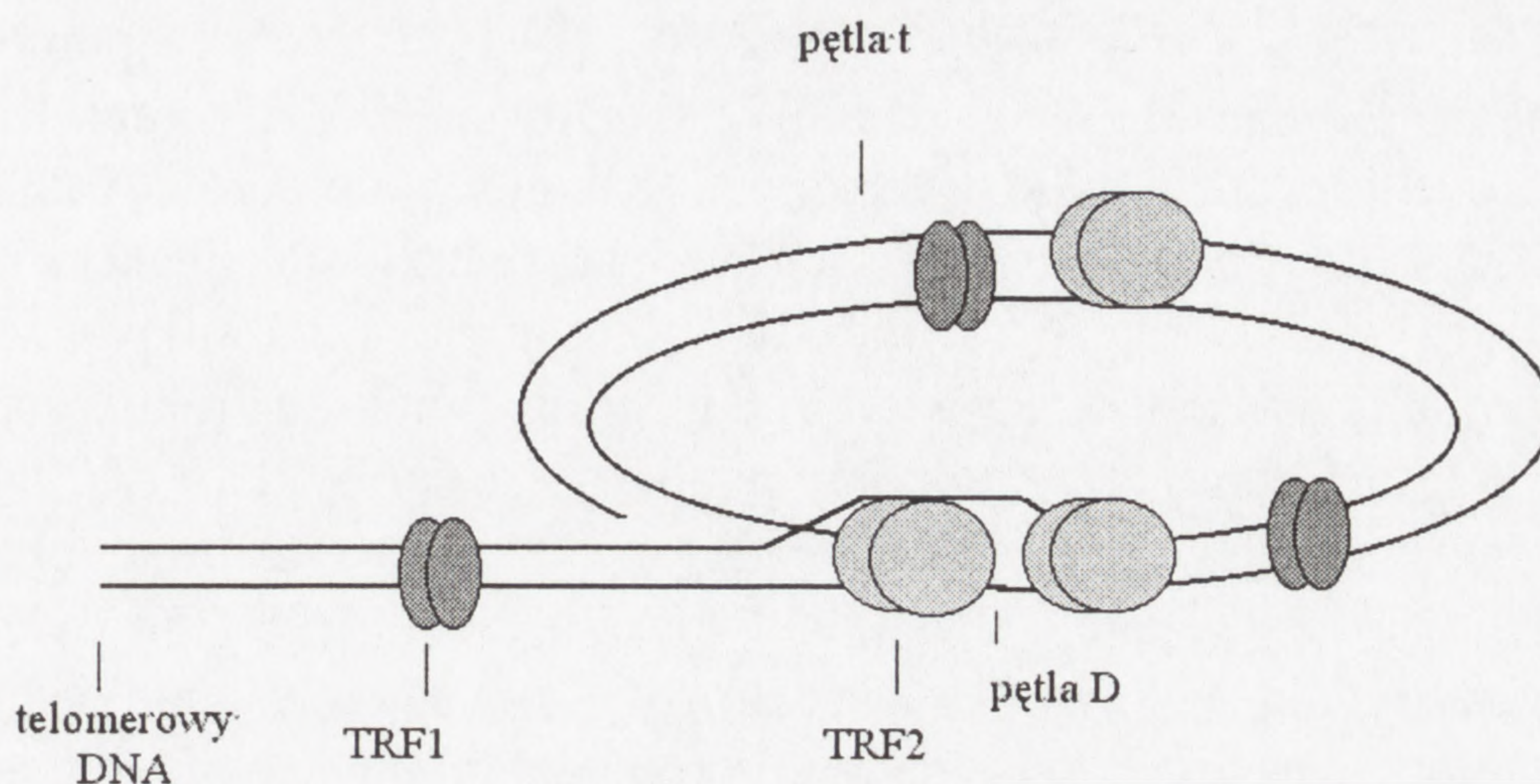
U wielu roślin oprócz typowych sekwencji telomerowych $(TTAGGG)_n$, często występują gatunkowo specyficzne sekwencje subtelomerowe TAS, związane z telomerami (ang. *telomere associated sequence*, TAS). U *Chlorella* wykazano występowanie w rejonie subtelomerowym chromosomu I nie-wirusowych retrotranspozonów Zepp (ang. *non viral Line-like*) [49], zawierających koniec poli(A), skrócenia 5', ORF retrowirusowej odwrotnej transkryptazy i flankujące duplikacje docelowe. Jednocześnie zaproponowano nowy mechanizm transpozycji: insercje

każdego elementu *Zepp* w inny element *Zepp*, gdzie koniec poly(A) wraz z tandemowymi powtórzeniami zwrócony jest w kierunku centromeru. *Zepp* podlega transkrypcji pod wpływem szoku termicznego [49]. U *Arabidopsis* występują pojedyncze kopie sekwencji subtelomerowych, a w chromosomach 2 i 4 tandemowo powtórzone sekwencje rDNA. U *Nicotiana glauca* wykazano występowanie dwóch tandemowo powtórzonych sekwencji związanych z telomerami, *NP3R* i *NP4R* [15]. Sekwencje te mogą służyć jako dobre markery dla mapowania genetycznego, a także jako potencjalne substraty dla telomerazy podczas „leczenia” telomerów na końcach złamanych chromosomów [15].

Według klasycznego modelu budowy końców chromosomów telomery tworzą wysoce konserwatywne tandemowe powtórzenia sekwencji bogatych w GT. Na końcu 3' występuje pojedyncza nić bogata w G, która jest bardzo ważna dla zachowania funkcji i długości telomerów. W procesy te zaangażowane są białka związane z jedno- i dwuniciowym telomerowym DNA (rys. 1). Liczba białek wiążących się z telomerowym DNA wpływa na długość telomerów. Białko TRF2 wiążące się z dwuniciowym DNA wpływa też na jednoniciowe końce, brak TRF2 powoduje utratę końców G, indukcję drogi zależnej od p53 i fuzję końców chromosomów [53,92], a mechanizm tego działania może być wytłumaczony przez najnowszy model pętli t (rys. 2) [2,41,42]. Telomery u ssaków tworzą wielkie końcowe pętle widoczne pod mikroskopem elektronowym, nazwane pętlami t (od „telomerów”) [41,42]. Dwuniciowy DNA tworzy pętlę, natomiast jednoniciowe końce układają się wewnątrz dwuniciowego DNA, tworząc małe pętle D i w ten sposób chroniąc końce chromosomów. Sugeruje się wiązanie TRF2 właśnie w tych miejscach, co pozwala wytłumaczyć ich funkcje. Pętle te zaobserwowano w komórkach ssaków *in vivo* po zastosowaniu psoralenu do stabilizacji pętli, przed usunięciem białek [41,42]. Nie jest jasne, czy wszystkie telomery tworzą pętle t w trakcie cyklu komórkowego. Białko TRF1 wiąże się z dwuniciowym DNA w obrębie pętli t. Jednocześnie tankyryza, będąca inhibitorem TRF1, może stanowić jeden z elementów regulacji tworzenia i utrzymania pętli [22]. W procesie tym biorą również udział białka związane z mechanizmem naprawy dwuniciowych przerw w DNA [2]. Znanych jest wiele białek wiążących się z jednoniciowym telomerowym DNA



RYSUNEK 1. Klasyczny model budowy telomerów z uwzględnieniem białek wiążących się z dwuniciowym i jednoniciowym DNA [41,42,46]



RYSUNEK 2. Model pętli umożliwia wyjaśnienie różnic między zachowaniem białek TRF1 i TRF2 wiążących się z telomerowym DNA. Białko TRF1 jest negatywnym regulatorem długości telomerów i zapobiega wiązaniu się telomerazy. Białko TRF2 także wpływa na sekwencje jednoniciowe, spinając końce pętli i zapobiegając fuzji końców [41,42,92]

(heterodimer $\alpha\beta$ z *Oxytricha*, białko z *Xenopus*, p95 z *Tetrahymena*). Przypuszczalnie telomery u *Oxytricha* nie tworzą pętli t, ponieważ są na to za krótkie. Również telomery u drożdży są za krótkie i zbyt zróżnicowane do tworzenia tej pętli, a obecność białek Rap1p wydaje się temu zapobiegać. Do tej pory nie znaleziono wielu białek wiążących się z jednoniciowym DNA u drożdży, chociaż wydaje się, że białko Cdc13p i Est1p mogą pełnić tę rolę, a tym samym mogą regulować tworzenie się pętli. Drożdże stanowią więc dobry model do sprawdzenia, czy pętle t są filogenetycznie konserwatywne.

Powstawanie pętli t tłumaczy możliwość rozróżniania końców chromosomów od uszkodzeń DNA. Jednocześnie rodzą się nowe pytania związane z dostępnością końca bogatego w G dla telomerazy. W poprzednim modelu wystarczyło usunąć białka związane z DNA, tutaj trzeba rozwinąć strukturę DNA, co wymaga współdziałania helikazy. Skracanie telomerów oraz utrata funkcji w komórkach pozbawionych telomerazy może wynikać z rozbicia struktury t. Przypuszczalnie minimalna długość telomerów wymagana jest dla utworzenia pętli t, a kiedy zostanie przekroczona, końce chromosomów nie mogą być dłużej chronione [41,42].

EFEKT POZYCYJNY TELOMERÓW

Geny zlokalizowane w obrębie telomerów lub w ich pobliżu podlegają represji transkrypcyjnej (wyciszanie telomerowe, ang. *telomere silencing*), wynikającej z efektu pozycyjnego telomerów TPE (ang. *telomere position effect*, TPE). Kilka białek jest związanych z tym efektem: Sir2p, Sir3p i Sir4p oraz Rap1p u drożdży. Ponadto Sir2p limituje rekombinacje mitotyczne i inhibuje transkrypcję genu markerowego przy powtórzeniach rDNA [54]. Żadne z białek Sir nie ma motywu

łączącego się z DNA i przypuszcza się, że wiążą się z DNA za pomocą białek Rap1p. Koniec C białka Rap1p oddziałuje z Sir3p, Sir4p, Rif1p oraz Rif2p, przy czym te ostatnie biorą udział tylko w utrzymaniu długości telomerów. Taki kompleks otaczający DNA uniemożliwia jego transkrypcję, tworzy się nieaktywna heterochromatyna [12]. Białko Sir2p również tworzy kompleks z Rap1p przez Sir3p i Sir4p. Nadprodukcja białek represyjnych, np. Sir3p, zwiększa efekt wyciszenia na sąsiadujące z telomerami geny proporcjonalnie do ilości białka [12,29,46,68,88]. Utrata motywu wiążącego się z białkiem Rap1p uwalnia prawdopodobnie białka Sir, umożliwiając ich wiązanie do hipotetycznego locus *AGE* (tzn. wiek), odpowiedzialnego za regulację długości życia u drożdży [54]. Przeniesienie się kompleksu białek Sir z telomerów do rDNA w jąderku prowadzi do unieczynnienia tego locus. Jednocześnie dochodzi do odblokowania aktywności loci *HM*, powodując wzrost sterylności. Delecje genów *est1*, *est2* i *tlc1* nie wpływają znacząco na efekt pozycyjny, co sugeruje brak wpływu obecności telomerazy na inaktywację genów w pobliżu telomerów [29]. Prawdopodobnymi czynnikami, które są związane z zachowaniem represji transkrypcyjnej, są białko Ku albo jedno z białek Sir [2].

Zbliżenie genów euchromatynowych do heterochromatyny w wyniku rearanżacji chromosomalnej lub transpozycji może spowodować represję transkrypcyjną tych genów w zestawieniu z komórkami, w których podlegają one normalnej ekspresji. Zjawisko to, noszące nazwę pozycyjnego efektu pstrokatości (ang. *position effect variegation*, PEV), zaobserwowano u *Trypanosoma brucei*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Drosophila melanogaster* [21,46,60].

POCHODZENIE TELOMERAZ I RETROTRANSPOZONÓW BEZ LTR

Telomerazy z ewolucyjnie odrębnych organizmów zawierają podjednostkę RNA, sugerując wysoką konserwatywność tego mechanizmu syntezy DNA. Potwierdza to konserwatywność budowy podjednostki katalitycznej TERT (pierwotniaki, grzyby, ssaki) [76]. Chociaż nie jest jasne pochodzenie retrotranspozonów u *Drosophila* oraz telomeraz, to wydaje się, że wyodrębniły się wraz z pierwszymi eukariontami, albo nawet przed nimi [76,77]. Opierając się na polimerazie RNA zależnej od RNA (RRPs) retroelementy można podzielić na dwie grupy obejmujące: retrotranspozony LTR, wirusy RNA, wirusy DNA oraz retrotranspozony bez LTR, elementy bakteryjne i organellowe. Podjednostka katalityczna telomerazy lokuje się w grupie retrotranspozonów o krótkich powtórzeniach terminalnych (non-LTR) (ang. *non-long terminal repeat retrotransposons*). Bardziej prawdopodobne jest wykształcenie się telomeraz z retrotranspozonów bez LTR niż w odwrotnej kolejności [28]. Wydaje się, że telomeraza wyodrębniła się wcześniej od powstania komórek eukariotycznych, a tym samym organizmy, u których brak telomerazy, musiały utracić

ją w wyniku ewolucji i na jej miejsce wykorzystać inny mechanizm [76]. Przypuszcza się, że *HeT-A* powstał w wyniku ewolucji z telomerazy [80], podczas gdy *TART* jest prawdopodobnie pochodną retotranspozonu bez LTR, współdziałającego z lokalizacją telomerów.

BIAŁKA ZWIĄZANE Z TELOMERAMI

Obecność telomerowego DNA na końcach chromosomów nie jest jedynym czynnikiem wystarczającym dla funkcjonowania telomerów. Liczba nowych białek związanych z telomerami i aktywnością telomerazy ciągle powiększa się. U pewnych pierwotniaków, takich jak: *Oxytricha* i *Euplotes*, białka podlegają ścisłej kontroli, z kolei u pączkujących drożdży bardzo wiele białek wpływa na długość telomerów. Białka telomerowe chronią końce chromosomów przed degradacją nukleolityczną i fuzją końców. Obecność bardzo różnorodnych białek wiążących się z telomerami sugeruje ich funkcję nie tylko w wydłużaniu końców, ale także jako miejsc wiązania i przechowywania białek związanych z utrzymaniem struktury i naprawą DNA [68,73,80]. Białka związane z telomerami można podzielić na dwie grupy [80]:

1. Białkowe komponenty telomerazy, białka ważne dla aktywności telomerazy *in vivo* oraz białka izolowane wraz z enzymem. Przedstawiono je w następnym rozdziale dotyczącym budowy telomerazy.
2. Białka tworzące chromatynę telomerową.

Najbardziej znanym białkiem drugiej grupy jest Rap1p z *S. cerevisiae* oraz z *Kluyveromyces lactis*, wiążące się z dwuniciowym telomerowym DNA i będące negatywnym regulatorem telomerazy [3,66,74]. Białko to ma dwie domeny Myb (tworzą one motyw helisa-skręt-helisa), wiążące się z DNA, połączone przez 40-aminokwasowy łącznik dołączony do dwóch sekwencji GGTGT, rozdzielonych 3 pz. Mutacje tego białka powodują gwałtowny wzrost długości telomerów. Około 15 białek Rap1 wiąże się z dwuniciowym DNA i przez zmianę struktury telomerów zapobiega dołączaniu telomerazy. Wydaje się, że sekwencje telomerowe u drożdży służą jako miejsce zakotwiczenia bardzo wielu białek *in vivo*, które wiążą się z telomerami przez między innymi oddziaływanie z białkami Rap1p [74]. Znalaziono również 2 inne białka Rif1p i Rif2p (ang. *Rap1 interacting factors*, Rifs), które współdziałają z Rap1p [3].

Aby skomplikować obraz, Rap1p współdziała z dwoma kompleksami białkowymi: heterodimerem Ku i Mre11/Rad50/Xrs2 [2,12,29,67,71], łącząc telomery z naprawą DNA. Istnieje uniwersalny mechanizm naprawy dwuniciowych uszkodzeń DNA (ang. *double strand breaks*, DSB), jest to: rekombinacja homologiczna lub/i łączenie się niehomologicznych końców (ang. *nonhomologous end joining*, NHEJ) [68,73]. Uruchamia on 3 dobrze scharakteryzowane kompleksy białkowe:

1. Heterodimer Ku związany z kinazą białkową zależną od ATM stymulowaną przez DNA (ang. *ATM-related DNA-stimulated protein kinase*)
2. Białka Mre11/Rad50/Xrs2 o aktywnościach endo- i egzonukleolitycznych. Białko Mre11 uczestniczy w rekombinacji mejotycznej i w naprawie mitotycznej DNA, a także w nieuprawnionych rekombinacjach, łączeniu końców i w utrzymaniu telomerów [12,14].
3. Kompleks Xrcc4 i ligazy IV.

Mutacje Ku wpływają na przestrzenną organizację telomerów w jądrze [2,29,68]. Białko Ku wiąże się z dwuniciowym telomerowym DNA, jak i z heterochromatyną subtelomerową, a także chroni końce telomerowe u drożdży, podobną funkcję może pełnić również u ssaków [2,6]. Przypuszcza się, że białka Ku70, Ku80 i podjednostka katalityczna jądrowej kinazy serynowo-treoninowej DNA-PK_{cs} współdziałają z białkiem Trf2 w tworzeniu pętli t u ssaków. DNA-PK może uruchamiać lub wpływać na aktywność egzonukleazy 5'-3', tworzącej jednoniciowe sekwencje na końcach chromosomów. Kompleks białek Mre11/Rad50/Nbs1 prawdopodobnie jest egzonukleazą, a powstałe końce jednoniciowe są wykorzystywane przez Trf2 do tworzenia pętli t. Nieobecność DNA-PK_{cs} zwiększa częstotliwość rekombinacji nieuprawnionych w obrębie telomerów [2]. Białko Ku może wiązać się do telomerów przez kompleks białek Sir, również kieruje białka Sir do dwuniciowych uszkodzeń DNA [2,12,68,73]. Przypuszczalnie kierowanie białek Sir do miejsc naprawy, prowadząc do powstawania nieaktywnej heterochromatyny, zapobiega fałszywej aktywacji genu w wyniku naprawy DNA [12,68]. Białko Sir3p uwalniane jest z telomerów w odpowiedzi na uszkodzenie DNA w fazie S i wpływa na jego naprawę, niezależnie od typu komórki. Wymaga współdziałania z białkami punktów kontroli uszkodzeń DNA kodowanymi przez *mec1* (homolog *ATM*, którego mutacje wywołują ataksję telangiektazję, AT) i *rad9* [72]. Białko Mec1p fosforyluje Rad9p, co ostatecznie prowadzi do uwolnienia Sir3p z telomerów.

Białka Tel1p i Tel2p, podobnie jak białko Rap1 stabilizują długość telomerów u drożdży [9,12,59]. Gen *tell1* koduje białko o sekwencji podobnej do ATM i DNA-PK u człowieka, a jego mutacje likwidują zależność długości telomerów od liczby białek Rap1p u drożdży [82]. Białko Tel1p może oddziaływać przez regulację tworzenia specyficznej struktury DNA-białko hamującej wydłużanie, albo przez zmianę właściwości telomerazy [82].

Jedynymi znanymi komponentami białkowymi telomerów u ssaków są białka TRF – czynniki wiążące się do podwójnych powtórzeń TTAGGG (ang. *duplex TTAGGG repeat-binding factor*, TRF). Dwa białka TRF1 i TRF2 mają motyw helisa-skręt-helisa podobny do białka Myb na końcu C, domenę konserwatywną dla TRF (wymagana dla dimeryzacji) i odpowiednio kwasową lub zasadową domenę na końcu N [7,92]. TRF1 i TRF2 wiążą się z DNA w postaci dimerów. Obecność dwóch domen Myb, podobnie jak w białku Rap1, jest wymagana do stabilnego wiązania się z DNA [7]. Nadekspresja białka TRF1, które jest negatywnym re-

gulatorem długości telomerów, powoduje skracanie telomerów [7,79,92], podczas gdy w przypadku TRF2 nie dochodzi do żadnych zmian. Białko TRF2 utrzymuje integralność telomerów, a jego inhibicja prowadzi do natychmiastowej utraty końców 3' bogatych w G, fuzji końców chromosomów i apoptozy [42,53,92,93]. Wydaje się, że TRF2, jak i TRF1 działają w powiązaniu z innymi białkami. Tankyryza (polimeraza poly(ADP-rybozy) zależna od ankrynu) łączy się z TRF1, powodując jego ADP-rybozylację, co wiąże się jednocześnie z odpowiedzią na uszkodzenie DNA. Brak polimerazy u myszy wpływa na skracanie telomerów wynikające ze wzrostu częstotliwości fuzji chromosomów i aneuploidalności, przy nie zmienionej aktywności telomerazy [22].

Brak heterogennej rybonukleoproteiny hnRnp u myszy wpływa na występowanie krótkich telomerów. Białko hnRnp A1 łączy się z jednoniciowym DNA i oddziałuje w różnych aspektach dojrzewania mRNA i w regulacji długości telomerów. N-końcowa domena hnRNP A1 człowieka (UP1) zawiera dwa motywy rozpoznające RNA (ang. *RNA recognition motifs*, RRM), wiążące się z 12-nukleotydowym, jednoniciowym, telomerowym DNA [26]. Jednoniciowe zakończenie powtórzeń telomerowych może tworzyć charakterystyczne struktury (struktura tetrapleksu wewnętrzzasteczkowego z motywem kwartetu G), a pozostająca sekwencja jednoniciowa może być związana z białkiem hnRNP A1 lub jego fragmentem UP1, co może być ważne dla utrzymania długości telomerów i/lub zabezpieczać przed działaniem nukleaz. Ten sam motyw występuje w białku Gbp1b z *Chlamydomonas reinhardtii* [26]. Białkiem wiążącym się z jednoniciowym zakończeniem telomerów za pomocą motywu oligonukleotydowo/oligosacharydowego (OB) jest OnTebp z *Oxytricha nova* (ang. *telomere binding protein*, TEBP), składające się z dwóch podjednostek: α (56 kDa) i β (41 kDa). Podjednostka pierwsza łączy się z DNA umożliwiając wydajną elongację DNA, a jednocześnie kompleks ten stanowi substrat dla telomerazy. Nadmiar podjednostki α powoduje powstanie kompleksu α -DNA- α , który blokuje wiązanie się telomerazy. Również stabilny kompleks α - β -DNA nie jest substratem dla telomerazy. Podjednostka β przypuszczalnie bierze udział w tworzeniu struktury kwartetu G (ang. *G quartet*), którego obecność obniża aktywność telomerazy. Sugeruje to, że białka telomerowe mogą regulować aktywność telomerazy przez utrudnienie dostępu enzymu do DNA [26,33].

Drożdżowe białko Set1p zawiera konserwatywną domenę SET, typową dla białek chromosomalnych związanych z epigenetyczną kontrolą transkrypcji. Jego inaktywacja osłabia telomerowy efekt pozycyjny (TPE). Natomiast białko Mec3p jest wymagane dla wydajnej kontroli uszkodzeń DNA w fazach G1/S, intra-S i G2/M. Domena SET białka Set1p oddziałuje z Mec3p [20,97]. Oddziaływania między nimi wpływają na naprawę DNA i na funkcję telomerów. Przywrócenie TPE w mutantach z delecją Set1p wymaga oprócz nadekspresji domeny SET, obecności białka Mec3p. Brak Mec3p wywołuje elongację telomerów, podczas gdy brak obu białek powoduje brak elongacji [20,97]. Białka związane z naprawą DNA odgrywają

również rolę w utrzymaniu telomerów i ich funkcji – jest możliwe, że inne białka zawierające domenę SET mogą oddziaływać z białkami punktów kontrolnych (ang. *checkpoint proteins*), co wskazywałoby na nowe współdziałania między telomerami, chromatyną, replikacją a naprawą DNA [20,97].

BUDOWA I DZIAŁANIE TELOMERAZY

Ustalenie budowy telomerazy jest bardzo trudne, ze względu na jej złożoność. Chociaż obecność podjednostki katalitycznej oraz podjednostki RNA wydaje się wystarczająca dla zapewnienia aktywności enzymatycznej *in vitro*, to prawdopodobnie do aktywności *in vivo* wymagana jest obecność dodatkowych elementów [4]. Różne sposoby izolacji mogą pominąć wyodrębnienie jakiegoś czynnika ważnego dla aktywności telomerazy *in vivo*. Świadczyć o tym mogą różnice w rekonstytucji telomerazy w zależności od sposobu izolacji poszczególnych składników [5,17,39,61].

Telomeraza, będąca polimerazą DNA zależną od RNA, wiąże się do końca 3' telomerów i katalizuje dodawanie krótkich powtórzonych odcinków bogatych w G. Telomeraza składa się z części katalitycznej, będącej telomerazową odwrotną transkryptazą (ang. *telomerase reverse transcriptase*, TERT=EST2=TRT), z telomerazowego matrycowego RNA (ang. *telomerase RNA*, *template RNA*, TR) oraz z białek zasocjowanych z telomerazą. Znajomość elementów stanowiących składniki telomerazy u konkretnych organizmów nie jest jednak pełna (tab. 1). Podjednostka RNA stanowi matrycę (ang. *template*) do syntezy powtórzeń telomerowych. Telomeraza kieruje się do celu dzięki użyciu podjednostki RNA jako szablonu. Podjednostka białkowa wydaje się pomagać w rozpoznaniu DNA, obróbce enzymatycznej i w katalizie [5].

Telomeraza oprócz utrzymania istniejących telomerów może u *Tetrahymena* syntetyzować telomery *de novo* w miejscach uszkodzenia chromosomów, niezależnie od stadium rozwoju [5,94,95]. Zjawisko to zostało zaobserwowane także u drożdży, robaków, pierwotniaków, roślin oraz człowieka. W rozwijających się makronukleusach *Euplotes* dochodzi do spontanicznego dodawania nowych telomerów do nietelomerowych końców DNA przez wydłużanie bezpośrednie, jak i poprzedzone cięciem endonukleolitycznym. W makronukleusie komórek wegetatywnych występuje tylko mechanizm drugi, co tłumaczone jest brakiem występowania w fazie wegetatywnej specyficznego czynnika zwanego CHF (ang. *chromosome healing factor*), umożliwiającego syntezę końców na nietelomerowych końcach DNA [5,94].

Dwie ważne części telomerazy wiążą się z kwasami nukleinowymi, jedna domena umożliwia wiązanie się z matrycowym RNA. W przeciwieństwie do innych znanych odwrotnych transkryptaz, telomeraza wykorzystuje jako matrycę jedynie małą, ściśle zdefiniowaną część swojej podjednostki RNA [79]. Jakiegokolwiek mutacje w obrębie motywu odwrotnej transkryptazy u drożdży prowadzą do skracania telomerów i

TABELA 1. Budowa holoenzymu telomerazy [41,50]

Organizm	Matryca RNA	Odwrotna transkryptaza	Inne białka
<i>Euplotes</i>	200 pz	p123	p43
<i>Tetrahymena</i>	159 pz	p133	p80, p95
<i>S. cerevisiae</i>	1300 pz-tlc1	Est2	Est1, Est3, Est4/Cdc13
Człowiek/ssaki	395–450 pz	hTERT	TP1, p23, HSP90

starzenia komórek [63]. Druga domena enzymu wiąże się do końca 3' telomerowego DNA (ang. *anchor site*) i stabilizuje kompleks. Wiązanie startera jest wymagane dla zależnego od telomerazy cięcia nukleolitycznego nietelomerowego końca 3' [34,79].

Wielkość podjednostki RNA wynosi od 150–200 pz u orzęsków, 400–450 pz u ssaków do 1200–1300 pz u drożdży. Dla funkcjonowania telomerowego RNA wymagana jest filogenetycznie konserwatywna struktura pierwszorzędowa i filogenetycznie niekonserwatywna struktura drugorzędowa [1,61]. Inne regiony telomerazowego RNA wymagane są do wiązania z jednostką katalityczną TERT, a inne dla aktywności enzymatycznej. Można wyróżnić co najmniej trzy funkcjonalne motywy: matrycę, miejsce wiązania TERT i sekwencję konieczną do utworzenia katalitycznie kompetentnego miejsca aktywnego telomerazy [61,84]. Konserwatywność struktury drugorzędowej wpływa na oddziaływanie z podjednostką katalityczną i z telomerami [1,36]. U *Tetrahymena* stwierdzono występowanie w strukturze drugorzędowej czterech konserwatywnych helis oraz pseudowęzła (ang. *pseudoknot*), którego obecność jest wymagana do asocjacji telomerazowego RNA z podjednostką katalityczną i tworzenia stabilnego kompleksu [40]. Domena matrycowa zawiera sekwencję 5'CAACCCCAA3', która kieruje syntezą specyficznych powtórzeń telomerowych (TTGGGG)_n [1].

Podjednostka katalityczna telomerazy została po raz pierwszy scharakteryzowana u *Euplotes aediculatus* jako p123 i *S. cerevisiae* jako Est2p (ang. *ever shorter telomeres*) – zawierają one motyw tworzący miejsce aktywne odwrotnej transkryptazy [63]. Podobne sekwencje znaleziono u człowieka (hTERT), *S. pombe* (Trt1p), *Tetrahymena termophila* (p133), *Oxytricha trifallax* [1,78].

U człowieka gen *hTERT* zbudowany jest z 16 eksonów. Promotor jest bogaty w GC, nie posiada domen TATA i CAAT, natomiast oddziałuje z kilkoma czynnikami transkrypcyjnymi. Zawiera między innymi 2 miejsca wiązania dla onkogenu *myc*, wiąże również receptory estrogenu i progesteronu [18]. U człowieka wyizolowano homolog białka p80 zasocjowanego z telomerazą – TLP1 (TP1). Jego obecność lub brak nie ma wpływu na tworzenie się kompleksu telomerazy [29]. Gen *TLP1* koduje białko p240, które podlega *in vivo* modyfikacji do p230 [79]. Ponieważ

forma p230 dominuje w aktywnej telomerazie, sugeruje się wpływ modyfikacji na regulację aktywności enzymu [78].

U *Euplotes* aktywna telomeraza ma masę około 230 kDa, na którą składają się 66 kDa podjednostka RNA i dwa białka o masach 123 i 43 kDa, przy czym p123 zawiera motyw odwrotnej transkryptazy [4,63]. W komórkach *Euplotes crassus* stwierdzono zależność budowy telomerazy od stanu rozwoju komórki. W komórkach wegetatywnych enzym o wielkości 280 kDa pozwala na dodawanie powtórzeń telomerowych tylko na końcach chromosomów. W czasie rozwoju generatywnego, podczas rozwoju makronukleusa, dochodzi również do syntezy telomerów *de novo* [39], a telomeraza występuje w kompleksach o masie 550 kDa, 1600 kDa i 5 MDa (synteza *de novo* dla 550 kDa nie występuje). Taka zmiana może wynikać z obecności tzw. rozpuszczalnego czynnika leczącego chromosomy CHF [5], co sugeruje, że telomeraza jest holoenzymem.

Do odtworzenia aktywnej telomerazy człowieka *in vitro* oprócz jednostki katalitycznej oraz telomerazowego RNA jest wymagana obecność innych białek, zawartych np. w ekstraktach z retikulocytów czy innych lizatów. Białka te zidentyfikowano jako chaperony p23 oraz HSP90. Ich brak hamuje tworzenie się aktywnej telomerazy także *in vivo* [50]. Ekspresja białka p133 oraz matrycowego RNA z *Tetrahymena* wystarczają do przywrócenia aktywności telomerazy w lizacie retikulocytów królika, jednak powstały kompleks różni się od natywnej telomerazy z *Tetrahymena*. Białka p80 i p95, które nie posiadają aktywności katalitycznej, są wymagane do rozpoznania kompleksu DNA-substrat i do oddziaływań telomeraza-RNA. Białka p95 i p80 tworzą kompleks niezależnie od obecności RNA, wykazują większe powinowactwo do RNA niż każda podjednostka osobno [4,43,78]. Ponadto białko p95 wiąże się specyficznie do jednoniciowego telomerowego DNA i może brać udział w rozpoznawaniu substratu [1,4,13,17,34,79].

Wydaje się, że dostęp telomerazy do telomerów zależy od typu komórki. Mogą tu działać białka wiążące się z telomerami: TRF1, TRF2, Est1p, Est3p czy Cdc13, które związane są raczej z wydłużaniem telomerów niż z aktywnością telomerazy [40]. U *S. cerevisiae* zidentyfikowano 3 geny *est1*, *est3* i *cdc13*, których mutacje prowadzą do postępującego skracania długości telomerów i obniżenia żywotności komórek, chociaż *in vitro* aktywność telomerazy jest zachowana. Białko Est1p, podobnie jak p95 może tworzyć miejsce wiązania startera w holoenzymie. Białka Est1p i Cdc13p z *S. cerevisiae* wiążą się *in vitro* z jednoniciowym telomerowym DNA bogatym w G. Produkt genu *cdc13* odpowiada za potencjalne zatrzymanie cyklu komórkowego zależne od białka Rad9p (ang. *cell cycle arrest*) oraz za wiązanie się z końcami jednoniciowego DNA bogatego w G, a tym samym jego ochroną. Mutacje Cdc13p (*cdc13-2^{est}*) wskazują na jego rolę w pozytywnej regulacji telomerazy. Inny allel *cdc13* uczestniczy raczej w degradacji nici C niż w aktywności telomerazy. Wydaje się, że Cdc13p umożliwia łączenie się telomerazy do telomerów przez białko Est1p (mutant *cdc13-2^{est}*) oraz bierze udział w utrzymaniu lub syntezie

nici bogatej w C (mutant *cdc13-1^{ts}*) [62]. Powyższe białka mogą wchodzić w skład telomerazy, albo być potencjalnymi czynnikami regulującymi jej aktywność [79].

Wydaje się, że telomeraza jest inhibowana przez wydłużające się telomery w miejscu swego działania (ang. *cis-inhibition*). Wydłużanie telomerów jest skorelowane z obniżaniem się aktywności telomerazy i ze wzrostem długości telomerów, spowodowanej kumulatywnym efektem przyłączania się białek Rap1p podczas elongacji [67]. Również u *Kluyveromyces lactis* Rap1p jest negatywnym regulatorem długości telomerów, prawdopodobnie przez *cis-inhibicję* telomerazy. Odwrotna transkryptaza w transpozonie *TART* u *Drosophila* jest blisko spokrewniona z p123 i Est2p, co świadczy, że mechanizm replikacji nie różni się tak bardzo od innych organizmów [62].

TELOMERY W STARZENIU I NOWOTWORACH

Telomeraza jest aktywna w komórkach rozrodczych, a także w limfocytach podczas podziałów, różnicowania i aktywacji oraz w większości znanych nowotworów [64]. W normalnych komórkach somatycznych człowieka aktywność telomerazy nie jest wykrywalna, wydaje się że podlega ścisłej regulacji rozwojowej [5,79]. Telomery służą jako zegar mitotyczny zapobiegający nieograniczonym podziałom komórek somatycznych. Telomery podlegają skracaniu podczas każdego podziału komórki o około 100 pz i u ludzi starszych są wyraźnie krótsze. W okresie embrionalnym wysoka aktywność telomerazy jest obserwowana w komórkach centralnego systemu nerwowego. W czasie rozwoju dochodzi do zamykania cewki nerwowej, natomiast brak telomerazy, np. u myszy *mtr^{-/-}* (pozbawionych podjednostki RNA telomerazy), powoduje zaburzenia w zamykaniu się cewki, a tym samym, wraz ze wzrostem liczby pokoleń myszy, do obniżenia przeżywalności embrionów [47]. Gdy telomery osiągną określoną krytyczną długość, dochodzi do starzenia się i do śmierci komórki. Również zmniejsza się odporność na stresy, np. leczenie ran [85]. W kulturach tkankowych takim krytycznym punktem jest określony limit podziałów nazywany limitem Hayflicka. Mechanizm starzenia komórkowego obejmuje 2 etapy: zaprogramowane zanikanie wzrostu mitotycznego znajdujące się pod kontrolą genów *p53* i *RB-1* oraz stadium „kryzysu” i śmierci. Do przejścia przez fazę S cyklu wymagana jest fosforylacja białka pRB. Aktywność białka pRB jest regulowana poprzez CDK4, cykliny D1 i p16. Jednocześnie dochodzi do wydłużania telomerów i nie występują objawy starzenia (zredukowane barwienie dla β -gala-ktozydazy, biomarkera starzenia się). Białko p53 jest uaktywniane i stabilizowane przez skracanie się telomerów i niestabilność genomu, prowadząc do zatrzymania wzrostu komórki i/lub apoptozy [16,93]. Droga z udziałem p53 może zmieniać odpowiedź komórki na utratę telomerów w komórkach normalnych i neoplastycznych. Białko p53 jest supresorem nowotworów przez ochronę komórek przed różnymi stresami genotoksycznymi i środowiskowymi. Indukcja przerw w dwu-

niciowym DNA przez promieniowanie jonizujące lub chemioterapię genotoksyczną powoduje szybką stabilizację białka p53 przez fosforylację końca N. To prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego przez indukcję transkrypcyjną p21^{CIP1/WAF1} inhibitora CDK lub apoptozy. W starzejących się komórkach człowieka i myszy białka p53 i p21^{CIP1/WAF1} są aktywowane jednocześnie. Usunięcie białka wiążącego się z telomerami TRF2, podobnie jak skracanie telomerów, tworzenie mostków między uszkodzonymi fragmentami chromosomów (ang. *fusion-bridge-breakage*) bezpośrednio aktywuje apoptozę zależną od p53 [53,92]. Delecja genu p53 wyraźnie osłabia niekorzystne efekty dysfunkcji telomerów na poziomie komórki i całego organizmu [16].

Wprowadzenie do komórek somatycznych wektora zawierającego podjednostkę katalityczną telomerazy hTERT i uaktywnienie jej prowadzi do unieśmiertelnienia komórek [11,18,51,75,79]. Jednocześnie ekspresja telomerazy w normalnych komórkach nie indukuje zmian związanych z fenotypem nowotworów złośliwych [51,75,100]. Również punkt kontroli uszkodzeń DNA zależny od białka p53 działa sprawnie, a aktywność telomerazy zwiększa stabilność genomu i zapobiega akumulacji zmian cytogenetycznych [75]. Komórki pozbawione białek pRB i p53 dzielą się nawet po przekroczeniu liczby Hayflicka [16], jednocześnie telomery skracają się, powodując niestabilność genetyczną i masową śmierć komórek (okres ten nosi nazwę kryzysu). Stanowi to jak gdyby mechanizm supresji nowotworowej, przeznaczony do wydajnego usuwania komórek prenowotworowych (ang. *pre-malignant*) [16]. Nieliczne komórki jednak przeżywają i mogą utrzymać długość telomerów albo przez uaktywnienie telomerazy, albo drogą alternatywną, opartą na rekombinacji [16,56,99]. Również pewne starzejące się linie wykazują aktywność telomerazy, stąd sama aktywność telomerazy nie zapobiega starzeniu [80,96,100].

Komponent RNA telomerazy *mtr* u myszy odpowiada za jej aktywność. Usunięcie genu kodującego matrycowy RNA telomerazy u myszy *Mus musculus* (*mtr*^{-/-}) powoduje skracanie telomerów z każdym pokoleniem, ale do zmniejszenia się liczby podziałów, płodności, zwiększonej apoptozy i sterylności dochodzi dopiero w późniejszych pokoleniach [10,47,48], co może wynikać z faktu, że telomery u *Mus musculus* są 10 razy dłuższe niż u człowieka i blisko spokrewnionej myszy *Mus spretus*. Obecność krótszych telomerów u myszy *mtr*^{-/-} wpływa na zmniejszenie liczby pokoleń z 6 do 4 [48]. Jednocześnie wzrasta aneuploidalność i występują zmiany w chromosomach (fuzja końców) [10,87]. Również wykazano, że aktywność telomerazy nie jest konieczna do powstawania nowotworów [10]. Myszy *mtr*^{-/-} zaawansowane wiekiem i z kolejnych generacji pozbawionych możliwości syntezy sekwencji telomerowych, charakteryzują się wzrostem liczby nowotworów, wynikającym ze zwiększenia się niestabilności genetycznej spowodowanej skracaniem chromosomów, powtarzającymi się cyklami fuzji uszkodzonych końców i utratami chromosomów [16,38,85,87]. Myszy *mtr*^{-/-} wykazują od czwartego pokolenia brak telomerów i może u nich wystąpić Robertsonowska fuzja chromosomów (ang. *Ro-*

bertsonian fusion) akrocentrycznych lub telocentrycznych do chromosomu meta-centrycznego [87]. Inny rodzaj fuzji może wynikać z rearanżacji chromosomu w wyniku pęknięcia w obrębie mniejszej sekwencji satelitarnej. Fuzja Robertsonowska może zachodzić również bez utraty sekwencji telomerowych w wyniku inaktywacji białek związanych z telomerami, zmian w strukturze chromatyny telomerowej lub inaktywacji czasowej [87].

Komórki z bardzo krótkimi telomerami uaktywniają telomerazę i współdziałając z onkogenami *c-myc*, *E6* brodawczaka człowieka (*E6* aktywuje telomerazę poprzez onkogen *Myc*, niezależnie od stopnia degradacji białka) oraz *RAS* transformują komórki i generują nowotwory [38,40,96]. Onkogen *myc* indukuje aktywność telomerazy przez zwiększenie ekspresji podjednostki katalitycznej hTERT [96]. Również hTERT może współdziałać z utratą supresji nowotworowej i prowadzić do pominięcia miejsc kontroli M1 i M2.

Telomeraza nie jest ani supresorem nowotworów, ani onkogenem, chociaż wydaje się być ważna dla żywotności transformowanych komórek [16,26,40], a jej udział w procesach nowotworowych wymaga jeszcze wielu badań [16,38,85]. Stwierdzono wzrost liczby cząsteczek mRNA dla hTERT wraz z aktywacją telomerazy podczas unieśmiertelniania komórek oraz zmniejszanie ilości mRNA podczas różnicowania się komórek *in vitro* [64,72,77]. W pewnych nowotworach można powiązać wzrost poziomu mRNA dla hTERT z przewidywanym nawrotem choroby. Jednak jest to zjawisko zależne od typu komórek, ponieważ regulacja transkrypcyjna mRNA dla hTERT w limfocytach człowieka nie jest wystarczająca, co sugeruje rolę czynników posttranskrypcyjnych w kontroli funkcji enzymu. Z kolei poziom *hTR* nie wykazuje podobnej zależności [27,64], a u myszy pozbawionych aktywności telomerazy (*mtr*^{-/-}) z nieaktywną drogą p53 może dojść do zwiększenia liczby nowotworów [16]. Komórki nowotworowe z zablokowaną telomerazą mogą przeżyć ze względu na możliwość fuzji lub drogi alternatywnej [38]. Na działanie mechanizmu alternatywnego (ALT) w nieśmiertelnych liniach komórkowych, również nowotworowych, rzuca światło obecność w białaczkach promielocytowych PML (ang. *promyelocytic leukemia*) specyficznych struktur zawierających oprócz białka PML także telomerowe DNA, białka wiążące się z telomerami (hTRF1, hTRF2) oraz związane z syntezą i rekombinacją DNA (czynnik replikacyjny A, RAD51, RAD52). Powyższe twory pojawiają się jednocześnie z aktywacją drogi alternatywnej [98].

Ponieważ aktywność telomerazy pojawia się w większości nowotworów, stąd środki hamujące jej działanie mogą być wykorzystane w celach terapeutycznych. Najnowsze badania wykazują, że jedynie komórki nowotworowe człowieka z krótkimi telomerami mogą być skutecznie i szybko zabijane przez unieczynnienie telomerazy [100]. Większość strategii opiera się na inhibowaniu podjednostki katalitycznej. Podjednostka hTERT jest wrażliwa na działanie tiofosforowych analogów oligonukleotydów (ang. *phosphorothioate-modified oligonucleotides*, PS-

ODNs) [69], a także na antagonistę hormonu uwalniającego hormon wzrostu (ang. *growth hormone-releasing hormone*, GH-RH) [55].

Zależność między skracaniem się telomerów i starzeniem komórek może być specyficzna tylko dla człowieka. W pączkujących drożdżach długość telomerów w starych i rozwijających się komórkach jest nierozróżnialna. U pierwotniaków *Tetrahymena* i *Euplotes* komórki rosnące wegetatywnie utrzymują istniejące telomery, a podczas koniugacji seksualnej dzielą chromosomy i formują *de novo* na ich końcach telomery [5,80,94,95]. U mutantów *Arabidopsis thaliana tert*^{-/-} z nieaktywną telomerazą (gen kodujący podjednostkę katalityczną Tert został rozerwany przez wstawienie transferowego DNA) dochodzi do powolnego skracania telomerów. Roślina ta posiada bardzo krótkie telomery w porównaniu z myszą *Mus musculus*, jednak może przeżyć co najmniej 2 pokolenia z nieaktywną telomerazą. Zjawisko to wynika z wolniejszego tempa skracania telomerów (500 pz, a u myszy 5 kpz na pokolenie), a ponadto u roślin częściej występują drogi rekombinacyjne niż u zwierząt, stąd u *Arabidopsis* może dojść do aktywacji drogi alternatywnej dla utrzymania telomerów [30].

ZAKOŃCZENIE

Obecność uporządkowanych struktur na końcach chromosomów – telomerów, wydających się tworami statycznymi, znana była już od dawna i problem ten leżał w zasięgu badań cytogenetycznych. Rozwój badań molekularnych umożliwił nowe spojrzenie na telomery, które okazały się strukturami bardzo dynamicznymi, o olbrzymim zróżnicowaniu struktury. Enzym syntetyzujący powtórzenia telomerowe – telomeraza stanowi kompleks rybonukleoproteinowy, którego wszystkie elementy nie są w pełni poznane, a występowanie różnic u eukariontów wcale nie ułatwia tego zadania. Również pochodzenie telomerazy nie jest w pełni wyjaśnione. Tylko nieliczne badania dotyczą telomerów roślin.

Telomery wiążą się z bardzo licznymi białkami, które biorą udział w wielu procesach zachodzących w komórkach, jak np. naprawa przerw w dwuniciowym DNA, wyciszanie transkrypcyjne czy podziały komórek. Na wyjaśnienie funkcji końców chromosomów nowe światło rzucają modele budowy telomerów. W niniejszej pracy podane zostały dwa, w przyszłości może okazać się, że właściwy model dopiero czeka na opracowanie.

Bardzo interesujący jest związek telomerów i telomerazy ze starzeniem się i chorobami nowotworowymi. Czy jest on przypadkowy, czy nie? Czy można na tej podstawie myśleć o nowej, skutecznej metodzie leczenia? Ponieważ wiele badań jest prowadzonych na komórkach mysich, czeka jeszcze weryfikacja przeniesienia tych obserwacji na człowieka (inna długość telomerów, inna wrażliwość na nowotwory itp.) W tym kierunku prowadzonych jest wiele badań, a uzyskane obecnie wyniki rodzą nowe pytania. Czekają nas jeszcze wiele nowych, fascynujących odkryć.

LITERATURA

- [1] AUTEXIER C, TRIKI I. *Tetrahymena* telomerase ribonucleoprotein RNA-protein interaction. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 2227–2234.
- [2] BAILEY SM, MEYNE J, CHEN DJ, KURIMASA A, LI GC, LEHNERT BE, GOODWIN EH. DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci* 1999; **96**: 14899–14904.
- [3] BARINAGA M. Cells count proteins to keep their telomeres in line. *Science* 1997; **275**: 928.
- [4] BARINAGA M. The telomerase picture fills in. *Science* 1997; **276**: 528–529.
- [5] BEDNENKO J, MELEK M, GREENE EC, SHIPPEN DE. Developmentally regulated initiation of DNA synthesis by telomerase: evidence for factor-assisted *de novo* telomere formation. *EMBO J* 1997; **16**: 2507–2518.
- [6] BIANCHI A, DE LANGE T. Ku binds telomeric DNA *in vitro*. *J Biol Chem* 1999; **274**: 21223–21227.
- [7] BIANCHI A, SMITH S, CHONG L, ELIAS P, DE LANGE T. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J* 1997; **16**: 1785–1794..
- [8] BIESSMANN H, MASON JM. Telomeric repeat sequences. *Chromosoma* 1994; **103**: 154–161.
- [9] BIESSMANN H, MASON JM. Telomere maintenance without telomerase. *Chromosoma* 1997; **106**: 63–69.
- [10] BLASCO MA, LEE HW, HANDE MP, SAMPER E, LANSDORP PM, DEPINHO RA, GREIDER CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; **91**: 25–34.
- [11] BODNAR AG, OUELLETTE M, FROLKIS M, HOLT SE, CHIU CP, MORINGB, HARLEY CB, SHAY JW, LICHTSTEINER S, WRIGHT WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; **279**: 349–352.
- [12] BOULTON SJ, JACKSON SP. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J* 1998; **17**: 1819–1828.
- [13] BRYAN TM, SPERGER JM, CHAPMAN KB, CECH TR. Telomerase reverse transcriptase genes identified in *Tetrahymena thermophila* and *Oxytricha trifallax*. *Proc Natl Acad Sci* 1998; **95**: 8479–8484.
- [14] CHAMANKHAH M, XIAO W. Formation of the yeast Mre11-Rad50-Xrs2 complex is correlated with DNA repair and telomere maintenance. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 2072–2079.
- [15] CHEN CM, WANG CT, WANG CJ, HO CH, KAO YY, CHEN CC. Two tandemly repeated telomere-associated sequences in *Nicotiana glauca*. *Chrom Res* 1997; **5**: 561–568.
- [16] CHIN L, ARTANDI SE, SHEN Q, TAM A, LEE SL, GOTTLIEB GJ, GREIDER CW, DEPINHO RA. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 1999; **97**: 527–538.
- [17] COLLINS K, GANDHI L. The reverse transcriptase component of the *Tetrahymena* telomerase ribonucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci* 1998; **95**: 8485–8490.
- [18] CONG YS, WEN J, BACCHETTI S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Gen* 1999; **8**: 137–142.
- [19] CONRAD MN, DOMINGUEZ AM, DRESSER ME. Ndj1p, a meiotic telomere protein required for normal chromosome synapsis and segregation in yeast. *Science* 1997; **276**: 1252–1255.
- [20] CORDA Y, SCHRAMKE V, LONGHESE MP, SMOKVINA T, PACIOTTI V, BREVET V, GILSON E, GELI V. Interaction between Set1p and checkpoint protein Mec3p in DNA repair and telomere functions. *Nature Genet* 1999; **21**: 204–208.

- [21] CRYDERMAN DE, MORRIS EJ, BIESSMANN H, ELGIN SCR, WALLRATH LL. Silencing at *Drosophila* telomeres: nuclear organization and chromatin structure play critical roles. *EMBO J* 1999; **18**: 3724–3735.
- [22] d'ADDA di FAGANGA F, HANDE MP, TONG WM, LANSDORP PM, WANG ZQ, JACKSON SP. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nature Genet* 1999; **23**: 76–80.
- [23] DANILEVSKAYA O, SLOT F, PAVLOVA M, PARDUE ML. Structure of *Drosophila* HeT-A transposon: a retrotransposon-like element forming telomeres. *Chromosoma* 1994; **103**: 215–224.
- [24] DANILEVSKAYA ON, ARKHIPOVA IR, TRAVERSE KL, PARDUE ML. Promoting in Tandem: the promoter for telomere transposon *HeT-A* and implications for the evolution of retroviral LTRs. *Cell* 1997; **88**: 647–655.
- [25] de LANGE T, DePINHO RA. Unlimited Mileage from Telomerase? *Science* 1999; **283**: 947–949.
- [26] DING J, HAYASHI MK, ZHANG MK, MANCHE L, KRAINER AR, XU RM. Crystal structure of the two-RRM domain of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. *Genes Dev* 1999; **13**: 1102–1115.
- [27] DOME JS, CHUNG S, BERGEMANN T, UMBRICH CB, SAJIM., CAREY LA, GRUNDY PE, PERLMAN EJ, BRESLOW NE, SUKUMAR S. High telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) messenger RNA level correlates with tumor recurrence in patient with favorable histology Wilms tumor. *Cancer Res* 1999; **59**: 4301–4307.
- [28] EICKBUSH TH. Telomerase and retrotransposons: which came first. *Science* 1997; **277**: 911–912.
- [29] EVANS SK, SISTRUNK ML, NUGENT CI, LUNDBLAD V. Telomerase, Ku, and telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* 1998; **107**: 352–358.
- [30] FITZGERALD MS, RIHA K, GAO F, REN S, McKNIGHT TD, SHIPPEN DE. Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from *Arabidopsis* inactivates telomerase and leads to slow loss of telomeric DNA. *Proc Natl Acad Sci* 1999; **96**: 14813–14818.
- [31] FRANKLIN AE, CANDE WZ. Nuclear organization and chromosome segregation. *Plant Cell* 1999; **11**: 523–534.
- [32] FREITAS-JUNIOR LHG, PORTO RM, PIRRIT LA, SCHENKMAN S, SCHERF A. Identification of telomere in *Trypanosoma cruzi* reveals highly heterogenous telomere lengths in different parasite strains. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 2451–2456..
- [33] FROELICH-AMMON SJ, DICKINSON BA, BEVILACQUA JM, SCHULTZ SC, CECH TR. Modulation of telomerase activity by telomere DNA-binding proteins in *Oxytricha*. *Genes Dev* 1998; **12**: 1504–1514.
- [34] GANDHI L, COLLINS K. Interaction of recombinant *Tetrahymena* telomerase proteins p80 and p95 with telomerase RNA and telomeric DNA substrates. *Genes Dev* 1998; **12**: 721–733.
- [35] GARAGNA S, RONCHETTI E, MASCHERETT, S, CROVELLA S, FORMENTI D, RUMPLER Y, ROMAINI MGM. Non-telomeric chromosome localization of (TTAGGG)_n repeats in the genus *Eulemur*. *Chromosome Res* 1997; **5**: 487–491.
- [36] GILLEY D, BLACKBURN EH. The telomerase RNA pseudoknot is critical for the stable assembly of a catalytically active ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6621–6625.
- [37] GILSON P, MCFADDEN GI. The chlorarachniophyte: a cell with two different nuclei and two different telomeres. *Chromosoma* 1995; **103**: 635–641.
- [38] GREENBERG RA, CHIN L, FEMINO A, LEE KH, GOTTLIEB GJ, SINGER RH, GREIDER CW, DePINHO RA. Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a^{A2/3} cancer-prone mouse. *Cell* 1999; **97**: 515–525.

- [39] GREENE EC, SHIPPEN DE. Developmentally programmed assembly of higher order telomerase complexes with distinct biochemical and structural properties. *Genes Dev* 1998; **12**: 2921–2931.
- [40] GREIDER CW. Telomerase activation one step on the road to cancer? *Trends Genet* 1999; **15**: 109–112.
- [41] GREIDER CW. Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell* 1999; **97**: 419–422.
- [42] GRIFFITH JD, CORNEAU L, ROSENFELD S, STANSEL RM, BIANCHI A, MOSS H, de LANGE T. Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell* 1999; **97**: 503–514.
- [43] HARRINGTON L, McPHAIL T, MAR V, ZHOU W, OULTON R, AMGEN EST PROGRAM, BASS MB, ARRUDA I, ROBINSON MO. A Mammalian telomerase-associated protein. *Science* 1997; **275**: 973–977.
- [44] HAWLEY RS. Unresolvable endings: defective telomeres and failed separation. *Science* 1997; **275**: 1441–1443.
- [45] HAWLEY RS. Sticky endings: separating telomeres. *Science* 1997; **276**: 1215.
- [46] HENNIG W. Heterochromatin. *Chromosoma* 1999; **108**: 1–9.
- [47] HERRERA E, SAMPER E, BLASCO MA. Telomere shortening in mTR^{-/-} embryos is associated with failure to close the neural tube. *EMBO J* 1999; **18**: 1172–1181.
- [48] HERRERA E, SAMPER E, MARTIN-CABALLERO J, FLORES JM, LEE HW, BLASCO MA. Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *EMBO J* 1999; **18**: 2950–2960.
- [49] HIGASHIYAMA T, NOUTOSHI Y, FUJIE M, YAMADA T. Zepp, a LINE-like retrotransposon accumulated in the *Chlorella* telomeric region. *EMBO J* 1997; **16**: 3715–3723.
- [50] HOLT SE, AISNER DL, BAUR J, TESMER VM, DY M, OUELLETTE M, TRAGER JB, MORIN GB, TOFT DO, SHAY JW, WRIGHT WE, WHITE MA. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev* 1999 **13**: 817–826.
- [51] JIANG XR, JIMENEZ G, CHANG E, FROLKIS M, KUSLER B, SAGE M, BEECHE M, BODNAR AG, WAHL GM, TLSTY TD, CHIU CP. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nature Genet* 1999; **21**: 111–114.
- [52] JOFFE BI, SOLOVEI IV, MACGREGOR HC. Ends of chromosomes in *Polycelis tenuis* (*Platyhelminthes*) have telomere repeat TTAGGG. *Chromosome Res* 1996; **4**: 323–324.
- [53] KARLSEDER J, BROCCOLID, DAI Y, HARDY S, de LANGE T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 1999; **283**: 1321–1325.
- [54] KENNEDY BK, GOTTA M, SINCLAIR DA, MILLS K, McNABB DS, MURTHY M, PAK SM, LAROCHE T, GASSER SM, GUARENTE L. Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. cerevisiae*. *Cell* 1997; **89**: 381–391.
- [55] KIARIS H, SCHALLY AV. Decrease in telomerase activity in U-87MG human glioblastomas after treatment with an antagonist of growth hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 226–231.
- [56] KIM NW, PIATYSZEK MA, PROWSE KR, HARLEY CB, WEST MD, HO PLC, COVIELLO GM, WRIGHT WE, WEINRICH SL, SHAY JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; **266**: 2011–2015.
- [57] KIPLING D, FARAGHTER RGA. Ageing hard or hardly ageing? *Nature* 1999; **398**: 191–193
- [58] KIRK KE, HARMON BP, REICHARDT IK, SEDAT JW, BLACKBURN EH. Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation. *Science* 1997; **275**: 1478–1481.
- [59] KOTA RS, RUNGE KW. Tel2p, a regulator of yeast telomeric length *in vivo*, binds to single-stranded telomeric DNA *in vitro*. *Chromosoma* 1999; **108**: 278–290.

- [60] KURENOVA E, CHAMPION L, BIESSMANN H, MASON JM. Directional gene silencing induced by a complex subtelomeric satellite from *Drosophila*. *Chromosoma* 1998; **107**: 311–320.
- [61] LICHT JD, COLLINS K. Telomerase RNA function in recombinant *Tetrahymena* telomerase. *Genes Dev* 1999; **13**: 1116–1125.
- [62] LINGNER J, CECH TR. Telomerase and chromosome end maintenance. *Curr Opin Genet Dev* 1998; **8**: 226–232.
- [63] LINGNER J, HUGHES TR, SHEVCHENKO A, MANN M, LUNDBLAD V, CECH TR. Reverse Transcriptase Motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 1997; **276**: 561–567..
- [64] LIU K, SCHOONMAKER MM, LEVINE BL, JUNE CH, HODES RJ, WENG NP. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5147–5152.
- [65] MAKAROV VL, HIROSE Y, LANGMORE JP. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 1997; **88**: 647–666.
- [66] MARCAND S, GILSON E, SHORE D. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* 1997; **275**: 986–990.
- [67] MARCAND S, BREVET V, GILSON E. Progressive *cis*-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *EMBO J* 1999; **18**: 3509–3519.
- [68] MARTIN SG, LAROCHE T, SUKA N, GRUNSTEIN M, GASSER SM. Relocalisation of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in Yeast. *Cell* 1999; **97**: 621–633.
- [69] MATTHES E, LEHMAN C. Telomerase protein rather than its RNA is the target of phosphorothioate-modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 1152–1158.
- [70] McCORMICK-GRAHAM M, HAYNES WJ, ROMERO DP. Variable telomeric repeat synthesis in *Paramecium tetraurelia* is consistent with misincorporation by telomerase. *EMBO J* 1997; **16**: 3233–3242.
- [71] McELLIGOTT R, WELLINGER RJ. The terminal structure of mammalian chromosomes. *EMBO J* 1997; **16**: 3705–3714..
- [72] MEYERSON M, COUNTER CM, EATON EN, ELLISEN LW, STEINER P, CADDLE SD, ZIAUGRA L, BEIJERSBERGER RL, DAVIDOFF MJ, LIU Q, BACCHETTI S, HABER DA, WEINBERG RA. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997; **90**: 785–795.
- [73] MILLS KD, SINCLAIR DA, GUARENTE L. *MEC1*-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell* 1999; **97**: 609–620.
- [74] MIRABELLA A, GARTENBERG MR. Yeast telomeric sequences function as chromosomal anchorage points *in vivo*. *EMBO J* 1997; **16**: 523–533.
- [75] MORALES CP, HOLT SE, OULLETTE M, KAUR KJ, YAN Y, WILSON KS, WHITE MA, WRIGHT WE, SHAY JW. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nature Genet* 1999; **21**: 115–118.
- [76] NAKAMURA TM, CECH TR. Reversing time: origin of telomerase. *Cell* 1998; **92**: 587–590..
- [77] NAKAMURA TM, MORIN GB, CHAPMAN KB, WEINRICH SL, ANDREWS WH, LINGNER J, HARLEY CB, CECH TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997; **277**: 955–959.
- [78] NAKAYAMA J, SAITO M, NAKAMURA H, MATSUURA A, ISHIKAWA F. *TLP1*: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* 1997; **88**: 875–884.
- [79] NUGENT CI, LUNDBLAD V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* 1998; **12**: 1073–1085.

- [80] PARDUE ML, DeBARYSHE PG. Telomeres and telomerase: more than the end of the line. *Chromosoma* 1999; **108**: 73–82.
- [81] PICH U, FUCHS J, SCHUBERT I. How do *Alliaceae* stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chromosome Res* 1996; **4**: 207–213.
- [82] RAY A, RUNGE KW. Varying the number of telomere-bound proteins does not alter telomere length in *tell* cells. *Proc Natl Acad Sci* 1999; **96**: 15044–15049.
- [83] ROCKMILL B, ROEDER GS. Telomere-mediated chromosome pairing during meiosis in budding yeast. *Genes Dev* 1998; **12**: 2574–2586.
- [84] ROY J, FULTON TB, BLACKBURN EH. Specific telomerase RNA residues distant from the template are essential for telomerase function. *Genes Dev* 1998; **12**: 3286–3300.
- [85] RUDOLPH KL, CHANG S, LEE HW, BLASCOM, GOTTLIEB GJ, GREIDER C, DePINHO RA. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 1999; **96**: 701–712.
- [86] SLIJEPCEVIC P, HANDE MP, BOUFFLER SD, LANSDORP P, BRYANT PE. Telomere length, chromatin structure and chromosome fusigenic potential. *Chromosoma* 1997; **106**: 413–421.
- [87] SLIJEPCEVIC P. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 1998; **107**: 136–140.
- [88] STEVENSON JB, GOTTSCHLING DE. Telomeric chromatin modulates replication timing near chromosome ends. *Genes Dev* 1999; **13**: 146–151.
- [89] SYBENAGA J. What makes homologous chromosomes find each other in meiosis? A review and an hypothesis. *Chromosoma* 1999; **108**: 209–219.
- [90] TAKAHASHI H, FUJIWARA H. Transcription analysis of the telomeric repeat-specific retrotransposons TRAS1 and SART1 of the silkworm *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 2015–2021.
- [91] TRELLES-STICKEN E, LOIDL J, SCHERTEN H. Bouquet formation in budding yeast: initiation of recombination is not required for meiotic telomere clustering. *J Cell Sci* 1999; **112**: 651–658.
- [92] van STEENSEL B, SMOGORZEWSKA A, de LANGE T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998; **92**: 401–413.
- [93] VAZIRI H, WEST MD, ALLSOPP RC, DAVISON TS, WU YS, ARROWSMITH CH, POIRIER GG, BENCHIMOL S. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblast and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J* 1997; **16**: 6018–6033.
- [94] WANG H, BLACKBURN EH. *De novo* telomere addition by *Tetrahymena* telomerase *in vitro*. *EMBO J* 1997; **16**: 866–879.
- [95] WANG H, GILLEY D, BLACKBURN EH. A novel specificity for the primer-template pairing requirement in *Tetrahymena* telomerase. *EMBO J* 1998; **17**: 1152–1160.
- [96] WANG J, XIE LY, ALLAN S, BEACH D, HANNON GJ. Myc activates telomerase. *Genes Dev* 1998; **12**: 1769–1774.
- [97] WEINERT T, LUNDBLAD V. Forever hopeful relations: chromatin, telomeres and checkpoints. *Nature Genet* 1999; **21**: 151–152.
- [98] YEAGER TR, NEUMANN AA, ENGLEZOU A, HUSCHTSCHA LI, NOBLE JR, REDDEL RR. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res* 1999; **59**: 4175–4179.
- [99] ZAKIAN VA. Life and cancer without telomerase. *Cell* 1997; **91**: 1–3.
- [100] ZHANG X, MAR V, ZHOU W, HARRINGTON L, ROBINSON MO. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev* 1999; **13**: 2388–2399.

MOLEKULARNE BADANIA ZABURZEŃ ROZWOJU PŁCIOWEGO: KLUCZ DO ZROZUMIENIA GENETYCZNEGO MECHANIZMU DETERMINACJI PŁCI*

MOLECULAR ANALYSIS OF SEX DEVELOPMENT ABNORMALITIES: THE KEY TO UNDERSTAND GENETIC MECHANISM OF SEX DETERMINATION

Kamila KUSZ, Maciej KOTECKI, Jadwiga JARUZELSKA

Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Streszczenie: Determinacja płci jest procesem odpowiedzialnym za wykształcenie się jąder lub jajników z pierwotnej gonady embrionalnej. Proces ten kontrolowany jest genetycznie. W pracy opisano rolę genów *SRY*, *SOX9*, *WT1*, *SF1*, *DAX1*, w procesie determinacji płci oraz przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat oddziaływań kodowanych przez nie białek.

Słowa kluczowe: determinacja płci, geny: *SRY*, *SOX9*, *WT1*, *SF1*, *DAX1*

Summary: Sex determination is the process responsible for testis or ovarian development from primary gonad. This process is genetically controlled. In this review the role of *SRY*, *SOX9*, *WT1*, *SF1*, *DAX1* genes in sex determination is described and the current knowledge about interactions of proteins encoded by these genes is summarised.

Key words: sex-determination, genes: *SRY*, *SOX9*, *WT1*, *SF1*, *DAX1*

WPROWADZENIE

Determinacja płci ssaków jest procesem odpowiedzialnym za rozwój embrionalnej gonady pierwotnej w gonadę męską (jądro) lub żeńską (jajnik) [15,30,37]. Kierunek

*Praca wykonana w ramach grantów KBN Nr 4P05E 041 14 oraz HHMI Nr 75195-543601

różnicowania się gonady pierwotnej zależy od obecności specyficznego sygnału, którym jest czynnik determinujący rozwój jądra (ang. *testis determining factor* – TDF) zlokalizowany na chromosomie Y. Sygnał ten pojawia się na przełomie szóstego i siódmego tygodnia życia ludzkiego zarodka o kariotypie męskim – 46,XY. Po jego zadziałaniu gonada pierwotna różnicuje się w jądro. W przypadku zarodka o kariotypie żeńskim – 46,XX, w którym TDF nie występuje, gonada rozwija się w jajnik. Jak dotąd zidentyfikowano kilka genów zaangażowanych w proces determinacji płci. Kluczowym podejściem w poznaniu ich struktury i funkcji była analiza molekularna pacjentów charakteryzujących się tzw. „odwróceniem płci”, czyli niezgodnością płci genetycznej z płcią fenotypową.

Różnicowanie płci jest następnym etapem rozwojowym, prowadzącym do powstania wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych oraz gamet w ukształtowanych gonadach. Dzieje się tak na skutek uruchomienia złożonego systemu interakcji sygnałów, które prowadzą do rozwoju fenotypu męskiego lub żeńskiego. Prawidłowy rozwój cech płciowych zależy od wielu genów, występujących w chromosomach Y, X oraz autosomach. Geny te zapewniają syntezę odpowiednich czynników komórkowych, hormonów oraz białek receptorowych we właściwej ilości i sekwencji czasowej [36].

II. WYBRANE GENY ZAANGAŻOWANE W DETERMINACJĘ PŁCI SSAKÓW

Gen *SRY*

Genetyczny czynnik determinujący rozwój jądra (TDF), został zmapowany poprzez klonowanie pozycyjne w krótkim ramieniu chromosomu Y, w regionie Yp3.11 [26]. W obrębie tego regionu zidentyfikowano gen *SRY* (ang. *sex determining region Y*) [31]. Istnieje kilka argumentów na to, iż ten gen pełni funkcję TDF. Po pierwsze, wykazano, że mysz gen *sry* ulega ekspresji w rozwijających się gonadach, w bardzo krótkim czasie poprzedzającym różnicowanie się tkanek typowych dla jądra [17]. Po wtóre, zidentyfikowano mutacje *de novo* w genie *SRY* u kobiet z odwróceniem płci [3,14]. Ponadto zademonstrowano, że mysz o kariotypie żeńskim, transgeniczna pod względem genu *sry*, rozwija fenotyp męski o prawidłowej strukturze jąder [18].

Gen *SRY* nie zawiera intronów, koduje białko o wielkości 204 aminokwasów i masie 23.9 kD [31,32]. W środkowej części białka występuje region 80 AA, homologiczny z motywem HMG (ang. *high mobility group*) typowym dla białek o właściwościach wiązania się z DNA. Domena HMG jest najbardziej konserwatywną częścią białka *SRY*. Wykazano, że działa ona po części jako czynnik transkrypcyjny

oddziałujący ze specyficzną sekwencją DNA, jednak nietypowy, ponieważ nie wykazano w niej obecności, występującej w czynnikach transkrypcyjnych, domeny aktywującej transkrypcję [39]. Zdecydowana większość opisanych dotąd mutacji genu *SRY* koncentruje się w domenie HMG, co potwierdza jej znaczenie funkcjonalne. Mutacje powodują zaburzenie w zdolności białka do wiązania się z DNA, w konsekwencji czego nie dochodzi do różnicowania gonad pierwotnych w jądra, a to z kolei jest przyczyną dysgenezy gonad XY [5]. Chorzy to fenotypowe kobiety z prawidłowo rozwiniętymi żeńskimi narządami płciowymi, jedynie w miejscu jajników występują pasma tkanki łącznej (*streak gonads*). Mutacje w genie *SRY* wykrywane są u zaledwie 10–15% kobiet z odwróceniem płci [10]. Pozostałe przypadki muszą więc być uwarunkowane uszkodzeniami innych miejsc w genomie, związanych z determinacją płci.

Gen *SOX9*

Chorobą genetyczną wskazującą na zaangażowanie innego genu w rozwój płciowy ssaków jest dysplazja kampomeliczna (*campomelic dysplasia* – CD). Jest to rzadki, zazwyczaj letalny zespół wad wrodzonych dotyczących głównie szkieletu. Około 75% chorych o męskiej płci genetycznej wykazuje częściowe lub całkowite odwrócenie płci [11]. W przypadku częściowego odwrócenia płci chorzy charakteryzują się występowaniem gonad obojnaczych (*ovotestis*) oraz różnym stopniem obojnactwa narządów płciowych, np. występowaniem ślepej macicy, spodziectwem, obecnością szczątkowych przewodów Wolffa przy równoczesnym występowaniu żeńskich wewnętrznych narządów płciowych. W przypadku całkowitego odwrócenia płci wewnętrzne i zewnętrzne narządy płciowe są prawidłowo wykształcone w kierunku żeńskim, jednak jajniki są słabo rozwinięte, występują w postaci pasm łącznotkankowych, wykrywa się w nich jednak nieliczne pierwotne komórki pęcherzykowe. Analiza pacjentów z dysplazją kampomeliczną i translokacjami *de novo* długiego ramienia chromosomu 17 pozwoliła na zmapowanie genu odpowiedzialnego za tę chorobę w regionie 17q24.3-q25.1. Wkrótce wykazano, że mutacje w genie *SOX9*, zlokalizowanym w tym regionie, są przyczyną CD [8,38].

Gen *SOX9* zawiera 3 eksony kodujące białko o wielkości 509 AA, które ma funkcje czynnika transkrypcyjnego. W białku tym obecna jest domena HMG o sekwencji podobnej do *SRY*. W końcu C białka *SOX9* znajduje się domena aktywująca transkrypcję [33], której brak jest w białku *SRY*.

Mysi gen *sox9* ulega ekspresji w gonadzie pierwotnej oraz w zarodkowej tkance mezenchymatycznej w miejscach jej przekształcania się w chrząstkę, co precyzyjnie koreluje z fenotypem pacjentów z dysplazją kampomeliczną. To wskazuje na funkcję białka *sox9* jako ważnego regulatora procesu powstawania chrząstki [40]. W gonadzie pierwotnej ekspresja omawianego genu zachodzi u obu płci, rozpoczyna się w tym samym czasie co ekspresja *sry* i trwa z tendencją wzrastającą w okresie róż-

nicowania się jąder. Ponieważ aktywność genu *sox9* została wykazana również w rozwijających się jądrach kurcząt, można przypuszczać, że jest on zaangażowany w determinację płci wszystkich kręgowców [7,16].

Gen *WT1*

Analiza patologii zwanej Zespołem Denysa-Drasha (ang. *Denys-Drash syndrome* – DDS) okazała się pomocna w identyfikacji kolejnego genu zaangażowanego w determinację płci. Zespół Denysa-Drasha charakteryzuje się niedorozwojem nerek, występowaniem guza Wilmsa (dziecięcego raka nerek) oraz nieprawidłowościami rozwoju płciowego. Często obecny jest męski pseudohermafrodytyzm charakteryzujący się występowaniem mikropenisu, wnętrostwa lub spodziectwa i kariotypu 46,XY. Zdarza się również prawdziwy hermafrodytyzm, polegający na współwystępowaniu jądra i jajnika (często w postaci ovotestis). Opisano także przypadki czystej dysgenezy gonad XY z prawidłowo rozwiniętymi żeńskimi narządami płciowymi [4]. Dowiedziono, że molekularnym podłożem tego zespołu chorobowego są mutacje w genie *WT1* [27].

Gen *WT1* zawiera 10 eksonów kodujących białko o sekwencjach aminokwasowych charakterystycznych dla czynników transkrypcyjnych. Każdy z czterech eksonów, zlokalizowanych w końcu 3' genu, koduje motyw o strukturze palca cynkowego. Wykazano, że białko *WT1* wiąże się specyficznym z sekwencją DNA rozpoznawaną również przez czynnik *EGR1* (ang. *early growth response gene 1*) i działa jako represor transkrypcji [23]. Badania ekspresji genu *wt1* przeprowadzone na myszach ujawniły, że gen ten jest aktywny w nerkach, grzebieniu płciowym oraz w gonadach pierwotnych we wczesnym okresie zarodkowym [28]. Udział genu *WT1* w rozwoju płciowym stał się oczywisty, kiedy przez zastosowanie techniki *knockout* wykazano, że u myszy dysfunkcja tego genu prowadziła do agenezji gonad i nerek [19].

Gen *SF-1*

Istotnym wkładem w poznanie mechanizmu determinacji płci było sklonowanie genu *SF-1*, kodującego receptor jądrowy, istotny w regulacji hydroksylacji sterydów. Badania ekspresji genu *sf-1* przeprowadzono na myszach. Stwierdzono, że u dorosłych osobników *sf-1* ulega ekspresji w całej tkance steroidogenicznej, z jajnikami i jądrami włącznie, natomiast podczas rozwoju embrionalnego ekspresja zachodzi w grzebieniu płciowym i utrzymuje się w jądrze, podczas gdy w jajniku zostaje przerwana [12]. Zastosowanie techniki *knockout* w odniesieniu do genu *sf-1* u myszy wykazało, że dysfunkcja tego genu prowadzi do agenezji nadnerczy i gonad [22]. Wykazano następnie, że mutacja genu *SF-1* u człowieka jest związana z niedorozwojem nadnerczy oraz gonad. U pacjentki XY z mutacją genu *SF1* wykazano gonady taśmowe ze słabo rozwiniętymi kanalikami nasiennymi, poza tym wewnętrzne

i zewnętrzne narządy płciowe były prawidłowo rozwinięte w kierunku żeńskim [1]. Na tej podstawie wysunięto wniosek, że czynnik SF-1 poza funkcją w regulowaniu syntezy sterydów jest istotny w procesie determinacji płci.

Gen *DAX1*

Obserwacja, iż u niektórych pacjentek 46,XY występuje duplikacja w krótkim ramieniu chromosomu X przyczyniła się do poznania kolejnego *locus* zaangażowanego w rozwój płciowy. Region ulegający duplikacji nazwano DSS (ang. *dosage sensitive sex reversal*), zakładając, że występuje w nim gen, którego podwojenie u osób o kariotypie męskim powoduje odwrócenie płci [2]. Region DSS u prawidłowych kariotypowo kobiet występuje w chromosomach X (dwie kopie genu). Dodatkowa dawka DSS u kobiet z duplikacją (3 kopie DSS) nie powoduje patologicznych skutków. Jeżeli jednak kobieta przekaze ową duplikację męskiemu potomkowi 46,XY, który w prawidłowym układzie posiada tylko jedną kopię *locus* DSS, efekt białka SRY jest stłumiony efektem zdwojonej dawki DSS, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania rozwoju jąder i powstaje fenotyp żeński (żeńskie narządy płciowe, gonady dysgenetyczne, względnie gonady zawierające nieliczne pierwotne komórki pęcherzykowe). Sądzi się, że gen zlokalizowany w *locus* DSS nie jest istotny w różnicowaniu się jąder, ponieważ mężczyźni z chromosomem X zawierającym delecję tego *locus* nie wykazują nieprawidłowości [20]. Region DSS ma wielkość ok. 160 kb i pokrywa się częściowo z *locus* AHC (ang. *adrenal hypoplasia congenita*). Wewnątrz wspólnej części DSS i AHC zidentyfikowano gen *DAX1* (ang. *DSS-AHC critical region on the X chromosome, gene 1*). Ten gen zawiera 2 eksony kodujące białko o wielkości 470 AA, które zaliczane jest do nadrodziny jądrowych receptorów hormonalnych. C-końcowa część białka (225 AA) wykazuje znaczne (50%) podobieństwo do domen wiążących ligand (ang. *ligand-binding domain* – LBD) innych hormonalnych receptorów jądrowych. N-terminalna część białka zawiera domenę wiążącą się z DNA, złożoną z 4 niepełnych powtórzeń po 65–67 AA bogatych w cysteinę i glicynę [42]. Badania ekspresji genu *dax1* u myszy wykazały, że jest on aktywny w grzebieniu płciowym u zarodków męskich i żeńskich, następnie ekspresja zostaje zahamowana w rozwijających się jądrach, podczas gdy w jajnikach trwa dłużej [34]. Na tej podstawie przypuszczano, że gen *DAX1* może być istotnym czynnikiem w rozwoju jajnika [34,42]. Jednak później wykazano, że u myszy *knockout* pod względem genu *DAX1* zachodzi normalny rozwój gonad żeńskich [41]. Następnie opisano przypadki mutacji homozygotycznych genu *DAX1* u kobiet charakteryzujących się małymi jajnikami, lecz o normalnej budowie [24].

Odwrócenie płci u pacjentek 46,XY z duplikacją *DAX1* prowadzi do hipotezy, że podwyższona ekspresja *DAX1* przeciwdziała rozwojowi jąder. Jednak wyniki doświadczeń na zwierzętach transgenicznym pod względem omawianego genu są

nader kontrowersyjne. Zgodnie z oczekiwaniem myszy XY z dodatkowymi kopiami *dax1* nie wykazują odwrócenia płci, pomimo nadwyżki mRNA i białka DAX1 w jądrach. Z kolei wprowadzenie transgenu *sry* do myszy XX, co w prawidłowym układzie powoduje rozwój jąder, nie ma miejsca, jeśli wprowadzi się dodatkowo kopię *dax1*. Sugeruje to, że *dax1* może antagonizować efekt *sry* [35]. Kontrowersyjne wyniki doświadczeń na myszach transgenicznym sugerują, że odwrócenie płci u pacjentek XY z duplikacją regionu DSS może być bardziej skomplikowane niż proponowany wcześniej efekt dawki.

III. ODDZIAŁYWANIA MIĘDZY BIAŁKAMI KODOWANYMI PRZEZ GENY DETERMINACJI I ROZWOJU PŁCI SSAKÓW

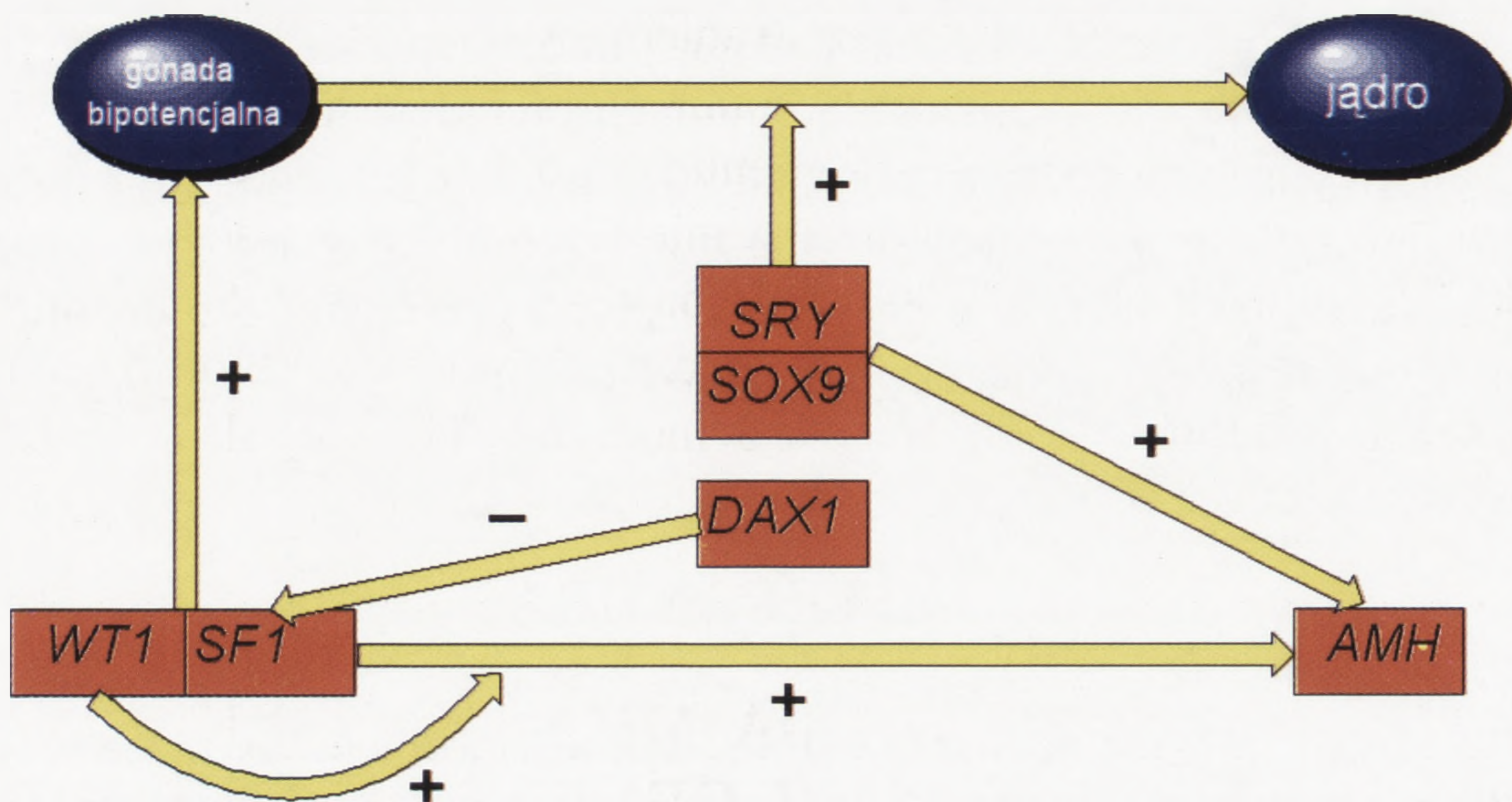
Po tym jak zidentyfikowano kilka pierwszych genów odpowiedzialnych za proces determinacji płci u ssaków, badania podążyły w kierunku poznania kolejności działania kodowanych przez nie białek w czasie rozwoju organizmu oraz poznania związków funkcjonalnych między nimi. Jak dotąd udało się ustalić kilka zależności między niektórymi z tych białek.

Oddziaływanie białek DAX1 i SF1

Badania *in vivo* z wykorzystaniem metody *two-hybrid* oraz analizy biochemiczne wykazują, że obie domeny białka DAX1: N-terminalna oraz domena wiążąca ligand fizycznie oddziałują z białkiem SF1 [5,23]. Wykazano, że DAX1 przez wiązanie się z czynnikiem SF1 hamuje jego transaktywacyjną funkcję [12,19,23]. Wprawdzie mutacje występujące w genie *DAX1* nie zaburzają interakcji białek DAX1 i SF1, ale znacznie zmniejszają represyjną funkcję DAX1 [6].

Regulacja ekspresji genu *AMH* przez SF1/SOX9/WT1/SRY

Regulacja transkrypcyjna genu *AMH* (ang. *anti-Mullerian hormone*) jest najlepiej poznanym aspektem różnicowania płci na poziomie molekularnym. Wykazano, że promotor genu *AMH* zawiera miejsce wiązania czynnika SF1. Wykazano, że miejsce to jest niezbędne dla aktywności promotora *AMH in vitro* i *in vivo*. Transfekcja SF1 do heterologicznych linii komórkowych aktywuje transkrypcję *AMH* [25,29]. Na tej podstawie można wnioskować, że SF1 poza funkcją w tworzeniu gonad jest kluczowym regulatorem *AMH in vivo*. Niedawno zidentyfikowano heterozygotyczną mutację zmiany sensu w genie *SF1*, która wystąpiła w sekwencji kodującej domenę białka odpowiedzialnej za wiązanie się z DNA. To odkrycie potwierdza



RYSUNEK 1. Oddziaływania pomiędzy genami zaangażowanymi w determinację płci: Geny *SF1* i *WT1* są odpowiedzialne za formowanie się gonady pierwotnej. Geny *SRY* i *SOX9* są zaangażowane w proces przekształcania się gonady pierwotnej w jądro. Białko *DAX1* hamuje ekspresję genu *SF1*. Białka *SRY*, *SOX9* oraz *SF1* aktywują ekspresję genu *AMH*. Białko *WT1* przez wiązanie się z *SF1* powoduje wzrost ekspresji genu *AMH*.

rolę *SF1* w determinacji rozwoju jąder oraz w regulacji *AMH*, ponieważ pacjent XY posiadał dysgenetyczne gonady i w pełni rozwinięte struktury Müllera [1]. Fakt, że transkrypty *AMH* są wykrywane, zanim poziom *SF1* wzrośnie znacząco w jądrach, sugeruje, że inny czynnik niż *SF1* inicjuje ekspresję *AMH*. Wiadomo, że co najmniej trzy dodatkowe białka mają wpływ na regulację ekspresji tego genu. Pierwszym z nich jest *SOX9*, który wiąże się z promotorem *AMH*, z miejscem bardziej dystalnym w stosunku do miejsca wiązania *SF1*. Białko *SOX9* oddziałuje także z *SF1* i współdziała w aktywacji genu *AMH* [7]. Drugim czynnikiem wpływającym na ekspresję *AMH* jest produkt genu *WT1*. Nie wiąże się on do promotora *AMH*, ale fizycznie oddziałuje z czynnikiem *SF1*, powodując znaczący wzrost ekspresji *AMH in vitro*. Mutacje w genie *WT1*, zidentyfikowane u pacjentów z guzem Wilmsa i nieprawidłowościami rozwoju płciowego, powodują zniesienie współdziałania białek *SF1* i *WT1* [25]. Kolejnym czynnikiem regulującym transkrypcję z promotora *AMH* jest białko *SRY*, którego domena HMG wiąże się z promotorem genu *AMH* powodując wzrost jego ekspresji [9].

UWAGI KOŃCOWE

Mutacje w poznanych dotąd genach odpowiedzialnych za determinację płci, warunkują odwrócenie płci XY w stosunkowo niewielkiej liczbie przypadków tej patologii. To sugeruje, że przyczyną większości przypadków są mutacje innych, nie

poznanych jeszcze genów. Obecnie badania skupiają się na identyfikacji nowych genów zaangażowanych w proces determinacji płci. Jest to niezwykle ważne nie tylko z punktu widzenia poznawczego, ale również medycznego, gdyż można oczekiwać, że informacje na temat nowych genów pomogą w lepszym zrozumieniu patologii determinacji płci, a w przyszłości mogą przyczynić się do opracowania bardziej nowoczesnych i skutecznych metod terapii.

LITERATURA

- [1] ACHERMANN J, ITO M, HINDMARSH P, JAMESON J. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 1999; **22**: 125–126.
- [2] BARDONI B, ZANARIA E, GUIOLI S, FLORIDIA G, WORLEY KC, TONINI G, FERRANTE E, CHIUMELLO G, McCABE ERB, FRACARRO M, ZUFFARDI O, CAMERINO G. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genetics* 1994; **7**: 497–500.
- [3] BERTA P, HAWKINS JR, SINCLAIR AH, TAYLOR A, GRIFFITHS BL, GOODFELLOW PN, FELLOUS M. Genetic evidence equating SRY and the testis determining factor. *Nature* 1990; **348**: 448–450.
- [4] BRUENING W, BARDESSY N, SILVERMAN BL, COHN RA MACHIN GA, ARONSON AJ, HOUSMAN D, PELLETIER J. Germline intronic and exonic mutations in the Wilms' tumor gene (*WT1*) affecting urogenital development. *Nature Genet* 1992; **1**: 144–148.
- [5] CAMERON FJ, SINCLAIR AH. Mutations in *SRY* and *SOX9*: testis-determining genes. *Hum Mut* 1997; **9**: 388–395.
- [6] CRAWFORD PA, DORN C, SADOVSKY Y, MILBARANDT J. Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 2949–2956.
- [7] de SANTA BARBARA P, BONNEAUD N, BOIZET B, DESCLOZEAUX M, MONIOT B, SUDBECK P, SCHERER G, PAULAT F, BERTA P. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 6653–6665.
- [8] FOSTER JW, DOMINGUEZ-STEGLICH MA, GUIOLI S, KWOK C, WELLER PA, STEVANOVIC M, WEISSENBACH J, MANSOUR S, YOUNG ID, GOODFELLOW PN, BROOK JD, SCHAFER AJ. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 1994; **372**: 525–530.
- [9] HAQQ CM, KING CY, UKIYAMA E, FALSAFI S, HAQQ TN, DONAHOE PK, WEISS MA. Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Müllerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science* 1995; **266**: 1494–1500.
- [10] HAWKINS JR. Mutational analysis of *SRY* in XY females. *Hum Mut* 1993; **2**: 347–350.
- [11] HOUSTON CS, OPITZ JM, SPRANGER JW, MACPHERSON RI, REED MH, GILBERT EF, HERRMANN J, SCHINZEL A. The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year old boy first reported by Maroteaux et al. In 1971. *Am J Med Genet* 1983; **15**: 3–28.
- [12] IKEDA Y, SHEN WH, INGRAHAM HA, PARKER KL. Developmental expression of mouse steroidogenic factor 1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol* 1994; **8**: 654–662.

- [13] ITO M, YU R, JAMESON JL. DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 1476–1483.
- [14] JÄEGER RJ, ANVERT M, HALL K, SCHERER G. A human XY female with a frameshift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 1990; **349**: 452–454.
- [15] KENT J, WHEATLLEY S.C., ANDREWS JE, SINCLAIR AH, KOOPMAN P. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 1996; **122**: 2813–2822.
- [16] JIMENEZ R and BURGOS M. Mammalian sex determination: joining pieces of the genetic puzzle. *BioEssays* 1998; **20**: 696–699.
- [17] KOOPMAN P, MÜNSTERBERG A, CAPEL B, VIVIAN N, LOVELL-BADGE R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 1990; **348**: 450–452.
- [18] KOOPMAN P, GUBBAY J, VIVIAN N, GOODFELLOW P, LOVELL-BADGE R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991; **351**: 117–121.
- [19] KREIDBERG JA, SARIOLA H, LORING JM, MAEDA M, PELLETIER J, HOUSMAN D, JAENISH R. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993; **74**: 481–490.
- [20] KUSZ K, CHŁYSTUN M, JARUZELSKA J. Kobieta czy mężczyzna? Molekularny mechanizm determinacji płci. [w] KORONIAK H, BARCISZEWSKI J, MARKIEWICZ WT, ZIEMNICKI K [red.] Na pograniczu chemii i biologii. 1998; **1**: 83–89.
- [21] LALLI E, BARDONI B, ZAZOPOULOS E, WURTZ JM, STROM TM, MORAS D, SASSONE-CORSI. A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 1950–1960.
- [22] LUO X, IKEDA Y, PARKER KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 1994; **77**: 481–490.
- [23] MADDEN S, COOK D, MORRIS J, GASHLER A, SUKHATME V, RAUSCHER III F. Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms' tumor gene product. *Science* 1991; **254**: 1550–1553.
- [24] MARKE DP, TAJIMA T, BARON J, CUTLER GB Jr. Hypogonadotropic hypogonadism in a female caused by an X-linked recessive mutation in the DAX1 gene. *N Engl J Med* 1999; **340**: 1248–1252.
- [25] NACHTIGAL MW, HIROKAWA Y, ENYEART-VanHOUTEN DL, FLANAGAN JN, HAMMER GD, INGRAHAM HA. Wilms' tumor1 and Dax-1 modulate the orphan receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 1998; **93**: 445–454.
- [26] PAGE DC, MOSHER R, SIMPSON EM, FISHER EM, MARDON G, POLLACK J, MCGILLIVRAY B, de la CHAPELLE A, BROWN LG. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 1987; **5**: 1091–1104.
- [27] PELLETIER J, BRUENING W, KASHTAN CE, MAUER SM, MANIVEL JC, STRIEGEL JE, HOUGHTON DC, JUNIEN C, HABIB R, FOUSER L, FINE RN, SILVERMAN BL, HABER DA, HOUSMAN D. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 1991; **67**: 437–447.
- [28] PRITCHARD-JONES K, FLEMING S, DAVIDSON D, BRICKMOR W, PORTEOUS D, GOSDEN C, BARD J, BUCKLER A, PELLETIER J, HOUSMAN D, HEYNINGEN V, HASTIE N. The candidate Wilms' tumor gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1991; **346**: 194–197.
- [29] SHEN WH, MOORE CC, IKEDA Y, PARKER KL, INGRAHAM HA. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 1994; **77**: 651–661.
- [30] SINCLAIR AH, BERTA P, PALMER MS, HAWKINS JR, GRIFFITHS BL, SMITH MJ, FOSTER JW, FRISCHAUF AM, LOVELL BADGE R, GOODFELLOW PN. A gene from the

- human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990; **346**: 240–244.
- [31] SU H, LAU YC. Identification of the transcription unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet* 1993; **52**: 24–38.
- [32] SINCLAIR AH. Human sex determination. *J Exp Zool* 1998; **281**: 501–505.
- [33] SÜDBECK P, SCHMIT ML, BAEUERLE PA, SCHERER G. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nature Genet* 1996; **13**: 230–232.
- [34] SWAIN A, ZANARIE E, HACKER A, LOVELL-BADGE R, CAMERINO G. Mouse Dax 1 expression is consistent with a role in sex determination as adrenal and hypothalamus function. *Nature Genetics* 1996; **12**: 404–409.
- [35] SWAIN A, NARVAEZ V, BURGOYNE P, CAMERINO G, LOVELL-BADGE R. Dax1 antagonizes sry action in mammalian sex determination. *Nature* 1998; **391**: 761–767.
- [36] SZARRAS-CZAPNIK M, ROMER TE. Zaburzenia różnicowania narządów płciowych. [w] ROMER TE [red.] Zaburzenia hormonalne u dzieci i młodzieży. 1993: 140–161.
- [37] WAGNER T, WIRTH J, MEYER J, ZABEL B, HELD M, ZIMMER J, PASANTES J, BRICARELLI F, KEUTEL J, HUSTER E, WOLF U, TOMMERUP N, SCHEMPP W, SCHERER G. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 1994; **79**: 1111–1120.
- [38] WERNER MH, HUTH JR, GRONENBORN AM, CLORE GM. Molecular basis of human 46,XY sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex. *Cell* 1995; **81**: 705–714.
- [39] WRIGHT E, HARGRAVE MR, CHRISTIANSEN J, COOPER L, KUN J, EVANS T, GANGADHARAN U, GREENFIELD A, KOOPMAN P. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nature Genet* 1995; **9**: 15–20.
- [40] VILIAN E, McCABE ERB. Mammalian sex determination: from gonads to brain. *Mol Gen Met* 1998; **65**: 74–84.
- [41] YU RN, ITO M, SAUNDERS TL, CAMPER S.A., JAMESON JL. Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat genet* 1998; **20**: 353–357.
- [42] ZANARIA E, MUSCATELLI F, BARDONI B, STORM TM, GUIOLDI S, GUO W, LALLI E, MOSER C, WALKER AP, McCABE ERB, MEITINGER R, MONACO AP, SASSONE-CORSI P, CAMERINO G. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 1994; **372**: 635–641.

Adres autora: mgr Kamila Kusz Zakład Genetyki Człowieka, PAN, 60-479 Poznań ul. Strzeszyńska 32

**DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA CHROMOSOMU Y
U MEŹCZYŹN Z ZABURZENIAMI
SPERMATOGENEZY KORZYSTAJĄCYCH
Z ZAPŁODNIENIA *IN VITRO****

MOLECULAR ANALYSIS OF Y CHROMOSOME IN MEN
WITH DEFECTS OF SPERMATOGENESIS UNDERGOING
IN VITRO FERTILIZATION

Aleksandra KORCZ, Maciej KOTECKI, Alina WOJDA, Jadwiga JARUZELSKA

Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Streszczenie: Czynniki męskie są przyczyną niepowodzeń rozrodu u około 50% nieplodnych par małżeńskich. Większość nieplodnych mężczyzn zgłaszających się do ośrodków leczenia niepłodności jest poza tym zdrowa. W ostatnich dwóch dekadach coraz więcej uwagi poświęca się potencjalnemu genetycznemu podłożu niepłodności. Znacznym postępowaniem w tej dziedzinie było wykazanie, że delecje w regionie AZF długiego ramienia chromosomu Y są jedną z przyczyn niepłodności mężczyzn nie powodując skutków somatycznych. Stale poszerzająca się wiedza na temat struktury chromosomu Y przyczyniła się do opracowania molekularnych testów wykrywania tych delecji u pacjentów korzystających z metod wspomaganego rozrodu, a w szczególności z docytoplazmatycznej iniekcji plemników (ICSI). Metody te umożliwiły posiadanie potomstwa nieplodnym mężczyznom, nawet tym, u których występują ciężkie zaburzenia spermatogenezy. Jednocześnie ominięcie naturalnych barier biologicznych związanych z procesem zapłodnienia przy zastosowaniu tych metod stwarza ryzyko przeniesienia defektu genetycznego na potomka płci męskiej. Stąd, molekularna diagnostyka chromosomu Y oraz udzielenie porady genetycznej małżeństwom korzystającym z metod wspomaganego rozrodu są niezwykle istotne.

Słowa kluczowe: chromosom Y, region AZF, niepłodność męska, zaburzenia spermatogenezy, oligospermia, azospermia, zapłodnienie *in vitro*

*Źródło finansowania: grant KBN 4P05E 045 12 przyznany Aleksandrze Korcz oraz grant Howard Houghes Medical Institute 75195-543601 przyznany Maciejowi Koteckiemu

Summary: In about 50% of infertile couples the male factor is involved. However, the majority of infertile males who visit centers specialized in treatment of infertility are otherwise healthy. In the last two decades more and more attention is paid to potential genetic background of infertility. Significant progress was made in this field since it was demonstrated that deletions of *AZF* region on the Y-chromosome cause infertility in some otherwise healthy males. The constantly growing knowledge on the structure of the Y-chromosome was essential for establishing molecular tests of screening of *AZF* deletions in patients who undergo assisted reproduction procedures, including intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI). These methods offer the possibility to infertile males, even to those with severe spermatogenic failure, to conceive children. However, such fertilization process causes the risk of transmission of the genetic defect to the male offspring. Therefore, molecular analysis of the Y-chromosome and genetic counseling are crucial for treated couples.

Key words: Y chromosome, male infertility, defects of spermatogenesis, oligospermia, azoospermia, *in vitro* fertilization

WSTĘP

Trudności z uzyskaniem potomstwa stanowią jeden z istotnych problemów medyczno-społecznych, który wydaje się narastać w ostatnich latach. Według danych z różnych źródeł na świecie, 10–15% par cierpi na niepłodność, a u około połowy z nich przyczyną niepowodzeń rozrodu jest niepłodność męska. Przyczyny niepłodności męskiej są różnorodne. Zalicza się do nich zakażenia bakteryjne i wirusowe, reakcje autoimmunologiczne, żylaki powrózka nasiennego, nadużywanie określonych leków (np. sterydów anabolicznych), zaburzenia hormonalne, czynniki środowiskowe i inne.

Jednak znaczna liczba wszystkich przypadków niepłodności męskiej (45–66%) to tzw. niepłodność idiopatyczna, w której przyczyna zaburzenia nie jest znana [23,27]. W tej licznej grupie mężczyzn charakteryzujących się niepłodnością idiopatyczną, występuje potencjalne podłoże genetyczne choroby. W ostatnich latach poświęca się dużo uwagi badaniom genów odpowiedzialnych za płodność oraz ich defektom, a także metodom diagnostyki molekularnej. Celem niniejszego przeglądu było przedstawienie wybranych aspektów tego zagadnienia.

PROCES SPERMATOGENEZY I JEGO ZABURZENIA

Za różnicowanie komórek germinalnych prowadzące do wytwarzania dojrzałych plemników, odpowiedzialny jest proces spermatogenezy. Proces ten przebiega dwuetapowo: w pierwszym etapie w wyniku podziału mejotycznego ze spermatogonii (liczba $2n$) powstają spermatocyty, a następnie spermatydy ($1n$); w drugim etapie zwanym spermioogenezą ze spermatyd powstają plemniki. Spermatogeneza zachodzi

w jądrach, rozpoczyna się w wieku pokwitania i może trwać do końca życia. Jednak o jej powodzeniu decydują tzw. macierzyste komórki germinalne, które są wykrywane już w drugim tygodniu życia embrionalnego oraz ich prawidłowa interakcja z komórkami Sertolego. Można oczekiwać, że mutacja genu odpowiedzialnego za specyficzny etap rozwojowy komórek płciowych może spowodować niepłodność. Zaburzenia spermatogenezy występują u około 2% mężczyzn w całej populacji [34].

Ważnym kryterium w klinicznej klasyfikacji zaburzeń spermatogenezy jest analiza nasienia, w której oceniana jest morfologia, ruchliwość, żywotność oraz liczba plemników. Zgodnie z tymi kryteriami wyróżnia się następujące fenotypy kliniczne: azoospermia – brak plemników, oligospermia – obniżona liczba plemników, astenoospermia – obniżona ruchliwość plemników i teratoospermia – nieprawidłowa budowa plemników. Innym, znacznie precyzyjniejszym kryterium klasyfikacji zaburzeń spermatogenezy jest analiza histologiczna wycinków tkanki jąder pacjentów. Najczęstsze fenotypy histologiczne, które stwierdza się w tym badaniu, to: zespół komórek Sertolego (całkowity brak komórek germinalnych), zahamowanie podziału mejozy (brak spermatocytów lub spermatyd), hipospermatogeneza (zmniejszona liczba komórek germinalnych w poszczególnych stadiach rozwojowych).

POSZUKIWANIE GENÓW CHROMOSOMU Y ODPOWIEDZIALNYCH ZA PROCES SPERMATOGENEZY

Molekularne podłoże męskiej niepłodności jest jak dotąd słabo poznane, pomimo iż wiele genów odpowiedzialnych za spermatogenezę zostało już zidentyfikowanych [19, 21, 22, 30, 31, 32, 33, 46]. Genetycznie uwarunkowana niepłodność męska znana była, jak dotąd, jedynie jako jedna z cech towarzyszących zespołom genetycznym, jak np. zespołowi Klinefeltera, Kallmanna, zespołowi mężczyzny XX [37].

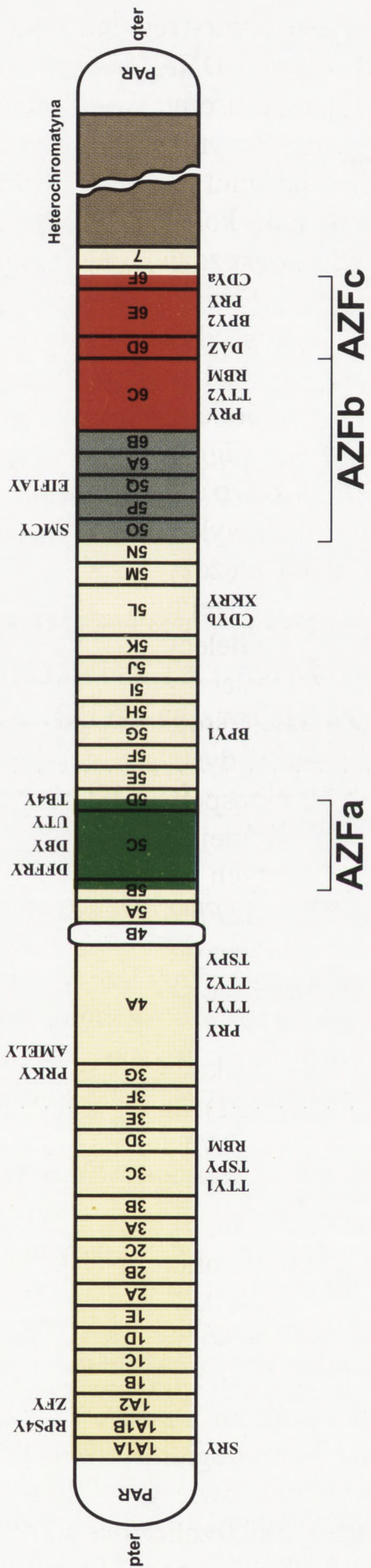
U większości mężczyzn zgłaszających się do ośrodków leczenia niepłodności brak jest nieprawidłowości somatycznych. Stąd, bardzo dużym postępem w badaniu genetycznego podłoża niepłodności męskiej była cytogenetyczna identyfikacja delecji długiego ramienia chromosomu Y u mężczyzn z azoospermią. Niepłodni mężczyźni, u których wykryto delecje chromosomu Y, byli poza tym zdrowi, a u ich ojców delecje nie występowały. Dane te skłoniły autorów do wysunięcia hipotezy, że na długim ramieniu chromosomu Y występuje gen(y) istotny dla procesu spermatogenezy (*AZF* – *azoospermia factor*) oraz że jego dysfunkcja powoduje niepłodność. Stąd, region długiego ramienia chromosomu Y, w którym koncentrowały się delecje, nazwano regionem *AZF* [42].

Kluczową strategią w badaniu struktury regionu AZF było tzw. mapowanie delecyjne. Polegało ono na hybrydyzacji DNA, pochodzącego od pacjentów wykazujących różny zakres delecji chromosomu Y określonych cytogenetycznie, ze specyficznymi sondami komplementarnymi do *loci* chromosomu Y [16, 44]. Zastosowanie powyższej strategii w badaniu struktury chromosomu Y, w tym regionu AZF, doprowadziło do opracowania kolejnych map fizycznych chromosomu Y charakteryzujących się coraz większą rozdzielczością [7, 48]. Jednocześnie bardzo dynamicznie postępowało sekwencjonowanie DNA chromosomu Y. Obydwa podejścia badawcze, zarówno mapowanie delecyjne jak i sekwencjonowanie DNA, zaowocowały m.in. prostymi testami analizy chromosomu Y, w tym regionu AZF. Testy te polegają na amplifikacji krótkich sekwencji DNA o znanym położeniu w regionie AZF, tzw. STS (*sequence tagged site*) z zastosowaniem specyficznych starterów. Sekwencje STS stały się bardzo użytecznymi markerami umożliwiającymi wykrycie nawet bardzo drobnych, niewykrywalnych metodami cytogenetycznymi delecji regionu AZF u niepłodnych mężczyzn [8, 14, 24, 27, 29, 30, 31, 38].

Intensywne badania regionu AZF u dużej liczby niepłodnych mężczyzn pozwoliły dostrzec korelacje między położeniem delecji w obrębie AZF a fenotypem pacjenta. Mianowicie, delecje proksymalnej części regionu AZF były najczęściej powiązane z zespołem komórek Sertolego, delecje środkowej części AZF z zatrzymaniem podziału mejozy, natomiast delecje dystalnej części z różnorodnymi fenotypami (od zespołu komórek Sertolego do hipospermatogenezy) [46,47]. Stąd, region AZF został arbitralnie podzielony na najbardziej proksymalny podregion *AZFa*, środkowy *AZFb* oraz dystalny *AZFc*. Wielkość tych nie zachodzących na siebie podregionów oszacowano na 1–3 Mb dla *AZFa* i *AZFb* oraz około 1,4 Mb dla *AZFc*. Opisane powyżej korelacje genotyp-fenotyp wskazywały, że w wymienionych podregionach AZF kodowane są odrębne geny różniące się funkcją w procesie spermatogenezy.

W ciągu ostatnich kilku lat zidentyfikowano ponad 20 genów w chromosomie Y [19, 21, 22, 30, 31, 32, 33, 46] (rys. 1). Jako pierwsze w regionie AZF wykryto dwie rodziny genów: *RBM* (od ang. *RNA-binding motif*, poprzednio nazywana *YRRM*) [22] oraz *DAZ* (od ang. *deleted in azoospermia*) [30]. Podobieństwo między genami *DAZ* a *RBM* przejawia się tym, że zarówno jedno, jak i drugie ulegają specyficznej ekspresji w komórkach germinalnych jądra oraz tym, że kodują białko zawierające domenę wiążącą RNA [3, 10, 22]. Natomiast geny te różnią się liczbą kopii oraz lokalizacją w obrębie chromosomu Y. Mianowicie, geny *RBM* występują w kilkudziesięciu kopiach występujących zarówno w regionie AZF, jak i poza nim, również w krótkim ramieniu chromosomu Y. Natomiast geny *DAZ* występują jedynie w kilku kopiach i są skupione w podregionie *AZFc* [19, 32].

W regionie AZF można wyróżnić dwie grupy genów różniących się między sobą w istotny sposób. Do pierwszej z nich zalicza się geny, które występują wyłącznie na chromosomie Y, natomiast do drugiej geny, których kopia występuje również



RY SUNEK 1. Schemat chromosomu Y : Interwały oznaczone wg Volratha [48], a podregiony *AZFa*, *AZFb* i *AZFc* wg Vogta [46]; Pter – część terminalna ramienia krótkiego, qter – część terminalna ramienia długiego, PAR – regiony pseudoautosomowe; regiony pseudoautosomowe oraz heterochromatyna nie są przedstawione proporcjonalnie; *SRY* – gen determinacji płci (warunkujący różnicowanie jąder), *TTY1*, *TSPY*, *PRY*, *TTY2*, *BPI1*, *CDYb*, *XKRY*, *RBM*, *DAZ*, *CDYa* – geny ulegające specyficznej ekspresji w jądrach opisane w tabeli 1A; *DFFRY*, *DBY*, *UTY*, *TB4Y*, *SMCY*, *EIF1AY* – geny ulegające ekspresji w różnych tkankach opisane w tabeli 1B; *RPS4Y* – gen kodujący izoformę białka rybosomalnego; *ZFY* – gen kodujący białko o strukturze "palców cynkowych"; *PRKY* – gen kodujący kinazę białkową; *AMELY* – gen kodujący amelogeninę

na chromosomie X lub na autosomach. Obecność kopii X i Y tego samego genu pokazuje, że chromosomy płci ssaków wyewoluowały z pary chromosomów homologicznych. Ponadto geny specyficzne dla chromosomu Y występują zwykle w większej liczbie kopii i ulegają specyficznej ekspresji w gonadzie męskiej, podczas gdy geny mające odpowiednik na chromosomie X występują w pojedynczych kopiach (1 kopia Y i jedna kopia X) oraz ulegają ekspresji w różnych tkankach organizmu (tab. 1) [19]. Można oczekiwać, że delecja genu występującego wyłącznie na chromosomie Y ma bardziej drastyczne skutki fenotypowe niż delecja genu, który ma odpowiednik na chromosomie X. Wszystkie defekty genów regionu *AZF* zidentyfikowane do tej pory to mniejsze lub większe delecje, w których najczęściej dochodzi do utraty więcej niż jednego genu. Stwarza to trudności w korelowaniu defektu specyficznego genu z fenotypem pacjenta. Pierwsza i jak dotąd jedyna mutacja punktowa regionu *AZF* została zidentyfikowana w genie *DFFRY (USP9Y)* [40] i występowała *de novo*. Stąd można przyjąć, że była ona przyczyną niepłodności.

STRATEGIA DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ CHROMOSOMU Y U MĘŻCZYŹN KORZYSTAJĄCYCH Z METODY ICSI

Wprowadzenie metod wspomaganego rozrodu, a w szczególności docytoplazmatycznej iniekcji plemników (ang. ICSI – *intracytoplasmic sperm injection*) [26], umożliwiło posiadanie potomstwa niepłodnym mężczyznom, w tym również mężczyznom z ciężkimi zaburzeniami spermatogenezy, objawiającymi się klinicznie jako azoospermia lub ciężka postać oligospermii. Metoda ICSI polega na wstrzyknięciu pojedynczego plemnika do cytoplazmy komórki jajowej. W przypadku kandydatów do ICSI, u których występuje azoospermia, zabieg ten jest poprzedzony mikrochirurgicznym uzyskaniem plemników z najądrzy (*MESA – Micro-Epididymal Sperm Aspiration*) lub izolacją plemników z jądra (*TESE – Testicular Sperm Extraction*).

Analiza delecyjna chromosomu Y na podstawie wspomnianych w poprzednim podrozdziale markerów STS jest jak dotąd najbardziej precyzyjną metodą analizy molekularnej chromosomu Y u pacjentów przygotowujących się do ICSI. W przypadku pacjentów z azoospermią materiałem do analizy molekularnej regionu *AZF* jest DNA izolowany z krwi obwodowej. Jeśli w nasieniu pacjenta obecne są plemniki, mogą one również być użyte jako źródło DNA. Ponadto, opracowanie metod analizy DNA z pojedynczego plemnika [20] daje możliwość wykrycia mozaicyzmu, czyli współistnienia plemników bez delecji *AZF* z plemnikami obciążonymi delecją. Uzyskany od pacjenta DNA poddawany jest łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z zastosowaniem starterów komplementarnych do wybranych markerów STS, a uzyskane produkty amplifikacji analizowane są w żelach agarozowych. W przypadku

braku produktu amplifikacji reakcje wykonuje się 3-krotnie dla potwierdzenia wyniku delecji. W przypadku stwierdzenia delecji należy również przeprowadzić ten sam test STS-PCR na DNA ojca pacjenta, aby wykazać, czy delecja wystąpiła *de novo*, czy też została odziedziczona po ojcu. Ten etap analizy jest bardzo istotny, ponieważ tylko delecja *de novo* może być uznana za przyczynę niepłodności pacjenta. Wiadomo bowiem, że chromosom Y poza genami istotnymi dla spermatogenezy zawiera również sekwencje nieistotne dla funkcjonowania organizmu i delecje tych ostatnich mogą być przekazywane z ojca na syna bez żadnych negatywnych skutków na płodność [27]. Jednak istnieją trzy doniesienia o pojedynczych przypadkach naturalnego przeniesienia delecji AZF z ojca na syna [4, 38, 46].

Bardzo istotnym aspektem molekularnej diagnostyki chromosomu Y jest również dobór markerów STS. Najbardziej użyteczne do analizy są markery występujące w jednej kopii lub ograniczone do wąskiego regionu chromosomu Y. W przypadku użycia STS występujących w kilku kopiach wyniki negatywne pojawią się tylko wtedy, gdy brakuje znacznej części chromosomu Y, a z kolei wynik pozytywny nie będzie dowodem na to, że wszystkie kopie sekwencji markera lub genu są obecne [15]. Ze względu na charakterystyczne właściwości chromosomu Y, w którym znaczną część stanowią sekwencje repetytywne oraz rodziny genowe, stosuje się także markery występujące w wielu kopiach, które mogą być rozproszone lub zgrupowane. Przy interpretacji wyników należy jednak pamiętać, że negatywny wynik PCR otrzyma się tylko wtedy, gdy delecji ulegną wszystkie kopie genu lub markera [15]. Należy stosować tylko te markery, które dają powtarzalne wyniki. Należy ponadto wykluczyć markery polimorficzne, tzn. takie, których delecje występują bez żadnych widocznych skutków u płodnych mężczyzn [27, 28].

W doborze markerów STS należy kierować się również tym, aby reprezentowały one wszystkie trzy podregiony, AZFa, b i c. Niesłusznie wielu badaczy analizuje tylko markery STS specyficzne dla regionu AZFc, w którym występuje rodzina genów *DAZ*. Jest to niewłaściwe, ponieważ delecje w podregionach AZFa i b, chociaż występują rzadziej, są zazwyczaj powiązane z ciężkimi zaburzeniami spermatogenezy, a zatem z niedobrym rokowaniem na powodzenie ICSI [25, 28, 36]. Zestaw markerów do analizy chromosomu Y przedstawiono wg Page'a [25] w tabeli 2.

WYNIKI ANALIZY MOLEKULARNEJ CHROMOSOMU Y U NIEPŁODNYCH MĘŻCZYŹN POCHODZĄCE Z RÓŻNYCH OŚRODKÓW NA ŚWIECIE

Wykazano, że delecje występują najczęściej w podregionie AZFc [6, 25, 35, 41]. Częstości występowania delecji u mężczyzn z zaburzeniami spermatogenezy podawane przez różnych autorów są rozbieżne: skrajne wartości wynoszą 1% [43]

TABELA 1. Geny oraz rodziny genów zmapowane w regionie AZF

Symbol genu	Nazwa genu	Komentarz	Homolog białkowy	Homolog auto-somalny
A. Geny ulegające ekspresji tylko w jądrach				
<i>BPY1</i>	Basic protein Y1	Białko zasadowe o nieznannej funkcji		
<i>BPY2</i>	Basic protein Y2	Białko zasadowe o nieznannej funkcji		
<i>CDY</i>	Chromodomain Y	chromodomena Y	białko upakowania chromatyny	
<i>DAZ</i>	Deleted in azoospermia	ulegający delecji w azoospermii	białka wiążące RNA	3p24; <i>DAZL1</i>
<i>PRY</i>	PTP-BL related Y	domniemane transportujące białko błonowe	fosfataza tyrozynowa	
<i>RBM</i>	RNA binding motif	zawierające motyw wiązania RNA (podrodziny <i>RBM1</i> i <i>RBM2</i>)	białka wiążące RNA	
<i>TSPY</i>	Testis specific protein Y encoded	specyficzne dla jąder białko kodowane przez Y	SET/NAP-1 regulujące różnicowanie komórek	
<i>TTY1</i>	Testis transcript Y 1	RNA niekodujący białka		
<i>TTY2</i>	Testis transcript Y 2	RNA niekodujący białka		
<i>XKRY</i>	XK related Y	domniemane transportujące białko błonowe		
B. Geny ulegające ekspresji w różnych tkankach				
<i>DBY</i>	DEAD Box Y	zawiera DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp), sekwencję mogącą służyć jako helikaza	helikaza RNA	<i>DBX</i>
<i>DFFRY</i>	<i>Drosophila</i> fat facets	homologiczny do enzymu u <i>Drosophila</i>	ubichytynowo-specyficzne proteazy	<i>DFFRX</i>
<i>eIF1AY</i>	Eukaryotic translation initiation factor 1 A Y	eukariotyczny czynnik inicjatorowy translacji	czynnik inicjatorowy translacji	<i>eIF1AX</i>
<i>SMCY</i>	Selected mouse cDNA Y	koduje epitop antygeny H-Y	antygen H-Y HLA B7	<i>SMCX</i>
<i>TB4Y</i>	Thymosin B4 Y	może brać udział w sekwestracji aktyny		<i>TB4X</i>
<i>UTY</i>	Ubiquitous TPR motif Y	zawiera 10 tandemowych powtórzeń motywu <i>TPR</i> , które mogą przyczyniać się do interakcji białko-białko		<i>UTX</i>

TABELA 2. Markery DNA chromosomu Y wg Page'a i wsp. [25]; interwały delecyjne oznaczono wg Volratha i wsp. [48]

Marker DNA chromosomu Y (STS)	Gen lub locus	Interwał delecyjny	Marker DNA chromosomu Y (STS)	Gen lub locus	Interwał delecyjny
sY14	SRY	1A1A	sY595	<i>BPY1</i>	5G
sY274	RPS4Y	1A1B	sY638	<i>CDY</i>	5L, 6F
sY238	ZFY	1A2	sY591	<i>XKRY</i>	5L
sY19	DYS252	1A2-1B	sY119	DYS211	5M
sY57	DYS257	3C	sY121	DYS212	5N
sY634	<i>RBM</i>		SH34Y/SH35Y	<i>SMCY</i>	5O
sY594	<i>TTY1</i>	3C,4A	sY603	<i>EIF1AY</i>	5Q
Ex9A	<i>PRKY</i>	3G-4A	F20/E355	<i>RBM</i>	
sY276	<i>AMELY</i>	4A	sY142	DYS230	6C
sY601	<i>PRY</i>	4A, 6C, 6E	sY143	DYS231	6C
sY200	<i>TSPY</i>	3C, 4B	sY205	<i>DAZ</i>	6D, 6E
sY78	DYZ3	centromer	sY254	<i>DAZ</i>	6D, 6E
sY600	<i>TTY2</i>	4A	sY624	<i>DAZ</i>	6D, 6E
sY620	<i>DFRRY</i>	5C	sY602	<i>BPY2</i>	6E
sY610	<i>DBY</i>	5C	sY202		6E
sY592	<i>UTY</i>	5C	sY158	DYS241	6F
sY593	<i>TB4Y</i>	5D	sY159	DYZ1	7
sY90	<i>KALY</i>	5E	sY160	DYZ2	7

i 55% [9]. Jednak według większości autorów częstości wykrywanych delecji wynoszą 4–16% [17, 27, 36, 13, 25, 35, 46]. Istnieje kilka przyczyn tak dużych rozbieżności. Jedną z nich są różne kryteria oceny fenotypów histologicznych pacjentów. Inną przyczyną jest odmienny dobór pacjentów pod względem fenotypów klinicznych i histologicznych [2], ponieważ w niektórych badaniach poszukiwano delecji AZF w ściśle wyselekcjonowanych pod względem typu zaburzenia spermatogenezy grupach pacjentów [8, 9], natomiast w innych zakres fenotypów pacjentów był znacznie szerszy i obejmował nawet niepłodnych pacjentów o prawidłowej liczbie plemników [27]. Jeśli przyjąć jako kryterium fenotyp kliniczny, delecje AZF występują znacznie częściej u pacjentów z azoospermią 13% [35]; 6,7% [13]; 16% [17] niż u pacjentów z oligospermią 7% [35]; 3,6% [13]. Z kolei w przypadku kryterium histologicznego wysoką częstość delecji AZF (24,7%) wykryto w ciężkiej postaci hipospermatogenezy [6], natomiast najwyższą odnotowano w przypadku najcięższego typu zaburzenia spermatogenezy – w zespole komórek Sertolego (55,5%)[9]. Trzecią przyczyną rozbieżności może być stosowanie przez niektóre grupy markerów STS, które dają fałszywie pozytywne lub fałszywie negatywne wyniki. Można jednak oczekiwać, że znaczny postęp, który dokonuje się

w dziedzinie sekwencjonowania DNA chromosomu Y, przyczyni się do ulepszenia doboru markerów STS stosowanych w molekularnej diagnostyce regionu AZF u niepłodnych mężczyzn.

Bardzo istotnym aspektem analizy molekularnej chromosomu Y u niepłodnych mężczyzn z azoospermią była próba korelacji zakresu delecji regionu AZF z fenotypem histologicznym. Oczekiwano, że stwierdzenie takiej korelacji mogłoby mieć znaczenie prognostyczne dla ICSI. W tym zakresie wykazano, że duże delecje regionu AZF, wykraczające poza region AZFc w kierunku proksymalnym oraz dystalnym, są powiązane z całkowitym brakiem plemników w jądrach [5, 35, 46]. To samo wykazano dla delecji w podregionie AZFb [1]. Z kolei, u pacjentów z mniejszymi delecjami (ograniczonymi do części podregionu AZFc) obecna była niewielka liczba plemników, która wystarczała do przeprowadzenia ICSI [35].

ZNACZENIE DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ CHROMOSOMU Y U NIEPŁODNYCH MĘŻCZYZN

Opracowanie metod wspomaganego rozrodu, w tym metody ICSI, umożliwiło posiadanie potomstwa mężczyznom uznanym dotąd za niepłodnych. Jednak omińnięcie barier biologicznych związanych z procesem zapłodnienia przy zastosowaniu tych metod stwarza ryzyko przeniesienia aberracji chromosomowych oraz defektów pojedynczych genów na potomstwo [11]. W przypadku delecji regionu AZF chromosomu Y przeniesienie jej z ojca na syna drogą ICSI jest nieuniknione. Opisano już przeniesienie drogą ICSI delecji AZF od 4 niespokrewnionych pacjentów na ich synów. U 3 pacjentów, którzy przenieśli delecje na swoich synów, brakowało podregionu AZFc i charakteryzowali się oni, typową dla tego typu delecji, azoospermią lub ciężką postacią oligospermii. Ponadto, wykazano u nich, że delecje powstały *de novo*, ponieważ ich ojcowie mieli prawidłowe chromosomy Y [12, 25].

W związku z powyższym, coraz bardziej powszechne stosowanie metody ICSI wzbudza obawy o wzrost częstości delecji w regionie AZF w przyszłej populacji, a co za tym idzie osłabienie jej płodności [14, 18, 38]. W tej sytuacji u niepłodnych mężczyzn korzystających z metod wspomaganego rozrodu konieczna jest zarówno diagnostyka cytogenetyczna, jak i analiza molekularna chromosomu Y. Ponadto, wyniki powyższych analiz powinny być przekazane pacjentom wraz z odpowiednią poradą genetyczną.

W świetle danych przedstawionych w niniejszym przeglądzie analiza molekularna AZF ma podwójne znaczenie. Po pierwsze, informuje o obecności defektu genetycznego u pacjenta oraz o tym, iż defekt ten będzie przekazany potomkowi płci męskiej powodując niepłodność w następnym pokoleniu. Po drugie, biorąc pod

uwagę korelacje pomiędzy zakresem delecji AZF a fenotypem histologicznym pacjenta, analiza molekularna AZF ma znaczenie w podejmowaniu decyzji o celowości przeprowadzenia ICSI w przypadku pacjentów z azoospermią [1, 35]. Zgodnie z licznymi opiniami diagnostyka molekularna AZF powinna być też dostępna dla chłopców poczętych metodą ICSI [35]. Można oczekiwać, że postęp w badaniach molekularnych genów regionu AZF oraz w przyszłości innych genów zaangażowanych w proces spermatogenezy występujących poza chromosomem Y może przyczynić się do opracowania bardziej precyzyjnych metod molekularnej diagnostyki niepłodności męskiej oraz do opracowania skutecznych metod leczenia tego defektu.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BRANDELL RA, MIELNIK A, LIOTTA D, ZHEN YE, VEECK LL, PALERMO GD, SCHLEGEL PN. AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum Reprod* 1998; **13**: 2812–2815.
- [2] CALOGERO AE, GAROFALO MR, DAGATA R. Current status of the molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in the work up of male infertility. *Hum Reprod* 1999; **14**: 275.
- [3] CHANDLEY AC, COOKE HJ. Human male fertility – Y linked genes and spermatogenesis *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 1449–1452.
- [4] CHANG PL, SAUER MV, BROWN S. Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. *Hum Reprod* 1999; **11**: 2689–2694.
- [5] ELLIOT DJ, MILLAR MR, OGHENE K et al. Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 3848–3853.
- [6] FERLIN A, MORO E, GAROLLA A, FORESTA C. Human male infertility chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Reprod* 1999; **14**: 1710–1716.
- [7] FOOTE S, VOLLRATH D, HILTON A, PAGE DC. The human Y chromosome: overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science* 1992; **258**: 60–66.
- [8] FORESTA C, FERLIN A, GAROLLA A, ROSSATO M, BARBAUX S, DE BORTOLI A. Y-chromosome deletions in idiopathic severe testiculopathies. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 1075–1080.
- [9] FORESTA C, FERLIN A, GAROLLA A, MORO E, PISTORELLO M, BARBAUX S, ROSSATO M. High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod* 1998; **13**: 302–307.
- [10] HABERMANN B, MIH-F, EDELMANN A, BOHRING C, BACKERT I-T, KIESEWETTER F, AUMULLER G, VOGT P. DAZ (Deleted in Azoospermia) genes encode proteins located in human late spermatids and in sperm tails. *Hum Reprod* 1998; **13**: 363–369.
- [11] JOHNSON MD. Genetic risk of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril* 1998; **70**: 397–411.
- [12] KAMISCHKE A, GROMOLL J, SIMONI M, BEHRE HM, NIESCHLAG E. Transmission of a Y chromosomal deletion involving the deleted in azoospermia (DAZ) and chromodomain (CDY1) genes from father to son through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Rep* 1999; **14**: 2320–2322.

- [13] KLEIMAN SE, YOGEV L, GAMZU R, HAUSER R, BOTCHAN A, LESSING JB, PAZ G, YAVETZ H. Genetic evaluation of infertile men. *Hum Reprod* 1999; **14**: 33–38.
- [14] KOBAYASHI K, MIZUNO K, HIDA A, KOMAKI R, TOMITA K, MATSUSHITA I, NAMIKI M, IWAMOTO T, TAMURA S, MINOWADA S, NAKAHORI Y, NAMAGOME Y. PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients: evidence for a second locus required for spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 1965–1967.
- [15] KOSTINER DR, TUREK PJ, REIJO RA. Male infertility: analysis of the markers and genes on the human Y chromosome. *Hum Rep* 1998; **13**: 3032–3038.
- [16] KOTECKI M, JARUZELSKA J, SKOWROŃSKA M, FICHNA P. Deletion mapping of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Genet* 1991; **87**:234–236.
- [17] KRAUSZ C, BUSSANI-MASTELLONE C, GRANCHI S, McELREAVEY K, SCARSELLI G, FORTI G. Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; **14**: 1717–1721.
- [18] KREMER JAM, TUERLINGS JHAM, BORM G, HOEFSLOOT LH, MEULEMAN EJH, BRAAT DDM, BRUNNER HG, MERKUS HMWM. Does intracytoplasmic sperm injection lead to a rise in the frequency of microdeletions in the AZFc region of the Y chromosome in future generations? *Hum Reprod* 1998; **13**: 2808–2811.
- [19] LAHN BT, PAGE DC. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 1997; **278**: 675–680.
- [20] LIEN S, KAMINSKI S, ALESTROM P, ROGNE S. A simple and powerful method for linkage analysis by amplification of DNA from single sperm cells. *Genomics* 1993; **16**: 41–44.
- [21] MA K, SHARKEY A, KIRSCH S, VOGT P, KEIL R, HARGREAVE TB, McBEATH S, CHANDLEY AC. Towards the molecular localization of the AZF locus: Mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1992; **1**: 29–33.
- [22] MA K, INGLIS JD, SHARKEY A, BICKMORE WA, HILL RE, SPEED RM, THOMSON EJ, JOBLING MM, TAYLOR K, WOLFE J, COOKE HJ, HARGREAVE TB, CHANDLEY AC. A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 1993; **75**: 1287–1295.
- [23] McELREAVEY K, KRAUSZ C. Sex chromosome genetics '99 Male infertility and the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 1999; **64**: 928–933.
- [24] NAJMABADI H, HUANG V, YEN P, SUBBARAO MN, BHASIN D, BANAAG L, NASEERUDDIN S, DE KRETZER DM, BAKER HWG, McLACHLAN RI, LOVELAND KA, BHASIN S. Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia or oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 1347–1352.
- [25] PAGE DC, SILBER S, BROWN LG. Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. *Hum Rep* 1999; **14**: 1722–1726.
- [26] PALERMO G, JORIS H, DEVROEY P, VAN STEIRTEGHEM A. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into oocyte. *Lancet* 1992; **340**: 17–18.
- [27] PRYOR JL, KENT-FIRST M, MUALLEM A et al. Microdeletions in the Y-chromosome of infertile men. *N Eng J Med* 1997; **336**: 534–539.
- [28] PRYOR JL, ROBERTS K. Principles of sequence-tagged site selection in screening for Y deletion. *Hum Reprod* 1998; **13**: 1768.
- [29] QURESHI SJ, ROSS AR, MA K, COOKE HJ, INTYRE MA, CHANDLEY AC, HARGREAVE TB. Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically determined spermatogenic failure in men. *Mol Hum Reprod* 1996; **2**: 775–779.
- [30] REIJO R, LEE TIEN-YI, ALAGAPPAN R, BROWN LG, ROSENBERG M, ROZEN S, JAFFE T, STRAUS D, HOVATTA O, DE LA CHAPELLE A, SILBER S, PAGE DC. Diverse

- spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Gen* 1995; **10**: 383–393.
- [31] REIJO R, ALGAPPAN RK, PATRIZIO P, PAGE DC. Severe oligospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 1996; **347**: 1290–1293.
- [32] SAXENA R, BROWN LG, HAWKINS T, ALAGAPPAN RK, SKALETSKY H, REEVE MP, REIJO R, ROZEN S, DINULOS MB, DISTECHE CM, PAGE DC. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nature Genet* 1996; **14**: 292–299.
- [33] SCHIEBEL K, WINKELMAN M, MERTZ A, XU X, PAGE DC, WEIL D, PETIT C, RAPPOLD GA. Abnormal XY interchange between a novel isolated protein kinase gene, PRKY, and its homologue, PRKX, accounts for one third of all (Y+)XX males and Y-(XY) females. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 1985–1989.
- [34] SILBER SJ. The relationship of abnormal semen parameters to male fertility. *Hum Reprod* 1989; **4**: 947–953.
- [35] SILBER SJ, AKAGAPPAN R, BROWN LG, PAGE DC. Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum Rep* 1998; **13**: 3332–3337.
- [36] SIMONI M, KAMISCHKE A, NIESCHLAG E. Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the work-up of male infertility. *Hum Rep* 1998; **13**: 1764–1768.
- [37] SKAKKEBAEK NE, GIWERCMAN A, de KRETZER D. Pathogenesis and management of male infertility. *Lancet* 1994; **343**: 1473–1479.
- [38] STUPPIA L, CALABRESE G, FRANCHI PG, MINGARELLI R, GATTA V, PALKA G, DALLAPICCOLA B. Widening of a Y-chromosome interval-6 deletion transmitted from a father to his infertile son accounts for an oligospermia critical region distal to the RBM1 and DAZ genes *Am J Hum Genet* 1996; **59**: 1393–1395.
- [39] STUPPIA L, MASTROPRIMIANO G, CALABRESE G, PEILA R., TENAGLIA R, PALKA G. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo- or azoospermia. *Cytogenet Cell Genet* 1996; **72**: 155–158.
- [40] SUN C, SKALETSKY H, BIRREN B, DEVON K, TANG Z, SILBER S, OATES R, PAGE DC. An azoospermic man with a *de novo* point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nat Genet* 1999; **23**(4): 429–432.
- [41] SURMACZ T, JĘDRZEJCZAK P, KORCZ A, KĘDZIA H, JARUZELSKA J. Zaburzenia struktury chromosomu Y w niepłodności męskiej. *Ginekol Prakt* 1997; **5**: 51–53.
- [42] TIEPOLO L, ZUFFARDI O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; **34**: 119–124.
- [43] VAN DER VEN K, MONTAG M, PESCHKA B, LEYGRAAF J, SCHWANITZ G, HAIDL G, KREBS D, VAN DER VEN H. Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol Hum Reprod* 1997; **3**: 699–704.
- [44] VERGNAUD G, PAGE DC, SIMMLER MC, BROWN L, ROUYER F, NOEL B, BOISIEUX D, CHAPELLE A de la, WEISSENBAACH J. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet* 1986; **38**: 109–124.
- [45] VOGT P, CHANDLEY AC, HARGREAVE TB, KEIL R, MA K, SHARKEY A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum. Genet.* 1992; **89**: 491–496.
- [46] VOGT PH, EDELMANN A, KIRSCH S, HENEGARIU O, HIRSCHMANN P, KIESEWETTER F, KOHN FM, SCHILL WB, FARAH S, RAMOS C, HARTMANN M, HARTSCHUH W, MESCHÉDE D, BEHRE HM, CASTEL A, NIESCHLAG E, WEIDNER W, GRONE H-J, JUNG A, ENGEL W, HAIDL G. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 933–943.

- [47] VOGT PH. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod* 1998; **4**: 739–744.
- [48] VOLLRATH D, FOOTE S, HILTON A, BROWN LF, BEER-ROMERO P., BOGAN JS, PAGE DC. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992; **258**: 52–59.

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

ROLA TELOMERAZY W ROZWOJU PROCESU NOWOTWOROWEGO*

THE ROLE OF TELOMERASE IN THE DEVELOPMENT OF CANCER

Jerzy NOWAK¹, Krzysztof LEWANDOWSKI², Danuta JANUSZKIEWICZ^{1,3}

¹Zakład Genetyki Człowieka PAN, ²Samodzielny Wojewódzki Szpital Zespolony,
³Klinika Hematologii i Onkologii Dziecięcej Instytutu Pediatrii AM, Poznań

Streszczenie: Telomeraza stanowi kompleks rybonukleoproteinowy złożony z odwrotnej transkryptazy, białka i RNA stanowiącego matrycę do syntezy telomerowego DNA. Aktywność telomerazy stwierdzono w większości nowotworów, wobec jej braku w komórkach prawidłowych. Wyniki wielu badań wskazują, że aktywność telomerazy pozwala na odróżnienie komórek nowotworowych od prawidłowych w prostaty, gruczole piersiowym, tarczowym i w wątrobie. Krytyczny przegląd aktualnych prac wskazuje, że badanie ekspresji telomerazy stanowi bardziej precyzyjny marker rozróżniający zmiany łagodne od nowotworowych. Wstępne badania własne sugerują, że oznaczanie aktywności i ekspresji telomerazy może stanowić pomocny marker diagnostyczny i prognostyczny w rozwoju procesu nowotworowego.

Słowa kluczowe: aktywność i ekspresja telomerazy, nowotwory, starzenie

Summary: Telomerase is a rybonucleoprotein complex, consist of reverse transcriptase, protein component and RNA template for the syntesis of telomeric DNA. Telomerase activity has been found in the majority of cancer, but absent in the most normal cells. Many studies have demonstrate that the presence of telomerase activity can be used to distinguish malignant from normal cells in various organs including prostate, breast, thyroid and liver. Critical review of current literature indicates that telomerase expression may be more accurate then telomerase activity in distinguishing benign from malignant tissue. Our own pilot study suggests that determination of telomerase activity and its expression might be a useful diagnostic and as well prognostic marker for cancer development.

Key words: telomerase activity and expression, cancer, aging

1. BUDOWA TELOMERAZY

Duże zainteresowanie telomerazą wiąże się z wynikami badań sugerującymi jej udział w procesie starzenia i w rozwoju nowotworów [14,20,22]. W komórkach nowotworowych w większości przypadków stwierdza się aktywność telomerazy

*Praca wykonana w ramach projektu badawczego 4PO5B 07217

zapobiegającą skracaniu się telomerów. Przypuszcza się, że telomeraza może wpływać na proces nowotworzenia. Aktywność telomerazy miałyby się pojawiać w czasie, kiedy dzielące się komórki całkowicie tracą kontrolę nad proliferacją [4].

Telomeraza stanowi kompleks rybonukleoproteinowy złożony z podjednostki katalitycznej – odwrotnej transkryptazy (h-TERT) (według nowej terminologii), z RNA i białka związanego z telomerazą (TP1) [11]. RNA kompleksu telomerazy jest matrycą, na której syntetyzowany jest telomerowy DNA przy pomocy odwrotnej transkryptazy. Telomeraza dobudowuje nukleotydy, które są komplementarne do występujących w jej matrycy. Działanie telomerazy zapewnia stałą długość telomerów w dzielących się komórkach. Wskutek braku aktywności telomerazy w większości prawidłowych komórek w czasie kolejnych podziałów dochodzi do skracania końców chromosomów.

Telomery u człowieka złożone są z konserwatywnych powtórzeń sekwencji TTAGGG oraz z białek. Liczba powtórzeń wynosi 2000 i zmniejsza się wraz z wiekiem [11,15]. Uważa się, że telomery chronią chromosomy przed działaniem egzonukleaz i zapobiegają przypadkowym rekombinacjom i uszkodzeniom DNA. W czasie podziałów prawidłowych komórek telomery ulegają skracaniu wskutek braku aktywności telomerazy, która jest odpowiedzialna za odbudowę końców chromosomów. Aktywność telomerazy wiąże się z proliferacją i różnicowaniem komórek. Wysoką aktywność telomerazy stwierdza się głównie w komórkach rozrodczych, a jej brak w komórkach zróżnicowanych.

Często aktywność telomerazy utożsamia się z aktywnością jej odwrotnej transkryptazy. Wydaje się, że również pozostałe składniki telomerazy mogą mieć wpływ na jej aktywność. Wykazano, że białkowy składnik telomerazy – TP1 (*human telomerase-associated protein*) powiązany jest z aktywnością samej telomerazy. Stwierdzono, że produkcja białka TP1 zwiększa się w stymulowanych limfocytach T. Wielkość ekspresji TP1 jest skorelowana z aktywnością telomerazy w nowotworach i ustalonych liniach komórkowych. Jednakże czynniki indukujące różnicowanie komórek (kwas retinowy, estry forbolu) powodują zmniejszenie ekspresji hTERT pozostają bez wpływu na ekspresję TP1. Wydaje się, że białko TP1 w bezpośredni sposób nie ogranicza aktywności telomerazy. Można więc postulować, że aktywność telomerazy zależy przede wszystkim od odwrotnej transkryptazy, jakież od specyficznego RNA i białka TP1. Jednak mechanizmy wzajemnego oddziaływania nie zostały dokładnie poznane. Co więcej zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* nie można wykluczyć działania inhibitorów aktywności telomerazy.

2. TELOMERAZA A STARZENIE KOMÓRKI

Uważa się, że telomeraza stanowi molekularny zegar starzenia. W kolejnych podziałach komórkowych dochodzi do skracania telomerów, co związane jest ze zmniejszeniem aktywności telomerazy. Znany limit Hayflicka zakłada ograniczoną

liczbę podziałów komórkowych charakterystyczną dla każdego organizmu. I tak komórki myszy mogą się dzielić w warunkach *in vitro* kilkanaście razy, fibroblasty noworodka 70–80 razy, natomiast osoby 70-letniej kilkanaście razy [2,11,15]. Szacuje się, że w ciągu roku komórki człowieka tracą 15 powtórzeń sekwencji telomerowych. Praktycznie bez telomerazy dochodzi do utraty zdolności do podziałów komórkowych. Z jednej strony wiąże to się z procesem starzenia, z drugiej chroni przed rozwojem procesu nowotworowego.

3. AKTYWNOŚĆ TELOMERAZY W NOWOTWORACH

Można sugerować, że w komórce, która utraciła kontrolę nad proliferacją, może dochodzić do indukcji aktywności telomerazy. Wydaje się, że starzejące komórki mogą wskutek transformacji nowotworowej uaktywniać telomerazę.

Aktywność telomerazy stwierdza się w większości nowotworów (80%). Pierwsze prace wskazywały na istotny udział telomerazy w rozwoju procesu nowotworowego [1]. Wydawało się, że włączenie ekspresji telomerazy wiąże się bezpośrednio z rozwojem nowotworu. Niektórzy autorzy wskazywali na istotną rolę telomerazy w patogenezie procesu nowotworzenia [5,7,8]. Badania wykonane w wielu nowotworach złośliwych oraz w stanach przednowotworowych nakazują zachować daleko idącą ostrożność w przyczynowo-skutkowym powiązaniu aktywności telomerazy z procesem nowotworowym. Na przykład w raku piersi w ponad 95% przypadków można wykazać aktywność telomerazy wobec całkowitego jej braku w prawidłowej tkance gruczołu piersiowego, natomiast niezłośliwe gruczolakowłókniaki w 60% wykazują również aktywność telomerazy [15].

W raku tarczycy stwierdzono aktywność telomerazy wobec jej braku w prawidłowej tkance. Z kolei w 1/4 przypadków stanów przerostowych tarczycy związanych z procesem zapalnym, a nie nowotworowym również zaobserwowano aktywność telomerazy [16].

Aktywność telomerazy wykazano w 92% przypadków raka prostaty, podczas gdy w łagodnym przerście stercza w 50%, natomiast w prawidłowej tkance obecna była w 36% [10,17]. Na podstawie tych danych autorzy sugerują, że aktywność telomerazy może być wczesnym molekularnym markerem zmian nowotworowych prostaty w okresie, kiedy histologicznie rak jest jeszcze niewykrywalny. W innych badaniach wykazano aktywność telomerazy w przeszło 90% przypadków raka prostaty, w blisko 40% łagodnego przerostu stercza i całkowity brak aktywności w prawidłowej tkance prostaty [23]. Autorzy tych badań uważają, że aktywność telomerazy może być pierwszym markerem wskazującym na rozwój raka prostaty. W podobnych badaniach przeprowadzonych na materiale uzyskanym z biopsji cieńkoigłowej otrzymano wyniki zbliżone do wyżej opisanych [18]. Autorzy stwierdzają wręcz, że aktywność telomerazy stanowi przydatny diagnostycznie marker raka prostaty. Istnieją jednak wątpliwości, czy sama aktywność telomerazy może róż-

nicować raka prostaty od niezłośliwego przerostu i od tkanki prawidłowej [3]. Również w badaniach pierwotnego raka wątroby autorzy uznali aktywność telomerazy za precyzyjny wykładnik wczesnego rozpoznania choroby w przypadkach, w których jednoznacznie nie można postawić diagnozy na podstawie konwencjonalnych badań histopatologicznych [13].

Powyższe badania wskazywały na ścisły związek aktywności telomerazy z rozwojem procesu nowotworowego. Z kolei w badaniach komórek nabłonkowych pęcherza moczowego stwierdzono aktywność telomerazy w zmienionych nowotworowo komórkach wobec całkowitego jej braku w komórkach prawidłowych. Jednakże prawidłowe komórki nabłonkowe zaczynały wykazywać aktywność telomerazy w hodowlach *in vitro*. Można na podstawie tych badań wysnuć wniosek, że aktywność telomerazy jest raczej markerem proliferacji niż transformacji nowotworowej [3].

W badaniach własnych wykrywano aktywność telomerazy przy pomocy zestawu TRAP (*Telomerase detection kit; Intergen*). W pierwszym etapie reakcji telomeraza (ekstrakt białkowy komórek) przyłącza powtórzenia GGTTAG do końca 3' substratu oligonukleotydowego. Tak utworzony produkt jest następnie amplifikowany w reakcji PCR z zastosowaniem specyficznych starterów. Powstałe produkty PCR w obrazie elektroforetycznym przedstawiają się jako drabinka o wielkościach od 50+6n bp. Duży wpływ na uzyskiwane wyniki mogą mieć warunki techniczne stosowane przy badaniu aktywności telomerazy. W pierwszym rzędzie należy ustalić temperaturę przyłączania starterów, długość trwania poszczególnych etapów, a w szczególności etapu wydłużania, który może zostać nawet wyeliminowany. W celu wykluczenia możliwości występowania inhibitorów polimerazy Taq wskazane jest stosowanie różnych rozcieńczeń ekstraktów komórkowych. W krańcowych przypadkach braku aktywności telomerazy nawet w dodatnich kontrolach zestawu TRAP należy wziąć pod uwagę zanieczyszczenie RNA-zami. Z uwagi na wysoką wrażliwość telomerazy na podwyższoną temperaturę ekstrakcja białek oraz przygotowanie reakcji TRAP powinno być wykonywane w temperaturze poniżej 25°C i z dodatkiem inhibitora RNA-az. W niektórych przypadkach mogą występować prążki będące wynikiem tworzenia dimerów starterów. Zastosowanie albuminy w przypadku niskiego stężenia białek i zwiększenie rozcieńczenia ekstraktu przy wysokim stężeniu oraz wprowadzenie *hot-start* pozwala uniknąć niespecyficznych produktów PCR. Przy badaniach aktywności telomerazy należy zwrócić uwagę na wyżej wymienione uwarunkowania techniczne, które mogą mieć duży wpływ na uzyskiwane wyniki i ich interpretację.

W naszych badaniach wykazaliśmy wysoką aktywność telomerazy w raku żołądka i jelita grubego. Ponadto aktywność telomerazy wykazaliśmy również w komórkach zmienionej zapalnie śluzówki żołądka. Porównanie wyników innych autorów z własnymi nie pozwala na wysunięcie jednoznacznych wniosków, dotyczących ścisłego związku aktywności telomerazy z procesem nowotworowym. Tak więc na podstawie

samego badania aktywności telomerazy nie można jednoznacznie stwierdzić, czy mamy do czynienia z tkanką nowotworową, czy prawidłową.

4. EKSPRESJA TELOMERAZY W NOWOTWORACH

Innym badaniem telomerazy jest oznaczanie jej ekspresji, czyli występowania informacyjnego RNA kodującego telomerazę (ściślej odwrotną transkryptazę) [11,12]. Wydaje się, że ekspresja telomerazy niekoniecznie musi iść w parze z wysoką aktywnością. Problem korelacji ekspresji i aktywności telomerazy z rozwojem procesu nowotworowego ma istotne znaczenie dla poznania procesu carcinogenezy. Większość prac dotyczy najczęściej badania związku między samą aktywnością (a nie ekspresją) telomerazy a nowotworzeniem.

Ciekawą koncepcję przedtawili Kuniyasu i in. [12] wskazując na znaczenie w rozwoju raka żołądka zakażeń *Helicobacter pylori*, które prawdopodobnie mogą indukować znaczny wzrost ekspresji telomerazy w nabłonku zmienionym metaplastycznie, co prowadzi do aktywacji telomerazy.

Oznaczanie ekspresji telomerazy wydaje się być obiecującym markerem procesu nowotworowego. Z praktycznego punktu widzenia szczególnie przydatna dla wczesnego postawienia rozpoznania wydaje się być ocena ekspresji telomerazy w moczu pacjentów podejrzanych o raka pęcherza moczowego [9]. Podobnie w trudnym diagnostycznie odróżnieniu zmian łagodnych od nowotworowych tarczycy oznaczenie ekspresji telomerazy wydaje się być o wiele bardziej przydatne niż ocena aktywności [16].

Z kolei w guzie Wilmsa nie stwierdzono korelacji między aktywnością i ekspresją telomerazy a indeksem proliferacyjnym [6]. Wykazano natomiast korelację między ekspresją telomerazy a typem histologicznym nephroblastoma. Trudno jednoznacznie określić, czy jest to jedynie współwystępowanie dwóch cech, czy istnieje pomiędzy nimi związek przyczynowo-skutkowy.

Jak dotąd badania aktywności i ekspresji nie prowadzą do jednoznacznych wniosków. Ostatnie dane badań nad guzami tkanek miękkich wskazują na ścisłą korelację między ekspresją a aktywnością telomerazy [21]. W tych samych badaniach autorzy nie stwierdzili jednak zależności między aktywnością telomerazy a wielkością proliferacji. Dodatkowo krytycznie odnieśli się do uznania aktywności i ekspresji telomerazy jako markerów diagnostycznych lub prognostycznych w procesie nowotworzenia.

W pilotażowych badaniach własnych stwierdzono ekspresję telomerazy w komórkach raka żołądka, jelita grubego i w komórkach linii K562. Ekspresję telomerazy wykazaliśmy również w limfocytach krwi obwodowej stymulowanych fitohemaglutyniną. Niską ekspresję telomerazy stwierdzono w limfocytach krwi obwodowej zdrowego dawcy. Zbyt mała liczba przeprowadzonych badań nie pozwala na wysunięcie jednoznacznych wniosków, jednakże badanie ekspresji w

połączeniu z oceną aktywności telomerazy może okazać się dodatkowym markerem procesu nowotworowego.

Podsumowując krytycznie przedstawione dane wydaje się, że badanie ekspresji i aktywności telomerazy może być przydatne do identyfikacji stanów przedrakowych, z których rozwinię się nowotwór, co więcej może również służyć do przewidywania przebiegu choroby u pacjentów z już zdiagnozowanym nowotworem. Należy jednak podkreślić, że oznaczanie aktywności bądź ekspresji telomerazy powinno być uzupełnione innymi badaniami klinicznymi, biochemicznymi i histopatologicznymi.

Wydaje się, że aktywacja telomerazy może stanowić bierny marker w czasie rozwoju procesu nowotworowego. Można też rozważać aktywację telomerazy jako krytyczny krok w wielostopniowym procesie nowotworzenia. Ostatecznie telomeraza może być markerem ulegającym selekcji w czasie rozwoju procesu nowotworzenia. Wyjaśnienia wymaga również znaczenie aktywności telomerazy w rokowaniu chorych z nowotworami.

Związek telomerazy z nowotworami może być albo przyczynowo-skutkowy, albo jedynie towarzyszący. W wielu nowotworach występują znacznie krótsze telomery niż w komórkach prawidłowych. W badaniach na zwierzętach stwierdzono również odmienną aktywność telomerazy w nowotworach u genetycznie identycznych osobników. Doświadczenia na myszach typu *knock-out* dowiodły, że u myszy tych pomimo braku telomerazy mogą rozwijać się nowotwory podobnie jak u myszy kontrolnych [2]. W innych doświadczeniach wykazano brak aktywności telomerazy w dzielących się komórkach zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych. Aktywność prawidłowe komórki nabywały dopiero po immortalizacji [15,19].

5. MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA TELOMERAZY W TERAPII NOWOTWORÓW

Perspektywy wykorzystania telomerazy w medycynie dotyczą przede wszystkim chorób nowotworowych, w których telomeraza wydaje się być idealnym celem dla skutecznej terapii.

Obecność aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych i jej brak w komórkach prawidłowych nasunął sugestię, że wyłączenie telomerazy mogłoby prowadzić do zahamowania procesu nowotworowego. Innymi słowy, w komórce pozbawionej aktywności telomerazy dochodziłoby do skracania telomerów związanych ze starzeniem i ostatecznie komórka nowotworowa traciłaby swoją nieśmiertelność. Pomimo podejmowanych prób trudno twierdzić, czy istnieje związek przyczynowy pomiędzy rozwojem nowotworu a aktywnością telomerazy. Niewątpliwie aktywność telomerazy można uznać za jedną z charakterystycznych cech komórki nowotworowej. Ale nie znaczy to, że pozbawiona tej cechy komórka rakowa zacznie zachowywać się jak komórka prawidłowa. Jedną z możliwych strategii w

eksperymentalnej terapii nowotworów jest wykorzystanie telomerazy jako znacznika komórek nowotworowych, które mogłyby być niszczone przez czynniki swoiście rozpoznające komórkę rakową właśnie przez aktywność telomerazy. Najbardziej logiczna wydaje się koncepcja neutralizacji lub wyłączenia aktywności telomerazy w komórkach rakowych. Doświadczalnie wykazano, że wyłączenie aktywności telomerazy wiąże się z zahamowaniem wzrostu nowotworu. Powodzenie tej koncepcji będzie zależało w dużej mierze od całkowitego wyłączenia telomerazy we wszystkich komórkach, a co za tym idzie spowodowania „starzenia się” komórek nowotworowych. Wydaje się też, że wyłączenie telomerazy może uaktywnić np. programową śmierć komórki lub inne mechanizmy prowadzące ostatecznie do uzyskania efektu terapeutycznego. Efektywne podejście terapeutyczne powinno niszczyć komórki rakowe pozostając bez wpływu na komórki prawidłowe. Entuzjazm związany z wykorzystaniem telomerazy w leczeniu nowotworów znacznie spadł po wykazaniu występowania nowotworów u myszy pozbawionych genu telomerazy [2].

Badanie aktywności i/lub ekspresji telomerazy może okazać się przydatne w diagnostyce procesu nowotworowego. Wydaje się, że telomeraza niewątpliwie stanowi marker nowotworzenia, bez względu na ostateczne potwierdzenie lub wykluczenie związku przyczynowego. Dalsze badania powinny odpowiedzieć na pytanie, czy telomeraza może stanowić marker prognostyczny konkurencyjny do obecnie stosowanych, co powinno przyczynić się do praktycznego wykorzystania telomerazy w diagnostyce nowotworów, a w przyszłości być może również w terapii.

LITERATURA

- [1] AHN MJ, NOH YH, LEE YS, LEE JH, CHUNG TJ, KIM IS, CHOI IY, KIM SH, LEE JS, LEE KH. Telomerase activity and its clinicopathological significance in gastric cancer. *Eur J Cancer* 1997; **33**: 1309–1313.
- [2] BLASCO MA. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; **91**: 25–34.
- [3] BELAIR CD, YEAGER TR, LOPEZ PM, REZNIKOFF CA. Telomerase activity: a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 13677–13682.
- [4] BROWN T, ALDOUS W, LANCE R, BLASER J, BAKER T, WILLIARD W. The association between telomerase, p53, and clinical staging in colorectal cancer. *Am J Surg* 1998; **175**: 364–366.
- [5] CHENG AJ, TANG R, WANG JY, SEE LC, WANG TC. Possible role of telomerase activation in the cancer predisposition of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**: 316–321.
- [6] DOME JS, CHUNG S, BERGEMANN T, UMBRICH CB, SAJI M, CAREY LA, GRUNDY PE, PERLMAN EJ, BRESLOW NE, SUKUMAR S. High telomerase reverse transcriptase (hTERT) messenger RNA level correlates with tumor recurrence in patients with favorable histology Wilms' Tumor. *Cancer Res* 1999; **59**: 4301–4307.
- [7] GRYFE R, SWALLOW C, BAPAT B, REDSTON M, GALLINGER S, COUTURE J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1997; **21**: 233–300.

- [8] HIYAMA E, YOKOYAMA T, TATSUMOTO N, HIYAMA K, IMAMURA Y, MURAKAMI Y, KODAMA T, PIATYSZEK MA, SHAY JW, MATSUURA Y. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 1995; **55**: 3258–3262.
- [9] ITO H, KYO S, KANAYA T, TAKAKURA M, KOSHIDA K, NAMIKI M, INOUE M. Detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA in voided urine samples as a useful diagnostic tool for bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 2807–2810.
- [10] KAGEYAMA Y, KAMATA S, YONESE J, OSHIMA H. Telomere length and telomerase activity in bladder and prostate cancer cell lines. *Int J Urol* 1997; **4**: 407–410.
- [11] KILIAN A, BOWTELL DD, ABUD HE, HIME GR, VENTER DJ, KEESE PK, DUNCAN EL, REDDEL RR, JEFFERSON RA. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 2011–2019.
- [12] KUNIYASU H, DOMEN T, HAMAMOTO T, YOKOZAKI H, YASUI W, TAHARA H, TAHARA E. Expression of human telomerase RNA is an early event of stomach carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 1997; **88**: 103–107.
- [13] NKASHIO R, KITAMOTO M, TAHARA H, NAKANISHI T, IDE T, KAJIYAMA G. Significance of telomerase activity in the diagnosis of small differentiated hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1997; **74**: 141–147.
- [14] OKUSA Y, SHINOMIYA N, ICHIKURA T, MOCHIZUKI H. Correlation between telomerase activity and DNA ploidy in gastric cancer. *Oncology* 1998; **55**: 258–264.
- [15] PARK KH, RHA SY, KIM CH, KIM TS, YOO NC, KIM JH, ROH JK, NOH SH, MIN JS, LEE KS, KIM BS, CHUNG HC. Telomerase activity and telomere lengths in various cell lines: changes of telomerase activity can be another method for chemosensitivity evaluation. *Int J Oncol* 1998; **13**: 489–495.
- [16] SAJI M, XYDAS S, WESTRA WH, LIANG CK, CLARK DP, UDELSMAN R, UMBRICH CB, SUKUMAR S, ZEIGER MA. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in thyroid neoplasms. *Clin Canc Res* 1999; **5**: 1483–1489.
- [17] SCATES DK, MUIR GH, VENITT S, CARMICHAEL PL. Detection of telomerase activity in human prostate: a diagnostic marker for prostatic cancer? *Br J Urol* 1997; **80**: 263–268.
- [18] TAKAHASHI C, MIYAGAWA I, KUMANO S, OSHIMURA M. Detection of telomerase activity in prostate cancer by needle biopsy. *Eur Urol* 1997; **32**: 494–498.
- [19] TANG R, CHENG AJ, WANG JY, WANG TC. Close correlation between telomerase expression and adenomatous polyp progression in multistep colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; **58**: 4052–4054.
- [20] WADA Y, YAGIHASHI A, KAMESHIMA H, MATSUURA A, SATO N, KIKUCHI K, YAJIMA T, SASAKI K, UEHARA N, WATANABE N, HIRATA K. Nonradioisotopic telomeric repeat amplification protocol (TRAP) using digoxigenin labeled probe. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1997; **19**: 451–457.
- [21] YAN P, COINDRE JM, BENHATTAR J, BOSMAN FT, GUILLOU L. Telomerase activity and human telomerase transcriptase mRNA expression in soft tissue tumors: Correlation with grade, histology, and proliferative activity. *Cancer Res* 1999; **59**: 3166–3170.
- [22] YOSHIMI N, INO N, SUZUI M, HARA A, NAKATANI K, SATO S, MORI H. Telomerase activity of normal tissues and neoplasms in rat colon carcinogenesis induced by methylazoxymethanol acetate and its difference from that of human colonic tissues. *Mol Carcinog* 1996; **16**: 1–5.
- [23] ZHANG W, KAPUSTA LR, SLINGERLAND JM, KLOTZ LH. Telomerase activity in prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia, and benign prostatic epithelium. *Cancer Res* 1998; **58**: 619–621.

ROZWÓJ MARKEROWYCH MAP GENOMÓW PSA I KONIA

DEVELOPMENT OF MARKERS' GENOME MAP OF DOG AND HORSE

Marek ŚWITOŃSKI¹ i Grzegorz CHOLEWIŃSKI²

Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, ¹ Katedra Genetyki
i Podstaw Hodowli Zwierząt, ² Zakład Hodowli Koni

Streszczenie: Hodowla psów i koni ma bardzo długą historię, sięgającą w przypadku psa 14 tys. lat, a konia 6 tys. Efektem prowadzonej przez człowieka pracy hodowlanej jest ukształtowanie się wielu ras. Aktualnie zarejestrowanych jest ponad 340 ras psów, wśród których występuje niespotykana u innych gatunków zmienność pokroju, a w tym i wielkości. Hodowla koni zaowocowała utworzeniem około 250 ras. Efektem ubocznym pracy hodowlanej stało się nagromadzenie, szczególnie u psów, licznych mutacji odpowiedzialnych za powstawanie chorób genetycznych. Budowane markerowe mapy genomu dla tych gatunków mają służyć przede wszystkim identyfikacji genów odpowiedzialnych za powstawanie chorób dziedzicznych. Nasycenie najnowszej markerowej mapy sprzężeniowej genomu psa, bazującej na analizie segregacji 341 markerów genetycznych, wynosi 9,0 cM. Ponadto, na każdym chromosomie zlokalizowano fizycznie co najmniej jeden marker genetyczny. Nasycenie aktualnej mapy genomu konia, stworzonej na podstawie badania 100 markerów, wynosi 12,6 cM. Niestety nie we wszystkich chromosomach konia udało się umiejscowić loci markerowe.

Słowa kluczowe: markerowe mapy genomu, pies, koń, markery genetyczne, genom

Summary: Dog and horse breeding have been started long time ago – it was 14,000 years ago in case of the dog and 6,000 years for the horse. In a consequence a large variety of breeds were developed. At present over 340 dog breeds and approximately 250 horse breeds are world wide recognised. A negative side effect of the selection is an accumulation in gene pools, mainly in case of the dog, of mutations responsible for development of hereditary diseases. The main aim to establish marker genome maps for these species is their use for identification of genes causing the diseases. Density of the newest dog genome map, basing on segregation analysis of 341 genetic markers, is 9.0 cM. Moreover, on each chromosome at least one marker was physically assigned. Density of the horse map, including 100 markers, is 12.6 cM, but unfortunately until now there are chromosomes on which no one marker was localised.

Key-words: marker genome maps, dog, horse, genetic markers, genome

Dekada lat 90. może być uznana za okres intensywnego poznawania genomów różnych gatunków. Do najbardziej spektakularnych osiągnięć należy zaliczyć powołanie Programu Poznania Genomu Człowieka, znanego pod nazwą HUGO (ang. *Human Genome Organization*). Został on uruchomiony w 1991 roku i przewiduje się, że oprócz zbudowania mapy genetycznej i fizycznej o dużym nasyceniu markerami genetycznymi uda się na początku XXI wieku (ok. 2002 r.) poznać całkowitą sekwencję ok. 3 mld nukleotydów w DNA składającą się na genom człowieka. Programowi temu poświęcono wiele publikacji, a wśród polskojęzycznych opracowań na wyróżnienie zasługuje praca zbiorowa pod redakcją Krzyżosiaka [11].

Poważne przedsięwzięcia mające na celu poznanie genomów zwierząt domowych zostały podjęte w pierwszej połowie lat 90. Zauważyć jednak trzeba, że stawiane cele były znacznie skromniejsze aniżeli w przypadku programu HUGO. Pierwotne założenia ograniczały się do zbudowania markerowej mapy genomu, w której gęstość markerów genetycznych, mierzona odległością genetyczną (cM – centiMorgany), będzie niska – rzędu 20 cM. Przyjęto również, że liczba markerów o znanej lokalizacji chromosomowej będzie wynosiła nie mniej niż dwa na każdym ramieniu chromosomowym – jeden w pobliżu centromeru, a jeden w części dystalnej [40]. Proces budowy markerowej mapy genomu niezależnie od gatunku, jakiego dotyczy, przebiega zasadniczo zgodnie z następującym schematem:

(a) identyfikacja jak największej liczby polimorficznych markerów genetycznych (głównie sekwencji mikrosatelitarnych),

(b) wykrywanie sprzężeń między markerami – mapa genetyczna,

(c) lokalizacja loci markerów w chromosomach metodami hybrydyzacji *in situ* lub analizy hybrydowych komórek somatycznych (identyfikacja loci syntenicznych, czyli położonych w tym samym chromosomie) – mapa fizyczna,

(d) identyfikacja homologicznych regionów w chromosomach mapowanego gatunku i chromosomach człowieka oraz ewentualnie myszy.

Pierwsze międzynarodowe programy mapowania genomów zwierząt domowych dotyczyły świni – program PiGMap zapoczątkowany w 1991 r. oraz bydła – program BovMap, uruchomiony w 1992 r. Podejmowane były także intensywne badania nad genomami kury i owcy. U schyłku lat 90. można z satysfakcją stwierdzić, że przyjmowane dziesięć lat wcześniej założenia zostały zrealizowane w szerszym zakresie, co oznacza, że aktualne nasycenie markerowych map genomowych jest znacznie większe niż planowano. W efekcie markerowe mapy genomowe stały się narzędziem powszechnie wykorzystywanym do poszukiwania genów kontrolujących cechy o istotnym znaczeniu hodowlanym [9, 41, 42]

Dostępność technik badawczych pozwalających analizować genomy różnych gatunków zwierząt sprawiła, że obiektami zainteresowania stały się gatunki, które są hodowane przez człowieka głównie dla zaspokojenia innych potrzeb aniżeli pro-

dukcja żywności czy surowców dla przemysłu odzieżowego (skóra, wełna) itp. W 1993 roku podczas spotkania w Oslo powołano międzynarodowy program mapowania genomu psa – DogMap, a w 1995 r. zapoczątkowano podczas konferencji w Lexington (USA) analogiczne przedsięwzięcie poświęcone genomowi konia. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w przypadku obu programów w grupie założycieli znajdowali się przedstawiciele polskich instytucji naukowych: Katedry Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt AR w Poznaniu (program DogMap) oraz Zakładu Hodowli Koni AR w Poznaniu i Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu (program mapowania genomu konia). W przypadku genomu psa badania krajowe koncentrują się na budowie mapy fizycznej (cytogenetycznej), natomiast w odniesieniu do genomu konia obie wymienione powyżej instytucje naukowe zaangażowane są w badania, których celem jest stworzenie mapy genetycznej (sprzężeniowej).

Mapy sprzężeniowe powstają dzięki analizie segregacji alleli markerowych w rodzinach. Celem tych badań jest ustalenie, które markery są ze sobą sprzężone. Wśród markerów sprzężonych określane jest ich uszeregowanie oraz szacowane są odległości względne (cM) między nimi. Długość genetyczna pojedynczego chromosomu, a w konsekwencji całego genomu, zależy od tego, czy w obliczeniach uwzględnia się informacje bazujące na rekombinacjach (crossing over) zachodzących w gametogenezie żeńskiej czy męskiej. Ogólnie stwierdzaną zależnością, z niewielkimi odstępstwami, jest większa długość genetyczna chromosomów, a w konsekwencji także całego genomu, szacowana na podstawie rekombinacji w gametogenezie żeńskiej. Głównym parametrem obrazującym zaawansowanie prac nad budową mapy genetycznej jest jej gęstość, która jest wyrażana przez średnią odległość genetyczną między dwoma dowolnymi sąsiednimi loci. Ważnym parametrem jest również całkowita długość genetyczna genomu, która powstaje przez sumowanie długości genetycznych wszystkich chromosomów stanowiących genom. Długość ta w przypadku ssaków mieści się zazwyczaj w przedziale od 2000 do 3000 cM. Przykładowo długość mapy genomu bydła jest szacowana na poziomie 2990 cM, przy gęstości mapy wynoszącej 2,5 cM [15], a genomu świni wynosi 2286 cM, przy gęstości 2,2 cM [30].

Udomowienie psa nastąpiło ok. 14 tys. lat temu i od tego momentu człowiek doprowadził do niespotykanego u innych gatunków zróżnicowania fenotypowego. Obecnie zarejestrowanych jest na świecie ponad 340 ras psów [14]. Pies należy do rodziny psowatych (*Canidae*), w której diploidalna liczba chromosomów mieści się w szerokim zakresie, od 34 (+ chromosomy B) u lisa pospolitego do 78 u psa i wilka. Również rodzina koniowatych (*Equidae*) jest interesująca ze względu na głębokie zmiany, jakie zaszły w układzie chromosomów podczas ewolucji. Zróżnicowanie pod względem liczby chromosomów u dziewięciu gatunków należących do tej rodziny mieści się w bardzo szerokim zakresie, od 32 u zebry Hartmanna do 66 u konia Przewalskiego. Hodowla konia domowego ($2n=64$) ma również

bardzo długą historię. Od 6 tys. lat użytkownicy, a potem hodowcy selekcjonują konie pod kątem siły, masy ciała, szybkości, chodów, umaszczenia czy też cech pokrojowych. Efektem tego procesu jest ok. 250 ras koni znanych na świecie, które charakteryzują się zróżnicowanymi cechami użytkowymi.

Efektem ubocznym procesu długotrwałej pracy rasotwórczej, w tym przy stosowaniu kojarzeń w pokrewieństwie, jest nagromadzenie się u tych gatunków, głównie wśród psów, niepożądanych mutacji odpowiedzialnych za rozwój chorób genetycznych. Właśnie to zjawisko spowodowało, że hodowcy, genetycy i lekarze weterynarii zainteresowali się stworzeniem markerowych map genomów, które pozwoliłyby na identyfikację molekularną tych genów.

PIES

Pierwsze mapy genetyczne genomu psa zostały opublikowane w 1997 roku [20, 22], a kolejne opracowania ukazały się w 1999 roku [24, 25]. Zestawienie najważniejszych informacji pochodzących z tych opracowań jest zamieszczone w tabeli 1. Warto zwrócić uwagę, że gęstość najnowszych map plasuje się poniżej 10 cM, a całkowita długość genomu psa jest szacowana na poziomie 2700 cM [24]. Poszukiwania sprzężeń między markerami prowadzone są w rodzinach. W programie DogMap badania prowadzone były na 106 osobnikach pokolenia F1, pochodzących z 15 rodzin [20]. Z kolei badania zespołów amerykańskich oparte były na analizie genetycznej 163 osobników pokolenia F2 z 17 rodzin 3-pokoleniowych [22, 24] oraz 114 osobników pokolenia F1 z bliżej nieznaną liczbą rodzin [45]. Należy zaznaczyć, że w mapach tych nie uwzględniono wszystkich znanych markerów genetycznych. Z danych literaturowych wynika, że ogólna liczba opisanych markerów klasy II – sekwencji mikrosatelitarnych, głównie powtórzeń dwu- oraz cztero-nukleotydowych, przekracza już 400 [17]. Ostatnio ukazało się również opracowanie zawierające charakterystykę molekularną sekwencji starterowych i długości amplifikowanych fragmentów dla 463 markerów klasy I, które mogą być wykorzystane do rozbudowania mapy genomu psa [27].

Istotną okolicznością, która utrudnia budowanie mapy genomu psa, jest kwestia przyporządkowania zidentyfikowanych grup sprzężeniowych do konkretnych chromosomów. Problem polega na tym, że kariotyp psa ($2n=78$) nie ma uzgodnionego międzynarodowego wzorca, który obejmowałby wszystkie chromosomy. Przyjęty jest jedynie wzorzec dla 21 największych par autosomów, spośród 38 par autosomów występujących u tego gatunku, oraz chromosomów płci [43]. Podejmowane były próby zaproponowania całościowego wzorca [7, 12, 29], ale żadna z tych propozycji nie uzyskała dotąd pełnej, międzynarodowej akceptacji. Przytoczone powyżej opra-

TABELA 1. Mapy genomu psa

Rok	Liczba markerów		Liczba zidentyfikowanych grup sprzężeniowych	Gęstość mapy (cM)	Ogólna długość genomu pokryta markerami (cM)	Chromosomy, w których zlokalizowano grupy sprzężeniowe	Źródło
	objętych analizami	wykazujących sprzężenie z innymi markerami					
1997	94	43	16	?	?	18 i 20	[20]
1997	150	139	30	14,0	884	X	[22]
1998	400	347*	57*	?	?	3,4, 9,10, 12, 13, 18, 20 i X	[26]
1999	276	268	39	9,3	1510	5, 9, 20 i X	[24]
1999	341	341	38	9,0	1822	1–3, 5–6, 8–10 15–16, 18, 20, 22, 26 i X	[45]

* badania dotyczyły tzw. hybrydowej mapy radiacyjnej – liczba 57 reprezentuje grupę fragmentów chromosomowych, na których zidentyfikowano ogółem 347 markerów

cowania nawiązują do propozycji przedstawionej przez Seldena i wsp. [36]. Nieliczne prace odnoszą się do propozycji Stone'a i wsp. [38].

Pomimo powyższych trudności, osiągnięcia w zakresie cytogenetycznej lokalizacji loci markerowych odnotowane w ostatnich latach należy uznać za znaczące. W 1998 roku liczba zmapowanych markerów przekroczyła sto i dominują wśród nich sekwencje mikrosatelitarne [21]. Dalszych kilkadziesiąt markerów zostało zmapowanych w 1999 roku [45, 48]. Dzięki temu w najnowszej mapie genomu psa udało się zlokalizować grupy sprzężonych loci w 15 autosomach (tab. 1). Zastosowanie techniki porównawczego malowania chromosomów, inaczej ZOO-FISH [49] oraz uzyskanie sond specyficznych dla chromosomów psa [16, 49] istotnie wpłynęło na możliwości rozbudowy mapy fizycznej genomu psa. Równoległe zastosowanie sond specyficznych dla chromosomów psa oraz sond dla sekwencji mikrosatelitarnych pozwoliło na dokładniejszy opis małych autosomów [7]. Ostatnio zdecydowano się również na wykorzystanie wiedzy o mapie fizycznej genomu lisa pospolitego ($2n=34 +$ zmienna liczba chromosomów B), który również należy do rodziny *Canidae*. Lis pospolity ma opracowany wzorzec kariotypu [10], a identyfikacja poszczególnych chromosomów jest znacznie łatwiejsza niż chromosomów psa. Po zastosowaniu techniki ZOO-FISH możliwe było wskazanie, które regiony chromosomów lisa pospolitego odpowiadają chromosom psa. Z badań tych wynika, że kariotypy psa i lisa pospolitego różnią się 26 fuzjami centrycznymi (translokacje Robertsona) oraz czterema fizjami. Porównano również genom człowieka i psa. Okazało się, że 22 ludzkie sondy chromosomowo-specyficzne (autosomy) hybrydują z 73 fragmentami chromosomów psa. Zastosowanie procedury odwrotnej, tzn. opartej na 38 sondach reprezentujących autosomy psa pozwoliło ujawnić, że 90 fragmentów w genomie człowieka hybryduje z tymi sondami [49]. Efektem

opisanych powyżej badań jest zidentyfikowanie co najmniej jednego markera genetycznego na każdym autosomie.

Lokalizacja markerów w chromosomach lisa może służyć do wskazania ich loci w chromosomach psa. Stosując taką procedurę ostatnio dokonano precyzyjnego umiejscowienia 23 markerów mikrosatelitarnych w chromosomach lisa pospolitego i psa [48]. Duże możliwości stwarza także analiza hybrydowych linii komórkowych utworzonych na bazie komórek psa poddanych naświetlaniu promieniami Roentgena. Efektem naświetlania jest fragmentacja chromosomów. Po przeprowadzeniu hybrydyzacji tak przygotowanych komórek z komórkami nośnikowymi, np. linią nowotworowych komórek chomika wyprowadza się klony zawierające fragmenty chromosomów psa. Dalsza analiza polega na identyfikacji markerów (polimorfizm białek, mikrosatelity) psa w poszczególnych klonach hybrydowych. Takie podejście zastosowali Priat i wsp. [26], którzy analizowali występowanie 400 markerów genetycznych (218 klasy I i 182 klasy II) w 126 liniach komórek hybrydowych uzyskanych po wstępnym naświetleniu fibroblastów psa promieniami gamma. W rezultacie autorzy przyporządkowali 347 markerów do 57 fragmentów chromosomowych, spośród których dziewięć zlokalizowano w konkretnych chromosomach (tab. 1).

KOŃ

Pierwszym przyczynkiem do mapy genomu konia było opublikowanie sprzężenia między locus dehydrogenazy 6-P-glukonianu i układem grupowym krwi K [31]. W następnych dwudziestu latach opisano kolejne grupy sprzężeniowe, co pozwalało na sukcesywne rozbudowywanie mapy [1, 2, 32, 33]. Odkrycia w mapowaniu powiązane były wówczas z badaniami nad nowymi loci znajdującymi zastosowanie w genetycznej kontroli pochodzenia koni (grupy krwi oraz polimorficzne białka i enzymy). Sytuacja uległa zmianie na początku lat 90. w związku z odnotowywanymi postępami w biologii molekularnej oraz sukcesami w badaniach nad genomem człowieka.

W październiku 1995 odbyła się w Lexington, USA pierwsza Międzynarodowa Konferencja Mapowania Genomu Konia (*International Equine Gene Mapping Workshop* – IEGMW). W spotkaniu wzięło udział około 70 uczestników z 20 krajów (25 laboratoriów) zaproszonych do współpracy w ramach Projektu Mapowania. Głównym celem Workshopu było skoncentrowanie wysiłków poszczególnych ośrodków badawczych na konstrukcji mapy sprzężeniowej. Równocześnie ważnym osiągnięciem tego spotkania było uzgodnienie przez uczestniczących w nim cytogenetyków wzorca kariotypu konia i przyjęcie jednolitej międzynarodowej nomen-

klatury, co w dużym stopniu pozwoliło uniknąć problemów występujących dotychczas w badaniach innych gatunków zwierząt.

Do konstrukcji mapy sprzężeniowej posłużono się Międzynarodowym Panelem Rodzin Referencyjnych, na który złożyło się 12 rodzin półrodzeństwa (należących do 10 ras), każda składająca się z ogiera oraz z 21 do 52 jego potomków (razem 448 osobników). Materiał badawczy pochodził z 7 krajów w tym 2 rodziny skompletowano w Polsce w Laboratorium Badań Markerów Genetycznych u Koni, w Zakładzie Hodowli Koni Akademii Rolniczej w Poznaniu (tab. 2)

W pierwszej fazie Projektu (1995–1998) w badaniach aktywnie uczestniczyło 20 ośrodków naukowych w 10 krajach, w tym 9 w USA, 2 w Australii i po jednym w Czechach, Francji, Holandii, Niemczech, Norwegii, Nowej Zelandii, Szwecji, Wielkiej Brytanii i w Polsce.

Wyniki ponad 3-letniej międzynarodowej współpracy przedstawiono w 1999 r. [13]. We wszystkich rodzinach analizie poddano 161 markerów (144 mikrosatelity, 7 loci grup krwi i 10 loci białek), w których ogier był heterozygotą. Dane rodowodowe oraz wyniki badań laboratoryjnych zostały poddane analizie i zostały zweryfikowane w INRA – *Centre de Recherches de Jouy* we Francji. Sprzężenia wykryto w odniesieniu do 124 loci, z których 95 miało wstępnie ustaloną kolejność w obrębie grup sprzężeniowych. Loci te przypisano do 29 grup sprzężeniowych. Pełniejsza analiza uwzględniająca dane z grup syntenicznych oraz FISH pozwoliła zlokalizować 29 grup sprzężeniowych w 26 chromosomach autosomalnych. Mapa ta obejmuje 936 cM, a średnia gęstość mapy została oszacowana na poziomie 14,2 cM. Procent

TABELA 2. Międzynarodowy panel 12 rodzin referencyjnych składających się z ojca i grup półrodzeństwa

Ro- dzi- na	Lab. (kod)	Rasy koni reprezentowanych w rodzinach	Źródło materiału rodzinowego (kraj)	Liczba potom- stwa	% informa- tywnych loci ogierów
A	LEX	kłusak amerykański	USA	31	57
B	POZ	anglo-arab	Polska	52	54
C	POZ	szlachetna półkrew	Polska	35	52
D	UKY	kuc (krzyż. z szetlandami)	USA	49	59
E	CZB	pełna krew angielska	Czechy	41	39
F	DAV	<i>quarter horse</i>	USA	47	50
G	JEJ	<i>selle francais</i>	Francja	40	59
H	UPP	kłusak szwedzki	Szwecja	36	55
J	NZM	pełna krew angielska	N. Zelandia	40	38
K	MIN	krzyżówki (szlach. x pociąg.)	USA	23	55
L	MUC	niemiecki koń wierzchowy	Niemcy	21	45
N	MUC	niemiecki koń wierzchowy	Niemcy	33	57

informatywnych loci ogierów wynosił w poszczególnych rasach od 38 (pełna krew angielska) do 59 (kuce i *selle francais*).

Równolegle, rozpoczęto prace nad mapami genetycznymi w dwóch innych ośrodkach: Uppsali (Szwecja) i Newmarket (W. Brytania). Pierwsza z nich została już opublikowana na podstawie segregacji 140 markerów w 8 rodzinach półrodzeństwa, ogółem 263 osobniki [18]. Na podstawie analizy segregacji 100 markerów przypisano do 25 grup sprzężeniowych, z których 22 zlokalizowano w 18 autosomach (tab. 3).

W Newmarket testowano 180 markerów w rodzinie złożonej z 5 dziadków, 5 rodziców i 41 sztuk potomstwa [39]. Struktura tej rodziny jest nietypowa dla tego gatunku, gdyż utworzono ją przy użyciu 2 par monozygotycznych bliźnięt-kłaczy krytych jednym ogierem pozyskując od nich embriony w 30. dniu ciąży w celu zwiększenia liczby potomstwa. Te badania pozwoliły na zidentyfikowanie 27 grup sprzężeniowych, z których 20 zlokalizowano w 19 chromosomach włącznie z chromosomem X (tab. 2).

Mapy budowane przez Lindgren i wsp. [18] oraz Guerina i wsp. [13] mają tę zaletę, że bazują na dużej liczbie potomstwa po jednym ogierze. Większość markerów genetycznych jest informatywna, kiedy badania prowadzone są na wielu rodzinach. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że tak skonstruowane rodziny referencyjne (ogier plus półrodzeństwo) nie dają możliwości analizowania sprzężeń markerów położonych w chromosomie X, poza obszarem pseudoautosomalnym. Zaletą pełnych rodzin użytych przez Swinburne i wsp. [39] jest zredukowanie kosztów testowania osobników i możliwość mapowania markerów w chromosomie X oraz ulokowania niektórych markerów w chromosomie Y. Wszystkie 3 mapy wykorzystują w dużej mierze markery mikrosatelitarne DNA, co ułatwia porównanie map i osiągnięcie konsensusu w zakresie liniowych związków markerów genetycznych.

Do roku 1995 zmapowano u koni tylko 5 genów (HBA, MHC, GPI, CRC i PGD). Aktualnie liczba ta sięga około 70 genów i 300 mikrosatelitów zlokalizowanych w 25 chromosomach. Nie opisano dotąd genów w 10 chromosomach: ECA6, ECA8, ECA14, ECA17, ECA19, ECA23, ECA25, ECA27, ECA29 i ECA30.

W 1996 r. Raundsepp i wsp. [28] posłużyli się techniką ZOO-FISH (znaną również jako porównawcze malowanie chromosomów) w celu zidentyfikowania regionów homologicznych w genomie człowieka i konia. Na podstawie tych badań stwierdzono, że liczba rearanżacji w chromosomach, które wystąpiły od czasu rozdzielenia się wspólnego przodka ludzi i koni, była stosunkowo ograniczona, szczególnie jeśli porównamy to z ogromną liczbą rearanżacji opisanych dla myszy i człowieka. Dla przykładu, chromosom 9. u konia wydaje się być w całości odpowiednikiem ludzkiego chromosomu 8. Jednakże technika ta nie wykrywa inwersji wewnątrz regionów chromosomowych lub translokacji małych segmentów. Autorzy tej publikacji podają równocześnie, że żadna z sond ludzkich nie hybrydyzowała

TABELA 3. Mapy genomu konia (1998–1999)

Rok	Liczba markerów		Liczba zidentyfikowanych grup sprzężeniowych	Gęstość mapy (cM)	Ogólna długość genomu pokryta markerami (cM)	Chromosomy, w których zlokalizowano grupy sprzężeniowe	Źródło
	objętych analizami	wykazujących sprzężenie z innymi markerami					
1998	140	100	25	12,6	1500	1-7; 9-11;13; 15-16; 18-19; 21-22; 30	[18]
1998	180		27			19 chromosomów, w tym chromosom X	[39]
1999	161	124	29	14,2	936	1-6; 8-25; 29-30	[13]

z chromosomami konia: ECA6p, ECA12, ECA13p, ECA27, ECA31 oraz ECA-Y. Chociaż większość wyników ZOO-FISH została potwierdzona przez dalsze fizyczne mapowanie genomu w innych laboratoriach, znaleziono jednak kilka niezgodności, które będą przedmiotem przyszłych opracowań. Bez względu na przyszłe wyjaśnienia i subtelności tej mapy, praca ta była głównie zachętą do badań i punktem wyjścia do mapowania genomu.

Postęp w poznawaniu genomu konia jest również uwarunkowany badaniami hybrydowych komórek somatycznych. Dwie publikacje opisują nowe grupy synteniczne obejmujące markery biochemiczne [47] i markery mikrosatelitarne [3]. Ostatnio opracowano trzeci panel klonów hybrydowych, które wykorzystano m.in. do rozległych badań synteniczności i markerów RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) [35]. Ta publikacja opisuje grupy synteniczne rozmieszczone w 21 chromosomach oraz dowody na istnienie innych 12 grup syntenicznych na pozostałych 12 chromosomach.

PODSUMOWANIE

Lokalizacja coraz większej liczby równomiernie rozproszonych markerów genetycznych w genomach psa i konia owocuje identyfikacją genów, których zmutowane allele odpowiedzialne są za rozwój chorób genetycznych. Pierwszym krokiem do identyfikacji takich genów jest wykrycie sprzężenia z markerami genetycznymi. Przykładowo, prowadzone analizy molekularne 103 markerów genetycznych w rodzinie setera angielskiego, w której segregował gen recesywny, odpowiedzialny

za chorobę neurodegeneracyjną – NCL (ang. *neuronal ceroid lipofuscinoses*), doprowadziły do identyfikacji trzech markerów sprzężonych z tym genem [19]. Równolegle stosowana jest procedura wyszukiwania genów kandydujących na podstawie wiedzy o mutacjach genowych u gatunków o znacznie lepiej poznanym genomie (człowiek i mysz). Szeroko stosowane jest to podejście, w powiązaniu z poszukiwaniem sprzężonych markerów, w odniesieniu do bardzo powszechnej choroby genetycznej dotykającej psy rasowe, jaką jest postępujący zanik siatkówki [25]. Obecnie dostępnych jest 15 testów molekularnych przydatnych do wykrywania zmutowanych genów odpowiedzialnych za choroby dziedziczne psów [8].

Zastosowanie opracowywanych map w hodowli koni było do niedawna ograniczone. Bailey i wsp. [4] użyli markerowej mapy genomu do wykrycia genu powodującego SCID (ciężki złożony brak odporności u koni). Wyniki tych badań wykazały bliskie sprzężenie mikrosatelitarnego markera HTG-8 ze SCID. Mapowanie synteniczne wykazało, że gen kandydujący DNA-PK był synteniczny z HTG-8 [46]. Równocześnie Shin i wsp. [34] odkryli delecję 5 nukleotydów w DNA-PK, odpowiedzialną za występowanie SCID u koni. Przeprowadzone w Polsce badania na licznych materiale wykazały brak tej mutacji w Polskiej populacji koni rasy arabskiej [44].

Dzięki wynikom uzyskanym w trakcie opracowywania mapy genetycznej w laboratoriach dostępne są dziś testy genetyczne pozwalające wykryć, a także prognozować choroby lub cechy ważne dla hodowcy lub użytkownika. Należy tu wymieniony wyżej SCID czy HYPP – okresowy paraliż mięśni, u koni rasy *Quarter Horse*, któremu towarzyszy podniesienie poziomu potasu we krwi [6]. Hodowcy koni zainteresowani ciekawym umaszczeniem, szczególnie w USA hodowcy tzw. *painted horses* korzystają z możliwości prognozowania umaszczenia przy pomocy testów genetycznych. Dotyczy to szczególnie maści srokatej, a zwłaszcza jej odmiany „tobiano” [5]. Dostępny jest także test wykrywający mutację genu związanego z letalnym białym umaszczeniem. Jak dotąd gen odnotowano u koni ras Paint, pełnej krwi angielskiej, *Quarter Horse* oraz u miniaturowych kuców. Mutacja dotyczy genu receptora endoteliny B, a syndrom letalnego białego umaszczenia określany jest często jako „koński wariant” choroby Hirschprunga u ludzi [23].

LITERATURA

- [1]ANDERSSON L, SANDBERG K. A linkage group composed of three coat color genes and three serum protein loci in horses. *J Heredity* 1982; **73**, **2**: 91–94.
- [2]ANDERSSON L, JUNEJA RK, SANDBERG K. Genetic linkage between the loci for phosphohexose isomerase (PHI) and a serum protein (Xk) in horses. *Animal Blood Groups Biochemical Genetics* 1983; **14**: 45–50.
- [3]BAILEY E, GRAVES KT, COTHRAN, REID R, LEAR TL, ENNIS RB. Syntenic mapping horse microsatellite markers using a heterohybridoma panel. *Animal Genetics* 1995; **26**: 177–180.

- [4]BAILEY E, REID RC, SKOW LC, MATHIASON K, LEAR TL, MCGUIRE TC. Linkage of the gene for equine combined immunodeficiency disease to microsatellite markers HTG8 and HTG4: Synteny and FISH mapping to ECA9. *Animal Genetics* 1997; **28**: 268–273.
- [5]BOWLING AT. Equine linkage group II: phase conservation to TO with A1B and GcS. *J Heredity* 1987; **78**: 248–250.
- [6]BOWLING AT, BYRNS G, SPIER SJ. Evidence for single pedigree source of the hyperkalemic periodic paralysis susceptibility gene in quarter horses. *Animal Genetics* 1996; **27**(4): 279–281.
- [7]BREEN M, BULLERDIEK J, LANGFORD CF. The DAPI banded karyotype of the domestic dog (*Canis familiaris*) generated using chromosome-specific paint probes. *Chromosome Research* 1999; **7**: 401–406.
- [8]BSAVA NEWS. Focus on canine hereditary diseases. *J Small Animal Practice* 1998; **39**: 555.
- [9]CHARON KM. Wykorzystanie metod molekularnej analizy genomu zwierząt w pracy hodowlanej. *Post Nauk Roln* 1998; **5**: 88–97.
- [10]COMMITTEE FOR THE STANDARD KARYOTYPE OF *VULPES FULVUS* DESM. The standard karyotype of the silver fox (*Vulpes fulvus* Desm.). *Hereditas* 1985; **103**:171–176.
- [11] KRZYŻOSIAK W (red.) Genom człowieka – największe wyzwanie współczesnej genetyki i medycyny molekularnej. Wyd. Naukowe PWN 1997.
- [12]GRAPHODATSKY AS, BEKLEMISHEVA VR, DOLF G. High-resolution GTG-banding patterns of dog and silver fox chromosomes: description and comparative analysis. *Cytogenet Cell Genet* 1995; **69**: 226–231.
- [13]GUERIN G, BAILEY E, BERNOCO D, ANDERSON I, ANTCZAK DF, BELL K, BINNS MM, BOWLING AT, BRANDON R, CHOLEWIŃSKI G, COTHRAN EG, ELLEGREN H, FORSTER M, GODARD S, HORIN P, KETCHUM M, LINDGREN G, MC PARTLAN H, MERIAUX J-C, MICKELSON JR, MILLON LV, MURRAY J, NOAU K, RØED K, SANDBERG K, SHIUE Y-L, SKOW LC, STOTT M, SWINBURNE S, VALBERG J, VAN HAERINGEN H, VAN HAERINGEN WA, ZIEGLE J. Report of the International Equine Gene Mapping Workshop: Male Linkage Map. *Animal Genetics* 1999; **30**,5: 341–354.
- [14]KALETA T, FISZDON K. Wybrane zagadnienia z genetyki i zachowania psów. Wyd. SGGW, Warszawa 1999.
- [15]KAPPES SM, KEELE JW, STONE RT, MCGRAW RA, SONSTEGARD TS, SMITH TPL, LOPEZ-CORRALES NL, BEATTIE CW. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research* 1997; **7**: 235–249.
- [16]LANGFORD CF, FISCHER PE., BINNS MM, HOLMES NG, CARTER NP. Chromosome-specific paints from a high-resolution flow karyotype of the dog. *Chromosome Research* 1996; **4**: 115–123.
- [17]LANGSTON AA, MELLERSH CS, WIEGAND NA, ACLAND GM, RAY K, AGUIRRE GD, OSTRANDER EA. Toward a framework linkage map of the canine genome. *J Heredity* 1999; **90**: 7–14.
- [18]LINDGREN G, SANDBERG K, PERSSON H, MARKLUND S, BREEN M, SANDGREN B, CARLSTEN J, ELLEGREN H. A primary male autosomal linkage map of the horse genome. *Genome Res* 1998; **8**: 951–966.
- [19]LINGAAS F, AARSKAUG T, SLETTEN M, BJERKAS I, GRIMHOLT U, MOE L, JUNEJA RK, WILTON AN, GALIBERT F, HOLMES NG, DOLF G. Genetic markers linked to neuronal ceroid lipofuscinosis in English setter dogs. *Animal Genetics* 1998; **29**: 371–376.
- [20]LINGAAS F, SORENSEN A, JUNEJA RK, JOHANSSON S, FREDHOLM A, WINTERO AK, SAMPSON J, MELLERSH C, CURZON A, HOLMES NG, BINNS MM, DICKENS HF, RYDER EJ, GERLACH J, BAUMLE E, DOLF G. Towards construction of canine linkage map: establishment of 16 linkage groups. *Mammalian Genome* 1997; **8**: 218–221.

- [21] ŁADON D. Wykorzystanie techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) do mapowania genomu lisa pospolitego (*Vulpes vulpes*) i psa (*Canis familiaris*). Praca doktorska. Akademia Rolnicza w Poznaniu 1998.
- [22] MELLERSH CS, LANGSTON AA, ACLAND GM, FLEMING MA, RAY K, WIEGAND NA, FRANCISCO LV, GIBBS M, AGUIRRE GD, OSTRANDER EA. A linkage map of the canine genome. *Genomics* 1997; **46**: 326–336.
- [23] METALINOS DL, BOWLING AT, RINE J. A missense mutation in endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschprung Disease. *Mammalian Genome* 1998; **9**: 426–431.
- [24] NEFF MW, BROMAN KW, MELLERSH CS, RAY K, ACLAND GM, ARUIRRE GD, ZIEGLE JS, OSTRANDER EA, RINE J. A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. *Genetics* 1999; **151**: 803–820.
- [25] PETERSEN-JONES SM. A review of research to elucidate the causes of the generalized progressive retinal atrophies. *Veterinary J* 1998; **155**: 5–18.
- [26] PRIAT C, HITTE C, VIGNAUX F, RENIER C, JIANG Z, JOUQUAND S, CHERON A, ANDRE C, GALIBERT F. A whole-genome radiation hybrid map of the dog genome. *Genomics* 1998; **54**: 361–378.
- [27] PRIAT C, JIANG ZH, RENIER C, ANDRE C, GALIBERT F. Characterization of 463 type I markers suitable for dog genome mapping. *Mammalian Genome* 1999; **10**: 803–813.
- [28] RAUDSEPP T, FRÖNICKE L, SCHERTHAN H, GUSTAVSSON I, CHOWDHARY BP. Zoo-FISH delineates conserved chromosomal segments in horse and man. *Chromosome Res* 1996; **4**: 1–8.
- [29] REIMANN N, BARTNITZKE S, BULLERDIEK J, SCHMITZ U, ROGALLA P, NOLTE I, RONNE M. An extended nomenclature of the canine karyotype. *Cytogenet Cell Genet* 1996; **73**: 140–144.
- [30] ROHRER GA, ALEXANDER LJ, HU Z, SMITH TPL, KEELE JW, BEATTIE CW. A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Research* 1996; **6**: 371–391.
- [31] SANDBERG K. Linkage between the K blood group locus and the 6-PGD locus in horses. *Animal Blood Groups Biochemical Genetics* 1974; **5**: 137–141.
- [32] SANDBERG K, ANDERSSON L. Linkage relationships among 15 blood marker loci. *Hereditas* 1984; **100**: 199–208.
- [33] SANDBERG K, ANDERSSON L. Horse (*Equus caballus*). In: O'Brien SJ, editor. Genetic Maps: Locus Maps of Complex Genomes, Book 4, Non-human Vertebrates. 6th ed. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1993; 4.746–4.748.
- [34] SHIN EK, PERRYMAN LE, MEEK K. A kinase negative mutation of DNAPKcs in equine SCID results in defective coding and signal joint formation. *J Immunol* **158**: 3565–3569.
- [35] SHIUE Y-L, BICKEL LA, CAETANO AR, MILLON LV, CLARK RS, EGGLESTON ML, MICHELMORE R, BAILEY E, GUERIN G, GODARD S, MICKELSON JR, VALBERG SJ, MURRAY JD, BOWLING AT. A synteny map of the horse genome comprised of 222 microsatellit and RAPD markers. *Animal Genetics* 1999; **30**: 1–9.
- [36] SELDEN J.R, MOORHEAD PS, OEHKERT ML, PATTERSON DF. The Giemsa banding pattern of the canine karyotype. *Cytogenetics and Cell Genetics* 1975; **15**: 380–387.
- [37] STEISS JE, NYLOR JM. Episodic muscle tremors in a quarter Horse resemblance to Hyperkalemia Periodic Paralysis. *Can Veterinary J* 1986; **27**: 332–335.
- [38] STONE DM, JACKY PB, PRIEUR DJ. The Giemsa banding pattern of canine chromosomes, using a cell synchronization technique. *Genome* 1991; **34**: 407–412.
- [39] SWINBURNE J, BREEN M, LOCKHART L, MARTI E, GERSTENBERG C, ALLEN WR, BINNS MM. Genotyping on an equine full-sib family for linkage map development. *Animal Genetics* 1998 (Abstract)
- [40] ŚWITOŃSKI M. Mapowanie genów u zwierząt gospodarskich. *Biotechnologia* 1992; **1(16)**: 76–84.

- [41]ŚWITOŃSKI M. Markerowe mapy genomowe i ich wykorzystanie w hodowli zwierząt. *Post Biol Kom* 1998; **25** (supl. 10): 113–121.
- [42]ŚWITOŃSKI M., KURYŁ J. Poszukiwanie genów kontrolujących cechy tuczne, opasowe i rzeźne – najnowsze osiągnięcia. *Prace i Materiały Zootechniczne* 1998; **52**: 37–42.
- [43]ŚWITOŃSKI M, REIMANN N, BOSMA AA, LONG S, BARTNITZKE S, PIENKOWSKA A, MORENO-MILAN MM, FISCHER P. Report on the progress of standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. *Chromosome Research* 1996; **4**: 306–309.
- [44]TERRY RR, CHOLEWIŃSKI G, COTHRAN EG. Absence of severe combined immunodeficiency disease gene among Arabian horses in Poland. *J Appl Genetics* 1999; **40,1**: 39–41.
- [45]WERNER P, MELLERSH CS, RADUCHA MG, DEROSE S., ACLAND GM, PROCIUK U, WIEGAND N, AGUIRRE GD, HENTHORN PS, PATTERSON DF, OSTRANDER EA. Anchoring of canine linkage groups with chromosome-specific markers. *Mammalian Genome* 1999; **10**: 814–823.
- [46]WILER R, LEVER R, MOORE BB, VAN DYK LE, MEEK K. Equine severe combined immunodeficiency: A defect in V(D)J recombination and DNA-dependent protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**:11485–11489.
- [47]WILLIAMS H, RICHARDS CM, KONFORTOV BA, MILLER JR, TUCKER EM. Synteny mapping in the horse using horse-mouse heterohybridomas. *Animal Genetics* 1993; **24**: 257–260.
- [48]YANG F, MILNE BS, SCHELLING C, DOLF G, SCHLAPFER J, ŚWITOŃSKI M, ŁADOŃ D, PIENKOWSKA A, BOSMA AA, SARGAN D, FERGUSON-SMITH MA. The red fox and dog comparative chromosome map facilitates chromosomal assignment of canine cosmid clones containing highly polymorphic microsatellite sequences. *Chromosome Research* 2000 – w druku.
- [49]YANG F, OBRIEN PCM, MILNE BS, GRAPHODATSKY AS, SOLANKY N, TRIFONOV V, RENS W, SARGAN D, FERGUSON-SMITH MA. A complete comparative chromosome map of the dog, red fox and human and its integration with canine genetic maps. *Genomics* 1999; **62**: 189–202.

Adres autora: ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

ANALIZA GENETYCZNA METODAMI KLASYCZNEJ I MOLEKULARNEJ CYTOGENETYKI

THE GENETIC ANALYSIS BY CLASSICAL AND MOLECULAR CYTOGENETICS

Mariola ZAWADA i Izabela LIWEŃ

Zakład Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań

Streszczenie: Zmiana w liczbie bądź strukturze chromosomów może mieć wpływ na organizm, powodując pojawienie się cech odbiegających od normy. Zasadniczym celem diagnostyki cytogenetycznej jest określenie kariotypu badanej osoby. Kariotyp ustalany jest na podstawie analizy chromosomów metafazowych, a czasami także prometafazowych (HRBT – *high resolution banding technique*), uzyskanych z limfocytów krwi obwodowej. Metodami stosowanymi w diagnostyce cytogenetycznej są: metody cytogenetyki klasycznej (GTG, RBG, QFQ, CBG, BAT, Ag-NOR) i molekularnej (FISH, PRINS, CGH).

Słowa kluczowe: aberracje, cytogenetyka klasyczna, cytogenetyka molekularna, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, diagnostyka cytogenetyczna

Summary: The change of the number or structure of chromosomes may to cause abnormal phenotypic features. The main aim of cytogenetic diagnosis is identification of karyotype of patient. The karyotype has been identified on analysis of metaphase and prometaphase chromosomes (HRBT – high resolution banding technique) of peripheral blood lymphocytes. The methods of classical (GTG, RBG, QFQ, CBG, BAT, Ag-NOR) and molecular cytogenetics (FISH, PRINS, CGH) are usually used in cytogenetics diagnosis.

Key words: chromosomal aberrations, classical cytogenetics, molecular cytogenetics, fluorescence *in situ* hybridization, cytogenetic diagnosis.

Prawidłowy kariotyp człowieka obejmuje 46 chromosomów (44 chromosomy autosomalne i 2 chromosomy płci). Zmiana w liczbie bądź strukturze chromosomów może mieć wpływ na organizm, powodując pojawienie się cech odbiegających od normy (np. cechy dysmorficzne, upośledzenie umysłowe). O niewątpliwym wpływie aberracji chromosomowych na fenotyp świadczy ich duży udział w patologii

człowieka. Na podstawie badań cytogenetycznych aberracje chromosomowe stwierdzone są u ok. 0,5% żywo urodzonych dzieci i występują także w 60% poronień samoistnych lub 5% wszystkich rozpoznanych ciąż. Wiadomo, że 15% wad rozwojowych o znanej etiologii spowodowanych jest aberracjami chromosomowymi [15, 17].

I. DIAGNOSTYKA GENETYCZNA Z UŻYCIEM KLASYCZNYCH TECHNIK CYTOGENETYCZNYCH

Zasadniczym celem diagnostyki cytogenetycznej jest określenie kariotypu badanej osoby. Analiza kariotypu zwykle podyktowana jest określonymi wskazaniami, tj. zaawansowanym wiekiem matki, występowaniem znanych chorób genetycznych, podejrzeniem wystąpienia choroby dziedzicznej w rodzinie (wady wrodzone, niedorozwój umysłowy), obecnością płodu lub dziecka z wadami wrodzonymi, obecnością dziecka z upośledzeniem umysłowym, powtarzającymi się poronieniami samoistnymi, pokrewieństwem rodziców, narażeniem na substancje o znanym lub podejrzanym działaniu teratogennym [15].

W przypadku wykrycia aberracji liczby lub struktury chromosomów rozpoznanie cytogenetyczne jest niezmiernie ważne, wręcz decydujące dla udzielenia prawidłowej porady genetycznej. W tym celu analiza cytogenetyczna prowadzona jest dwutorowo, z użyciem klasycznych technik, takich jak [1, 25, 40, 52]:

- **GTG** (wzór prążkowy G uzyskany przez trawienie chromosomów trypsyną i barwienie barwnikiem Giemsy),
- **RBG** (wzór replikacyjny uzyskany po podstawieniu tymidyny przez BrdU w chromosomowym DNA i fotolizie BrdU-DNA, a następnie wybarwieniu chromosomów barwnikiem Giemsy),
- **QFQ** (wzór prążkowy Q uzyskany poprzez wybarwienie chromosomów barwnikiem fluorescencyjnym – quinakryną),
- **BAT** (technika immunocytochemicznej detekcji BrdU),
- **CBG** (technika wybarwiania heterochromatyny konstytutywnej przez traktowanie chromosomów wodorotlenkiem baru i barwienie barwnikiem Giemsy),
- **Ag-NOR** (technika wysrebrzania aktywnych regionów jąderkotwórczych z użyciem azotanu srebra)

oraz metod cytogenetyki molekularnej:

- **FISH** – fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*Fluorescence In Situ Hybridization*) [37],

wraz z jej odmianami:

- **PRINS** (*Primed In Situ Labeling*) [49] i **CGH** (*Comparative Genomic Hybridization*) [2].

Rozdzielczość klasycznych technik cytogenetycznych w chromosomach metafazowych

Do ustalania kariotypu pacjenta najczęściej wykorzystywane są chromosomy metafazowe, uzyskane z limfocytów krwi obwodowej. Aby podstawowa analiza cytogenetyczna była możliwa, niezbędne jest zastosowanie takich technik, które doprowadzą do uzyskania specyficznego układu prążków na chromosomach. Najczęściej stosowanym w analizie cytogenetycznej wzorem prążkowym jest układ prążków typu G, uzyskiwany dzięki zastosowaniu techniki GTG. Na podstawie prążków G prowadzona jest zawsze wstępna, a czasami w przypadku prawidłowego kariotypu ostateczna ocena chromosomów. Wzór ten umożliwia identyfikację poszczególnych chromosomów w badanej płytce metafazowej oraz wykrycie aberracji liczby i niektórych rodzajów aberracji struktury chromosomów.

Standardowe badania cytogenetyczne prowadzone są na chromosomach metafazowych o stosunkowo małej liczbie prążków typu G przypadających na haploidalny zestaw chromosomów (350–550). W pojedynczym prążku chromosomów metafazowych zawarte jest średnio 4–10 mln par zasad [25, 26], co wyznacza granice rozdzielczości metod klasycznej cytogenetyki i równocześnie granice identyfikacji wielkości materiału genetycznego, który uległ zmianie. Oznacza to, że rozpoznanie cytogenetyczne obarczone jest pewnym błędem, a zmiany materiału genetycznego obejmujące mniej niż 4 mln par zasad mogą zostać przeoczone. Z tego powodu diagnostyka cytogenetyczna aberracji liczby chromosomów jest względnie łatwa i w zasadzie wystarcza tu analiza chromosomów z wzorem prążkowym G. Łatwo jest zauważyć zmianę liczby chromosomów i zidentyfikować chromosom, którego ta zmiana dotyczy.

Znacznie większe trudności występują przy diagnostyce aberracji struktury chromosomów z powodu obecności w różnych chromosomach morfologicznie bardzo podobnych regionów oraz często niewielkich rozmiarów fragmentów chromosomowych, które uległy zmianie. Stąd obowiązująca zasada analizy chromosomów nie krótszych niż w stadium 550 prążków typu G na garnitur haploidalny u osób z dysmorfia i upośledzeniem umysłowym oraz u par małżeńskich z niepowodzeniami rozrodu. Ponadto, zastosowanie w takich przypadkach dodatkowych metod prążkowych: RBG, CBG, QFQ, Ag-NOR i BAT, pozwala precyzyjniej określić rodzaj aberracji oraz w przybliżeniu ustalić punkty pęknięć chromosomów zaangażowanych w rearanżację strukturalną. Diagnostyka aberracji struktury jest często trudna do przeprowadzenia wyłącznie przy użyciu analizy chromosomów metafazowych z wzorem prążkowym G. Niejednokrotnie wymagane jest zwiększenie rozdzielczości metod klasycznej cytogenetyki, a jednym ze sposobów jest prowadzenie analizy cytogenetycznej na chromosomach wykazujących mniejszy stopień kondensacji DNA w porównaniu z chromosomami metafazowymi.

Rozdzielczość klasycznych technik cytogenetycznych w chromosomach prometafazowych

Metody używane do analizy cytogenetycznej w przypadku chromosomów prometafazowych o niższym stopniu kondensacji odznaczają się większą rozdzielczością w porównaniu do tych samych metod stosowanych w przypadku chromosomów metafazowych. Analiza cytogenetyczna chromosomów prometafazowych przy użyciu techniki HRBT (ang. *high resolution banding technique*) [26, 54] przebiega na poziomie 850 lub więcej prążków G na haploidalny zestaw chromosomów. Rozdzielczość HRBT wyznacza wartość 2–3 mln par zasad średnio zawartych w pojedynczym prążku chromosomu [25, 26]. Doskonałym uzupełnieniem metody GTG w badaniu chromosomów prometafazowych są pozostałe techniki klasycznej cytogenetyki, a zwłaszcza RBG i BAT.

Niekiedy jednak mimo zwiększenia rozdzielczości metod klasycznej cytogenetyki przez wprowadzenie analizy chromosomów prometafazowych prawidłowe rozpoznanie cytogenetyczne jest nadal utrudnione, a często wręcz niemożliwe. Trudności te widoczne są zwłaszcza w przypadku aberracji struktury chromosomów obejmujących niewielkie zmiany materiału genetycznego, takie jak: mikrodelecje, mikroduplikacje, translokacje niewielkich fragmentów chromosomowych. Jednak największe trudności diagnostyczne związane są z występowaniem chromosomów markerowych, czyli strukturalnie nieprawidłowych i niezidentyfikowanych chromosomów. Ich pochodzenia nie można zazwyczaj określić posługując się metodami klasycznej cytogenetyki.

II. DIAGNOSTYKA GENETYCZNA Z UŻYCIEM METOD CYTOGENETYKI MOLEKULARNEJ

Z literatury oraz własnych doświadczeń wiadomo, że w szeregu przypadków stosując metody klasycznej cytogenetyki stwierdza się wprawdzie obecność aberracji chromosomowej, ale rozpoznanie cytogenetyczne jest mało precyzyjne, a zatem niewystarczające dla właściwego poradnictwa genetycznego. W takich przypadkach są wskazania do zastosowania bardziej precyzyjnych metod diagnostycznych, jakimi są FISH, PRINS, CGH, i niejednokrotnie metody te rozstrzygają o prawidłowym rozpoznaniu.

Wzbogacenie palety metod cytogenetycznych o metodę FISH spowodowało prawdziwy przełom w diagnostyce cytogenetycznej, gdyż dzięki tej metodzie stało się możliwe badanie DNA chromosomowego na wszystkich etapach kondensacji (chromosomy meta- i prometafazowe, chromatyna jąder interfazowych, rozluźnione włókna chromatynowe). Metoda ta, dzięki łączeniu w sobie zalet cytogenetyki i biologii molekularnej, charakteryzuje się zdecydowanie większą dokładnością i specyficnością w porównaniu z klasycznymi metodami cytogenetycznymi. Na szcze-

gólną uwagę zasługuje aktualnie szeroko stosowana metoda kariotypowania oparta o FISH - Multiplex FISH, która umożliwia jednoczesną obserwację większej liczby różnych sekwencji DNA w badanym materiale [11, 30]. W metodzie M-FISH detekcja różnych obiektów możliwa jest dzięki zastosowaniu kilku fluorochromów o odmiennych zakresach świecenia pod wpływem światła UV. M-FISH znalazła zastosowanie przede wszystkim w przypadkach diagnostyki złożonych aberracji liczby i struktury chromosomów.

Rozdzielczość metody FISH w chromosomach metafazowych wynosi ok. 3 mln par zasad, w chromosomach prometafazowych – 2 mln par zasad, a w jądrach interfazowych ok. 1 mln par zasad [16, 24]. Skojarzenie FISH z nowoczesną metodą uzyskiwania wyciągniętych włókien chromatynowych umożliwia badanie DNA chromosomowego o wielkości nawet poniżej 100 tys. par nukleotydów [12].

Metodą alternatywną do FISH, umożliwiającą wykrywanie w krótkim czasie (15–20 minut) sekwencji powtarzalnych (np. sekwencji centromerowej chromosomów) jest metoda PRINS. Ze względu na skrócenie czasu analizy cytogenetycznej do minimum oraz możliwość detekcji w chromatynie jądra interfazowego sekwencji centromerowych poszczególnych chromosomów technika PRINS znalazła zastosowanie głównie w diagnostyce prenatalnej [8].

Inną metodą równie cenną i często stosowaną w diagnostyce cytogenetycznej jest metoda CGH umożliwiająca wykrywanie nie zrównoważonych zmian w materiale genetycznym (delecje i duplikacje). Metoda ta znalazła zastosowanie przede wszystkim w diagnostyce nowotworów, z którymi związane jest nagromadzenie różnorodnych zmian materiału genomowego o charakterze nie zrównoważonym [22, 23]. Metoda CGH pozwala także na identyfikację regionów chromosomowych szczególnie związanych z określonym rodzajem nowotworu, tzw. „gorących punktów”. Szacuje się, że rozdzielczość metody CGH sięga rzędu 5–10 Mb [13].

III. ANALIZA CYTOGENETYCZNA METODAMI CYTOGENETYKI KLASYCZNEJ I MOLEKULARNEJ – WYBRANE PRZYKŁADY

Diagnostyka aberracji liczby chromosomów

Aberracje liczby chromosomów autosomalnych stanowią ok. 25%, a aberracje chromosomów płci – ok. 33% ogółu nieprawidłowości chromosomowych. Aberracje liczby chromosomów są przyczyną aneuploidii lub poliploidii [15]. Dla rozważań o konsekwencjach klinicznych obecności nieprawidłowej liczby chromosomów ważna jest diagnostyka cytogenetyczna aneuploidii, polegającej na obecności dodatkowego chromosomu (trisomia) lub utracie jednego (monosomia), rzadziej dwóch chromosomów (nullisomia). Takie zaburzenia liczby chromosomów stwierdza się

w ok. 50% poronień samoistnych. Nieprawidłowość ta jest także przyczyną martwych urodzeń najczęściej z wadami rozwojowymi. Trisomie autosomalne są zazwyczaj letalne w czasie ciąży. Wyjątkami są trisomie dotyczące chromosomów 13, 18 i 21, a częstość ich występowania wśród noworodków wynosi odpowiednio: 1/5000, 1/3500, 1/680 [15].

Z powodu stosunkowo ciężkich konsekwencji klinicznych związanych z aberracjami liczby chromosomów ważna jest ich prawidłowa diagnostyka cytogenetyczna. Zasadniczo w celu identyfikacji dodatkowego chromosomu (np. z. Downa) wystarcza wzór prążkowy G, o ile materiał przeznaczony do diagnostyki zawiera komórki w stadium metafazy. Czasami jednak ze względu na obecność w materiale badawczym wyłącznie komórek w stadium interfazy (np. bezpośrednia diagnostyka prenatalna z wyłączeniem etapu hodowli) diagnostyka nie jest możliwa z użyciem klasycznych technik cytogenetycznych stworzonych do badania materiału genetycznego, występującego w postaci skondensowanych chromosomów. Stąd prawidłowa diagnostyka cytogenetyczna wymaga zastosowania techniki FISH.

Diagnostyka aberracji struktury chromosomów

Aberracje struktury chromosomów występują z częstością ok. 1/400 żywych urodzeń i w 4% poronień [50]. Stanowią dużą i różnorodną grupę nieprawidłowości chromosomowych, do których zaliczane są [9, 43]: delecja, duplikacja, chromosom pierścieniowy (kolisty), inwersja, izochromosom, translokacja.

Skutki fenotypowe aberracji struktury chromosomów zależą od tego, czy wystąpiły ilościowe zmiany (ubytek lub nadmiar) materiału genetycznego. W przypadku duplikacji lub delecji skutki fenotypowe są prawie zawsze bardzo poważne, jeśli aberracja ta dotyczy chromosomów autosomalnych: charakterystyczna dysmorfia, mnogie wady rozwojowe, upośledzenie umysłowe [43].

U osób z translokacjami zrównoważonymi lub inwersjami nie występują zmiany ilościowe materiału genetycznego, dlatego fenotyp tych osób jest prawidłowy. Nosiciele translokacji zrównoważonych lub inwersji mają jednak podwyższone ryzyko poronień samoistnych lub posiadania potomstwa z niezrównoważonym kariotypem i, tym samym, nieprawidłowym fenotypem [43, 47]. Zatem oszacowanie ryzyka genetycznego w przypadku aberracji struktury chromosomów jest niezmiernie ważne. Często jednak ze względu na niską rozdzielczość standardowych metod cytogenetycznych prawidłowe określenie punktów pęknięć w chromosomach jest niemożliwe lub obarczone dużym błędem.

W literaturze opisano szereg przypadków klinicznych, w których metodami klasycznej cytogenetyki stwierdzono wprawdzie obecność aberracji struktury chromosomów, ale rozpoznanie cytogenetyczne było mało precyzyjne i przez to niewystarczające dla właściwego poradnictwa genetycznego [39, 43]. Opisano przypadki translokacji, w których metodą FISH zweryfikowano wyniki badań prowa-

dzonych z użyciem klasycznych technik cytogenetycznych (GTG, BAT) [46, 55] oraz takie, które na skutek swej złożonej struktury wymagały wręcz zastosowania techniki FISH [42].

Diagnostyka chromosomów markerowych

Chromosomy markerowe łączą cechy zarówno aberracji liczby, jak i struktury chromosomów i są najczęściej definiowane jako małe, dodatkowe struktury chromosomowe obok 46 prawidłowych chromosomów człowieka [18]. Chromosomy markerowe mogą pochodzić zarówno od chromosomów płci, jak i autosomów.

Chromosomy markerowe mogą powodować różnorodne skutki fenotypowe. W przypadku chromosomów markerowych, szczególnie małych, występują trudności diagnostyczne związane z brakiem możliwości określenia nie tylko rodzaju materiału wchodzącego w ich skład (heterochromatyna, euchromatyna), ale także zidentyfikowania chromosomu, z którego pochodzą.

Chromosomy markerowe mogą być wykrywane zarówno u osób z dysmorfia i/lub upośledzeniem umysłowym, jak również u osób z niepowodzeniami rozrodu. Opisywano także przypadkowe wykrycie chromosomów markerowych u osób z prawidłowym fenotypem, stanowiących grupy kontrolne w badaniach, choć w bardzo niskim odsetku analizowanych komórek [7].

Chromosomy markerowe częściej są stwierdzane w kariotypach potomstwa starszych matek [6], a ok. 40% zdiagnozowanych przypadków występuje rodzinnie [41]. Dane literaturowe, na podstawie których można wnioskować o częstości chromosomów markerowych, są bardzo niejednolite. Występują duże rozbieżności w zależności od badanej populacji, rodzaju badanych komórek i sposobu prowadzenia badań cytogenetycznych. W opracowaniach literaturowych wyodrębniono 4 kategorie osób, u których określono częstość chromosomów markerowych:

- noworodki – 0,02–0,06%
- diagnostyka prenatalna (amniocenteza) – 0,04–0,37%
- osoby z niepowodzeniami rozrodu – 0,19%
- osoby z upośledzeniem umysłowym/wadami rozwojowymi – 0,26–0,33% [6, 14, 20, 21, 41, 48, 53].

Efekt fenotypowy związany z chromosomami markerowymi zależy od rodzaju materiału genetycznego, z którego są one zbudowane. Obecność w chromosomach markerowych wyłącznie heterochromatyny konstytutywnej zwykle nie powoduje efektu fenotypowego, podczas gdy chromosom markerowy bogaty w euchromatynę może spowodować poważne skutki fenotypowe przez występowanie w takich przypadkach zwiększonej dawki określonych genów [5].

W każdym przypadku stwierdzenia chromosomu markerowego konieczne jest zidentyfikowanie jego pochodzenia. Na podstawie dotychczasowych danych lite-

raturowych wiadomo, że chromosomy markerowe mogą pochodzić z różnych chromosomów i zawierać różne ich fragmenty.

Tradycyjne techniki cytogenetyczne pozwalają tylko w dużym przybliżeniu na określenie pochodzenia materiału genetycznego tworzącego chromosom markerowy. Najczęściej stosowana technika cytogenetyczna – analiza chromosomów z wzorem prążkowym GTG dostarcza informacji o wzorze prążkowym, kształcie i rozmiarach chromosomów markerowych [40]. W przypadku dużych chromosomów markerowych wzór prążkowy uzyskany techniką GTG może sugerować ich pochodzenie z określonych chromosomów. Ze względu jednak na podobieństwo morfologiczne niektórych regionów chromosomowych określenie pochodzenia chromosomów markerowych wyłącznie tą drogą jest zwykle niepewne.

W przypadku, gdy chromosom markerowy zawiera na jednym lub obu końcach sekwencje charakterystyczne dla satelitów chromosomów akrocentrycznych (chromosomy pary 13, 14, 15, 21, 22), odpowiednią metodą w identyfikacji dodatkowego materiału będzie technika Ag-NOR [19].

Techniką CBG [40] można wykazać obecność bądź brak heterochromatyny centromerowej. Czasami w celu identyfikacji chromosomów markerowych stosowana jest metoda DA/DAPI, w której wybarwione są obszary heterochromatynowe chromosomów pary 1, 9, 15, 16 i Y. Obecność w chromosomie markerowym bloku heterochromatynowego wybarwionego metodą DA/DAPI i satelitów pozwala przypuszczać, że pochodzi on z chromosomu 15 [38].

Dane literaturowe oraz własne doświadczenia wskazują na to, że w przypadku chromosomów markerowych FISH jest jedyną pewną metodą pozwalającą na określenie ich pochodzenia [4, 7, 10, 39, 56]. Jednak niewielka ilość informacji o materiale genetycznym budującym chromosom markerowy z jednej strony i często zupełny brak sugestii co do jego pochodzenia z drugiej wiążą się z koniecznością prowadzenia wielu doświadczeń z użyciem metody FISH z przypadkowo wybranymi sondami.

Problem mozaikowości komórkowej

Niezwykle ważnym zagadnieniem dotyczącym prawidłowej diagnostyki cytogenetycznej jest problem mozaikowości komórkowej, czyli występowanie u jednej osoby dwóch lub więcej linii komórkowych o różnych kariotypach. W przypadku aberracji liczby obecnej w 100% komórek lub nieco poniżej tej wartości, stosunkowo łatwo powiązać jej wystąpienie z nieprawidłowym fenotypem i zazwyczaj do jej identyfikacji wystarcza analiza z użyciem techniki GTG. Przykładem mozaikowości autosomalnej jest trisomia chromosomu 8, w której nosiciele są zwykle dobrze rozwinięci fizycznie, wykazują jednak łagodne cechy dysmorfii twarzy oraz opóźnienie rozwoju umysłowego. Innym przykładem mogą być mozaikowości trisomii chromosomów 13, 18 i 21, w których objawy kliniczne są zwykle podobne do objawów stwierdzanych w przypadkach niemozaikowych. Dobrym przykładem

mozaikowości chromosomów płci jest mozaikowy zespół Turnera. Objawy kliniczne są w tym zespole zmienne i zależą od odsetka komórek nieprawidłowych [15].

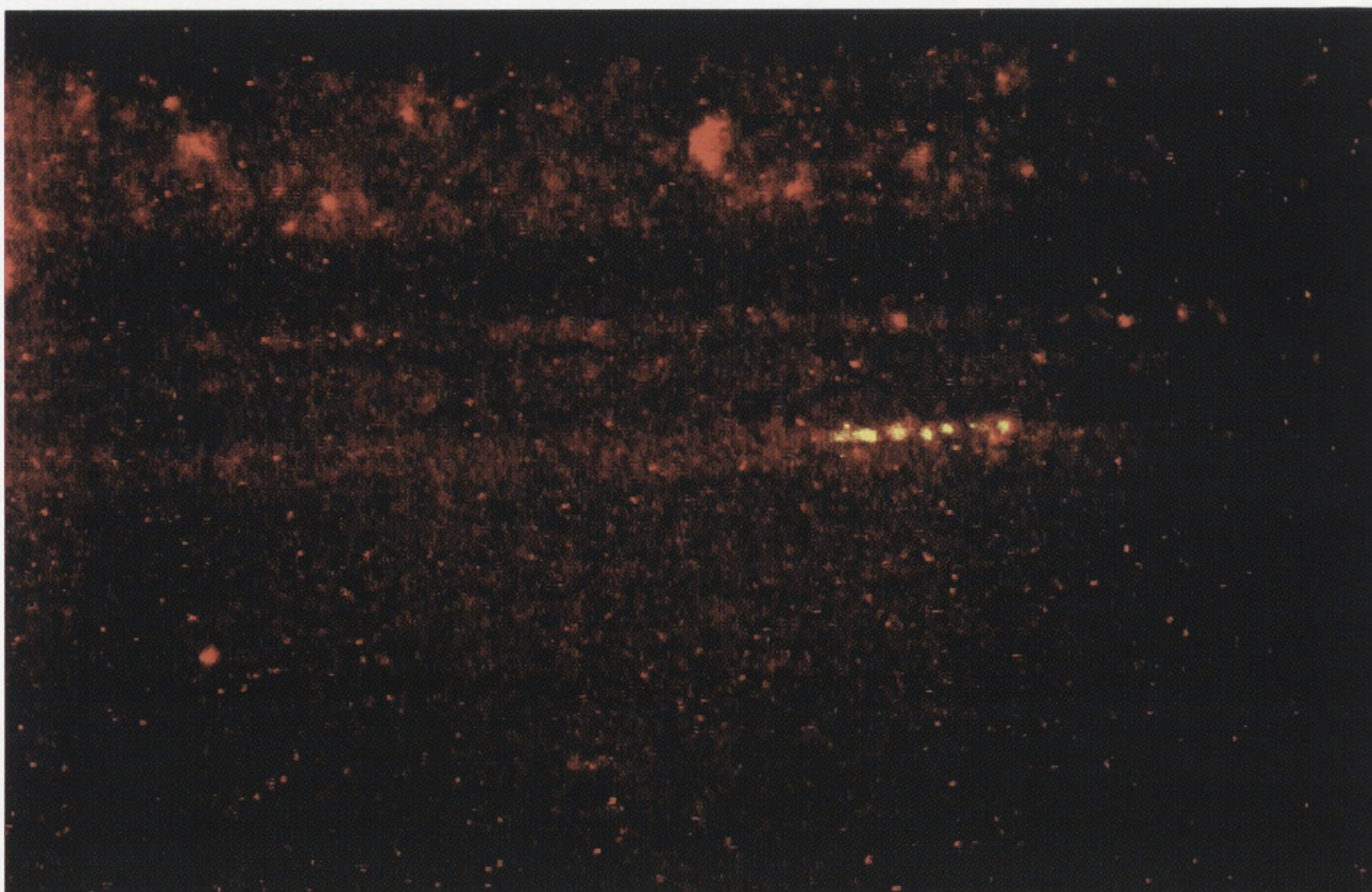
W przypadkach niskoprocentowego mozaicyzmu, tj. wystąpienia aberracji w niskim odsetku analizowanych komórek, trudno jest udowodnić związek z często bardzo słabo wyrażonym nieprawidłowym fenotypem. W dodatku możemy mieć do czynienia z nierozpoznawalną mozaikowością. Tak było w przypadku opisanym przez Latos-Bieleńską i wsp. [27], w którym u opóźnionej umysłowo 9-letniej dziewczynki stwierdzono nieprawidłowe cechy fenotypowe. W badaniu cytogenetycznym wykryto dodatkowy chromosom 14 w 4% komórek u dziewczynki i normalny kariotyp u matki z podobnym fenotypem, lecz o znacznie delikatniej wyrażonych cechach klinicznych i prawidłowej inteligencji. Jednak, gdy przeprowadzono badanie z użyciem metody FISH, zaobserwowano sygnał pochodzący od dodatkowego chromosomu 14 w 9% jąder interfazowych u córki i w 1,3% u matki.

Zarówno w przypadku niskoprocentowej mozaikowości dotyczącej aberracji liczby, jak i struktury chromosomów prawidłowa diagnostyka z użyciem klasycznych technik cytogenetycznych jest bardzo utrudniona, a często wręcz niemożliwa. Nie wystarcza w tych przypadkach materiał badawczy w postaci chromosomów. Niezbędna staje się analiza chromatyny jąder interfazowych, a czasem sięgnięcie nawet po technikę badania rozluźnionych włókien chromatynowych, które są powiązane z fluorescencyjną hybrydyzacją *in situ*.

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* w badaniu cytogenetycznym chorób neurologicznych

Stwardnienie rozsiane (MSRV – *multiple sclerosis associated retrovirus*)

Stosując metodę FISH wykazano w badaniach własnych występowanie sekwencji retrowirusa związanego ze stwardnieniem rozsianym (MSRV – *multiple sclerosis associated retrovirus*) we włóknach chromatynowych (dane niepublikowane). Badanie prowadzone metodą FISH miało szczególne znaczenie, gdyż wirusowi MSRV przypisuje się rolę w patogenezie stwardnienia rozsianego (SM). Pierwotnie niezidentyfikowane zewnątrzkomórkowe wiriony wykryto w hodowlach komórek uzyskanych z płynu mózgowo-rdzeniowego chorych na SM [33], a następnie również w hodowlach monocytów [34]. Autorzy tych badań nie stwierdzili cząstek wirusowych ani aktywności odwrotnej transkryptazy u osób zdrowych. Udało im się także dokonać transferu wirusa do nie zakażonych komórek w warunkach *in vitro* [35]. Dopiero dwa lata temu wyizolowano retrowirusa z komórek opon miękkich oraz z unieśmiertelnionych limfocytów B od chorych na SM i ostatecznie nadano mu nazwę MSRV [36]. MSRV należy do grupy onkowirusów i wykazuje pewną homologię z endogennymi wirusami. Nie wyklucza się powiązania MSRV z czyn-



RYSUNEK 1. FISH z biotynowanym produktem PCR o wielkości 435 pz, tj. zamplifikowaną sekwencją retrowirusa MSRV do włókien chromatynowych pochodzących od osoby zdrowej

nikiem gliotoksycznym, którego obecność wykryto w supernatancie hodowli monocytów/makrofagów i płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z SM. Aktywność tego czynnika korelowała z ekspresją odwrotnej transkryptazy [29].

Badania własne wykazały obecność w surowicy krwi sekwencji MSRV w RNA (cDNA) nie tylko u chorych, ale i u części zdrowych osób. Dzięki zastosowaniu FISH wykazano występowanie sekwencji MSRV we włóknach chromatynowych nie tylko u chorych na SM, ale również u zdrowych osób (rys. 1). Powyższe dane sugerują szerokie rozpowszechnienie sekwencji retrowirusa w prawidłowym genomie człowieka, co może podważać wyłączną rolę MSRV w rozwoju stwardnienia rozsianego.

Choroba Charcot-Marie-Tooth typ 1A (CMT1A)

Choroba CMT1A należy do grupy dziedzicznych obwodowych neuropatii ruchowych i czuciowych – HMSN (ang. *hereditary motor and sensory neuropathy*). W chorobie CMT1A obserwuje się powolne, postępujące osłabienie i zanik mięśni części dystalnych kończyn, stopniowe zanikanie lub brak głębokich odruchów ścięgnistych, zmniejszenie szybkości przewodzenia nerwów ruchowych oraz demielinizację z jednoczesnym rozrostem nerwów rdzeniowo-opuszkowych.

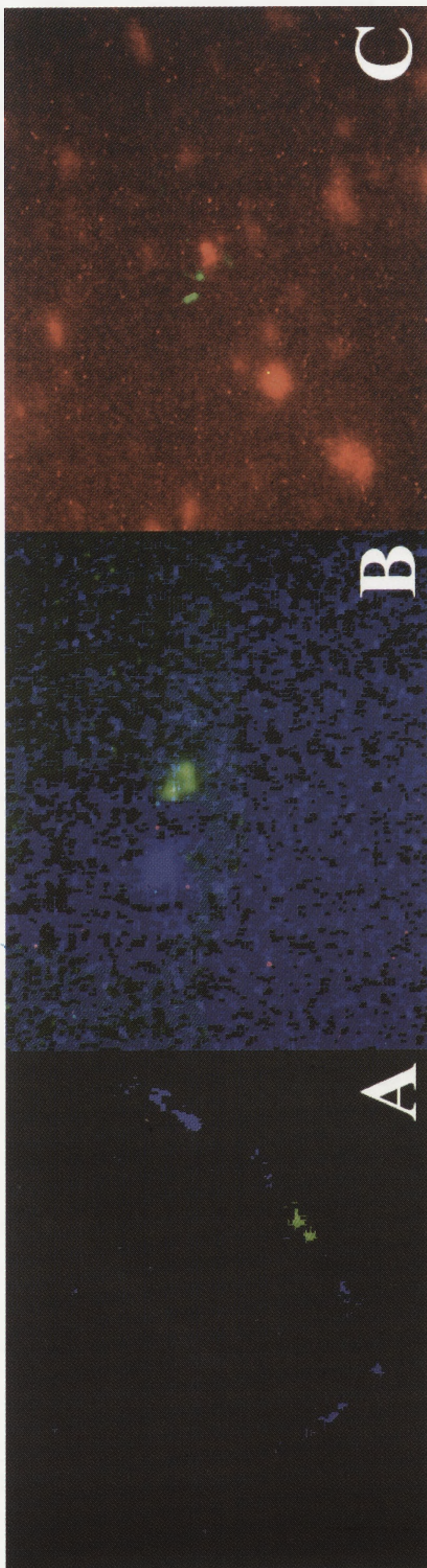
Choroba CMT1A związana jest z występowaniem duplikacji o wielkości 1,5 Mb w regionie 17p11.2 [28]. W regionie tym zlokalizowany jest gen PMP-22, kodujący obwodową białko mielinową, odgrywającą kluczową rolę w patogenezie choroby [3]. Zaobserwowano, że wysoki poziom mRNA genu PMP-22 występuje wyłącznie w obwodowym układzie nerwowym, co może oznaczać występowanie w przypadku CMT1A tzw. efektu dawki genu [31]. Badania nad chorobą CMT1A prowadzone z użyciem FISH [51] oraz metod pozwalających na mapowanie fizyczne genomu [32] wskazują, że duplikacja w regionie 17p11.2 ma charakter tandemowy. Dlatego też można wykazać jej obecność w genomie, a tym samym prowadzić diagnostykę choroby.

Diagnostyka CMT1A ma znaczenie prognostyczne w przypadku rodzin, w których u jednego z rodziców duplikacja w regionie 17p11.2 występuje w mozaice i nie wiąże się ze zmianami fenotypowymi. W rodzinach tych następuje przekazanie duplikacji potomstwu w 100% komórek, co wiąże się z pełną manifestacją kliniczną choroby. Takie przypadki znane są zarówno z literatury [45], jak również z badań własnych (rys. 2).

Z perspektywy kilkudziesięciu lat istnienia cytogenetyki można zaobserwować szereg zmian, jakim dziedzinie ta podlegała. Wielkie przyspieszenia w badaniach cytogenetycznych nadawały odkrycia natury technicznej, jak zastosowanie technik umożliwiających uzyskiwanie komórek w stadium metafazy, oszacowanie liczby chromosomów, uzyskiwanie wzorów prążkowych na chromosomach. Efektem tych zabiegów jest obecnie możliwość ustalenia kariotypu badanej osoby. Przez szereg lat w badaniach cytogenetycznych korzystano z technik podstawowych. Z czasem jednak szybko biegnący rozwój biologii molekularnej wpłynął w znacznym, jeśli nie decydującym stopniu na dalszy rozwój cytogenetyki. To dzięki nowoczesnym metodom biologii molekularnej, takim jak: FISH, PRINS, CGH, stało się możliwe sięgnięcie po niedostępne dotychczas rejony cytogenetyki (cytogenetyka interfazowa), przekroczenie dotychczas nieprzekraczalnych granic, jakie wyznaczała rozdzielczość klasycznych metod. Okazało się, że cytogenetyka nadal stanowi tę część nauki, w której prace badawcze i diagnostyczne będą prowadzone jeszcze przez szereg lat. Co ważne wprowadzenie nowoczesnych technik molekularnych nie wpłynęło negatywnie na klasyczną diagnostykę cytogenetyczną. Nastąpiło doskonałe skompletowanie obu dziedzin, w taki sposób, że każda z nich zaznacza się w analizie cytogenetycznej we właściwym momencie. Obecnie analiza z użyciem klasycznych technik cytogenetycznych stanowi ważny wstęp do badań na poziomie cytogenetycznym, które dalej można prowadzić na poziomie molekularnym.

Podziękowania

Praca ta została sfinansowana przez Komitet Badań Naukowych (KBN) – projekty badawcze Nr 4.PO5A08113 i 4PO5A09515. Wyniki badań przeprowadzonych me-



RYSUNEK 2. FISH z biotynowaną sondą VAW409 do włókien chromatynowych pochodzących od ojca pacjentki z podejrzeniem CMT1A, u którego wykryto obecność duplikacji w 30% analizowanych włókien (**A** – brak duplikacji, **B** – duplikacja obecna): FISH z biotynowaną sondą VAW409 do włókien chromatynowych pochodzących od pacjentki z podejrzeniem CMT1A, u której stwierdzono obecność duplikacji w 100% analizowanych włókien (**C** – duplikacja obecna); kolor zielony – barwa pochodząca od fluoresceiny zastosowanej w detekcji zhybrydyzowanej sondy; kolor niebieski – barwa pochodząca od DAPI związanego z włóknami chromatynowymi; kolor czerwony – barwa pochodząca od jodku propidynowego związanego z włóknami chromatynowymi

todą FISH zostały opracowane przy użyciu systemu cyfrowej analizy obrazu mikroskopowego (MetaSystems GmbH), zakupionego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BENN PA, PERLE MA. Chromosome staining and banding techniques. [W:] Human cytogenetics. *A practical approach*. Rooney DE i Czepulkowski BH IRL Press 1986; 57–84.
- [2] BENTZ M, BERGERHEIM USR, LI C, JOOS S, WERNER CA, BAUDIS M, GNARRA J, MERINO MJ, ZBAR B, LINEHAN WM, LICHTER P. Chromosome imbalances in papillary renal cell carcinoma and first cytogenetic data of familial cases analyzed by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1996; **75**: 17–21.
- [3] BLAIR IP, KENNERSON ML, NICHOLSON GA. Detection of Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication by the polymerase chain reaction. *Clin Chem* 1995; **41**: 1105–1108.
- [4] BLENNOW E, ANNEREN G, BUI T-H, BERGGREN E, ASADI E, NORDENSKJOLD M. Characterization of supernumerary ring marker chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Am J Hum Genet* 1993; **53**: 433–442.
- [5] BLENNOW E, TELENIUS H, DE VOS D, LARSSON C, HENRIKSSON P, JOHANSSON O, CARTER NP, NORDENSKJOLD M. Tetrasomy 15q: two marker chromosomes with no detectable alpha-satellite DNA. *Am J Hum Genet* 1994; **54**: 877–883.
- [6] BUCKTON KE, SPOWART G, NEWTON MS, EVANS HJ. Forty four probands with additional marker chromosome. *Hum Genet* 1985; **69**: 353–370.
- [7] CALLEN DF, EYRE H, YIP M-Y, FREEMANTLE J, HAAN EA. Molecular cytogenetic and clinical studies of 42 patients with marker chromosomes. *Am J Med Genet* 1992; **43**: 709–715.
- [8] CHRISTENSEN B, BRYNDORF T, PHILIP J, LUNDSTEEN C, HANSEN W. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 18 and triploidy in interphase nuclei of uncultured amniocytes by non-radioactive *in situ* hybridization. *Prenat Diagn* 1992; **12**: 241–250.
- [9] CONNOR JM, FERGUSON-SMITH MA. Podstawy genetyki medycznej. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, W-wa 1991.
- [10] CROLLA JA, DENNIS NR, JACOBS PA. A non-isotopic *in situ* hybridization study of the chromosomal origin of 15 supernumerary marker chromosomes in man. *J Med Genet* 1992; **29**: 699–703.
- [11] EILS R, UHRIG S, SARACOGLU K, SATZLER K, BOLZER A, PETERSEN I, CHASSERY J, GANSER M, SPEICHER MR. An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenet Cell Genet* 1998; **82**(3–4): 160–171.
- [12] FLORIJN RJ, BONDEN LA, VROLIJK H, WIEGANT J, VAANDRAGER JW, BAAS F, DEN DUNNEN JT, TANKE HJ, VAN OMMEN GJ, RAAP AK. High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. *Hum Mol Genet* 1995; **5**: 831–836.
- [13] FOROZAN F, KRHU R, KONONEN J, KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI O-P. Genome screening by comparative genomic hybridization. *TIG* 1997; **10**: 405–409.
- [14] FREIDRICH V, NIELSEN J. Bisatellited extra small metacentric chromosomes in newborn. *Clin Genet* 1974; **6**: 23–31.
- [15] FRIEDMAN JM, DILL FJ, HAYDEN MR, MCGILLIVRAY BC. Genetyka. (tłum. pod red Limon J), Urban & Partner, Wrocław, 1997.
- [16] HAAF T, WARD DC. Analysis of human chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization and protein immunofluorescence. *Medizinische Genetik* 1995; **2**: 121.
- [17] HASSOLD TJ, JACOBS PA. Trisomy in man. *Ann Rev Genet* 1984; **18**: 69–97.

- [18] HOOK EB, CROSS PK. Extra structurally abnormal chromosomes (ESAC) detected at amniocentesis: frequency in approximately 75,000 prenatal cytogenetic diagnoses and association with maternal and parental age. *Am J Hum Genet* 1987; **40**: 83–101.
- [19] HOWELL WM, BLACK DA. Controlled silver-staining nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 1980; **36**:1014–1015.
- [20] HSU LYF. Prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. In: Milunsky A, ed. *Genetic disorders and the fetus. Diagnosis, prevention and treatment*. Plenum Press. New York 1986, 115.
- [21] JACOBS PA. The role of chromosome abnormalities in reproductive failure. *Reprod Nutr Dev Supp* 1990; **11**: 63–74.
- [22] KUJAWSKI M, AALTO Y, JASKULA-SZTUL R, SZYFTER W, SZMEJA Z, SZYFTER K, KNUUTILA S. DNA copy number losses are more frequent in primary larynx tumors with lymph node metastases than in tumors without metastases. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; **114**: 31–34.
- [23] KUJAWSKI M, SARLOMO-RIKALA M, GABRIEL A, SZYFTER K, KNUUTILA S. Recurrent DNA copy number losses associated with metastasis of larynx carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1999; **26**: 253–257.
- [24] LAAN M, HELLSTEN E, PELTONEN L, PLOTIE A. Validation of mechanically stretched chromosomes for physical mapping using FISH. *Medizinische Genetik* 1995; **2**: 121.
- [25] LATOS-BIELEŃSKA A, HAMEISTER H, VOGEL W. Detection of BrdUrd incorporation in mammalian chromosomes by a BrdUrd antibody. III. Demonstration of replication patterns in highly resolved chromosomes. *Hum Genet* 1987; **76**, 293–295.
- [26] LATOS-BIELEŃSKA A, HAMEISTER H. Higher resolution banding technique in the clinical routine. *Clin Genet* 1988; **33**: 325–330.
- [27] LATOS-BIELEŃSKA A, GLAZAR R, JUNGERMAN M, KOŁOWSKA J, WIŚNIEWSKA M, ZAWADA M. UPD14 or hidden mosaicism 14 – an important problem for genotype-phenotype correlation. *Cytogenet Cell Genet* 1997; **77**:113.
- [28] LUPSKY JR, DE OCA-LUNA RM, SLAUGENHAUPT S, PENTAO L, GUZZETTA V, TRASK BJ, SAUCEDO-CARDENAS O, BARKER DF, KILLIAN JM, GARCIA CA, CHAKRAVARTI A, PATEL PI. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 1991; **66**: 219–232.
- [29] MENARD A, PIERIG R, PELLETIER J, BENS A P, BEELLIVEAU J, MANDRAND B, PERRON H, RIEGER F. Detection of gliotoxic activity in the cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Neurosc Lett* 1998; **245**: 49–52.
- [30] NEDERLOF PM, ROBINSON D, ABUKNESHAR R, WIEGANT J, HOPMAN AHN, TANKE HJ, RAAP AK. Three-color fluorescence *in situ* hybridization for simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* 1989; **10**: 20–27.
- [31] PATEL PI, ROA BB, WELCHER AA, SCHOENER-SCOTT R, TRASK BJ, PENTAO L, SNIPES GJ, GARCIA CA, FRANCKE U, SHOOTER EM, LUPSKY JR, SUTER U. The gene for peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nature Genet* 1992; **1**: 159–165.
- [32] PENTAO L, WISE CA, CHINAULT AC, PATEL PI, LUPSKI JR. Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monomer unit. *Nat Genet* 1992; **2**: 292–300.
- [33] PERRON H, GENY C, LAURENT A, MOURIQUAND C, PELLAT J, PERRET J, SEIGNEURIN JM. Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Res Virol* 1989; **140**: 551–561.
- [34] PERRON H, LALANDE B, GRATACAP B, LAURENT A, GENOULAZ O, GENY C, MALLARET M, SCHULLER E, STOEBNER P, SEIGNEURIN JM. Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet* 1991; **337** (8745): 862–863.

- [35] PERRON H, GRATACAP B, LALANDE B, GENOULAZ O, LAURENT A, GENY C, MALLARET M, INNOCENNTI P, SCHULLER E, STOEEBNER P, SEIGNEURIN JM. *In vitro* transmission and antigenicity of a retrovirus isolated from a multiple sclerosis patients. *Res Virol* 1992; **143**: 337–350.
- [36] PERRON H, GARSON JA, BEDIN F, PARANHOS-BACCALA G, KOMURIAN-PRADEL F, MALLET F, TUKE PW, VOISSET C, BLOND JL, LALANDE B, SEIGNEURIN JM, MANDRAD B and Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7583–7588.
- [37] PINKEL D, STRAUME T, GRAY JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 2934–2938.
- [38] PLATTNER R, HEEREMA NA, PATIL SR, HOWARD-PEEBLES PN, PALMER CG. Characterization of seven DA/DAPI-positive bisatellited marker chromosomes by *in situ* hybridization. *Hum Genet* 1991; **87**: 290–296.
- [39] RAUCH A, PFEIFFER RA, TRAUTMANN U, LEIHR T, ROTT HD, ULMER R. A study of ten small supernumerary (marker) chromosomes identified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Clin Genet* 1992; **42**: 84–90.
- [40] ROONEY DE, CZEPULKOWSKI BH. Human cytogenetics: A practical approach. *Oxford University Press, London* 1986.
- [41] SACHS ES, VAN HEMEL JO, DEN HOLLANDER JC, JAHODA MGJ. Marker chromosomes in a series of 10,000 prenatal diagnoses. Cytogenetic and follow-up studies. *Prenat Diagn* 1987; **7**: 81–89.
- [42] SAWICKA A, LEŚNIEWICZ R, ZAWADA M, STASIEWICZ-JAROCKA B, MIDRO AT. Rodzinne występowanie złożonej translokacji chromosomowej t(1;4;10)(q21.3;q27;q26.1) zweryfikowanej metodą FISH. *Gin Pol* 1998; **69**(4): 200–206.
- [43] SCHINZEL A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. W. de Gruyter. Berlin, New York 1984: 620–622.
- [44] SCHWARZACHER HG, WOLF U. Methods in human cytogenetics. Springer, New York, Heidelberg, Berlin 1974.
- [45] SOROUR E, THOMPSON P, MACMILLAN J, UPADHYAYA. Inheritance of CMT1A duplication from a mosaic father. *J Med Genet* 1995; **32**: 483–485.
- [46] STASIEWICZ-JAROCKA B, RĄCZKIEWICZ B, KOWALCZYK D, ZAWADA M, MIDRO AT. Ryzyko genetyczne rodzin obciążonych translokacją chromosomową t(1;2)(q42;q33)GTG, RHG, FISH. *Gin Pol* (w druku).
- [47] STENGEL-RUTKOWSKI S, STENE J, GALLANO P. Risk estimates in balanced parental reciprocal translocations. Analysis of 1120 pedigrees. Monographie des Annales de Genetique. *Expansion Scientifique Française*, 1988.
- [48] STETTEN G, BLAKEMORE KJ, COURTER AM, COSS CA, JABS EW. Prenatal identification of small mosaic markers of different chromosomal origin. *Prenat Diagn* 1992; **12**: 83–91.
- [49] THERKELSEN AJ, NIELSEN A, KOLVRAA S. Localisation of the classical DNA satellites on human chromosomes as determined by primed *in situ* labelling (PRINS). *Hum Genet* 1997; **100**: 322–326.
- [50] THOMPSON MW, MC INNES RR, WILLARD HF. Genetics in Medicine. V wyd. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto 1994.
- [51] VALENTIJN LJ, BOLHUIS PA, ZORN I, HOGENDIJK JE, VAN DEN BOSCH N, HENSSELS GW, STANTON Jr VP, HOUSMAN DE, FISCHBECK KH, ROSS DA, NICHOLSON GA, MEERSHOEK EJ, DAUWERSE HG, VAN OMMEN GJB, BAAS F. The peripheral myelin gene PMP22/GAS-3 is duplicated in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* 1992; **1**: 166–170.

- [52] VOGEL W, AUTENRIETH M, SPEIT G. Detection of bromodeoxyuridine incorporation in mammalian chromosomes by a bromodeoxyuridine antibody. I. Demonstration of replication patterns. *Hum Genet* 1986; **72**: 129–132.
- [53] WARBURTON D. Outcome of cases of *de novo* structural rearrangements diagnosed at amniocentesis. *Prenat Diagn* 1984; **4**: 69–80.
- [54] YUNIS JJ. High resolution human chromosomes. *Science* 1976; **191**: 1268–1270.
- [55] ZAWADA M. Identyfikacja chromosomów markerowych pochodzenia autosomalnego i diagnostyka aberracji struktury chromosomów metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Praca doktorska. Zakład Genetyki Człowieka PAN, Akademia Medyczna, Poznań 1996.
- [56] ZAWADA M, KOŁOWSKA J, WOJDA A, JARMUŻ M, LIMON J, KRAJEWSKA-WALASEK M, CHRZANOWSKA K, LATOS-BIELEŃSKA A. Identyfikacja ośmiu chromosomów markerowych pochodzenia autosomalnego metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). *Gin Pol* 1997; **68** (2): 124–130.

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

CYTOGENETYCZNE BADANIA NOWOTWORÓW CZŁOWIEKA – PŁASKONABŁONKOWY RAK KRTANI*

CYTOGENETIC ANALYSIS OF HUMAN NEOPLASMS SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE LARYNX

Maciej KUJAWSKI, Krzysztof SZYFTER

Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Streszczenie: Badania cytogenetyczne nowotworów wskazują na obecność aberracji chromosomowych w większości ludzkich nowotworów. Metody cytogenetyki dostarczyły bardzo dużo informacji, zwłaszcza o aberracjach chromosomowych nowotworów układu krwiotwórczego i limfatycznego, jednak w przypadku guzów litych metodyka ta napotkała wiele trudności związanych z biologiczną strukturą guza. Wymusiło to opracowanie nowych technik cytogenetyki molekularnej, do których zalicza się przede wszystkim różne odmiany fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) oraz porównawczej hybrydyzacji genomów (CGH). Badania własne dostarczyły informacji dotyczących zmian na poziomie chromosomowym w płaskonabłonkowym raku krtani, które uzyskano przy wykorzystaniu techniki CGH. Do najważniejszych obserwacji należały: zwiększony udział delecji materiału genetycznego w grupie pierwotnych guzów tworzących przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych; obecność ilościowych oraz jakościowych różnic materiału genetycznego między guzami pierwotnymi i korespondującymi z nimi przerzutami.

Słowa kluczowe: cytogenetyka, aberracje chromosomowe, rak krtani, porównawcza hybrydyzacja genomów (CGH)

Summary: Cytogenetic analysis of human neoplasms indicated common incidence of chromosomal aberrations. Complex data, mostly concerning neoplasms of haemopoietic and lymphatic systems, have been derived using „classic” cytogenetic methodology. Because of biological structure of solid tumors and problems in preparations and analysis of this kind of material, new techniques have been developed. Among the others, florescent *in situ* hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH) became the most important methods. The data described by our group concerned chromosomal aberrations in squamous cell carcinoma of the larynx. To determine copy number changes in analysed group comparative genomic hybridization has been used. The most striking observations were: a remarkable

*Praca finansowana w ramach grantu KBN Nr 4P05A 019 16

incidence of deletions of genetic material in the group of larynx carcinomas with local lymph node metastases, and an occurrence of cytogenetic differences between primary tumors and their metastases.

Keywords: cytogenetics, chromosomal aberrations, squamous cell carcinoma of the larynx, comparative genomic hybridization.

W Polsce w ciągu ostatnich 30 lat obserwuje się stały wzrost liczby zachorowań i zgonów spowodowanych nowotworami krtani, z czym wiąże się fakt, iż od połowy lat osiemdziesiątych należymy do krajów największego ryzyka w Europie [26]. Dynamika wzrostu wynosiła przy tym średnio 3% rocznie dla zachorowalności oraz 4,7% rocznie dla umieralności. Z danych statystycznych zebranych w roku 1994 wynika, że w Polsce rak krtani stanowił 4,8% wszystkich zarejestrowanych zachorowań na nowotwory wśród mężczyzn (czyli 12,6/100 000), a odpowiedzialny był za spowodowanie 3,6% zgonów (czyli 7,5/100 000) [25]. Zarówno zapadalność, jak i umieralność na nowotwory krtani jest przy tym 10–15-krotnie wyższa w populacji męskiej niż w populacji kobiet.

W zdecydowanej większości przypadków jako czynnik etiologiczny raka krtani określa się nałogowe palenie tytoniu oraz towarzyszące mu nadużywanie alkoholu [24]. Palenie tytoniu wiąże się tu z ekspozycją na bardzo wiele substancji chemicznych o stwierdzonych właściwościach kancerogennych, do których należą przede wszystkim cykliczne węglowodory aromatyczne, takie jak benzo(a)piren.

Nie można również przy powstawaniu nowotworów krtani wykluczyć udziału szeroko rozumianych czynników środowiskowych, np. ekspozycji na mutageny chemiczne związanej z aktywnością zawodową. W odniesieniu do wieku stwierdzono, że największą liczbę przypadków zachorowania na nowotwory krtani obserwuje się w grupie osób między 50.–70. rokiem życia.

Przyjmuje się, że nowotwór jest wynikiem dynamicznego procesu akumulacji wielu zmian genetycznych. O skomplikowaniu tego zjawiska i jego wieloczynnikowej etiogenezie świadczy fakt, iż mimo poniesionych nakładów i wysiłków badawczych od dziesiątków już lat nie uporano się z tą chorobą.

Zanim jeszcze nastąpi rozwój nowotworu złośliwego, już w fazie przerostu dysplastycznego i dalej nowotworu typu *carcinoma in situ* (czyli nieinwazyjnego) zaobserwować można pierwsze zmiany genetyczne w „skali makro”. Dotyczą one rearanżacji materiału genetycznego, co objawia się w postaci aberracji chromosomowych, które zwykle się łączy raczej z późniejszymi fazami onkogenezy. W miarę rozwoju nowoczesnych technik cytogenetycznych zaczęto odnotowywać zmiany chromosomowe już we wczesnych fazach rozwoju choroby nowotworowej [21].

Obok wszechstronnie stosowanych technik genetyki molekularnej do badań nowotworów stosuje się nadal metody cytogenetyki klasycznej, które opierają się na badaniach w mikroskopie świetlnym chromosomów metafazowych uzyskanych drogą hodowli komórek tkanki badanej *in vitro*. Warunkiem przeprowadzenia skutecznych badań cytogenetycznych jest uzyskanie odpowiedniej liczby płytek me-

tafazowych nadających się do wybarwienia i dalszej analizy mikroskopowej. W przypadku nowotworów układu krwiotwórczego i limfatycznego w większości przypadków uzyskanie odpowiedniej liczby i jakości płytek metafazowych nie stanowiło problemu; świadczy o tym ich zdecydowana przewaga w bazach danych zbierających informacje o wynikach badań cytogenetycznych dotyczących nowotworów. Na drugim biegunie pod względem skuteczności badań cytogenetycznych znajdują się guzy lite, które stanowią znaczącą część wszystkich nowych zachorowań na nowotwory na świecie. Głównymi przyczynami tego stanu rzeczy były i są nadal trudności metodologiczne wynikające z charakteru samego materiału badawczego, jakim są guzy nowotworowe, często o zwartej budowie, z możliwymi rejonami martwiczymi czy też zrogowaceniami (dotyczy to zwłaszcza późniejszych faz rozwoju guza). Problemem może okazać się również niski indeks mitotyczny danego guza, co zmusza do silniejszego „pobudzania” komórek do podziałów w warunkach hodowli *in vitro*. Niezbędne okazało się zastosowanie odpowiednich technik izolacji komórek nowotworowych z masy guza, takich jak trawienia enzymatyczne nie uszkadzające powierzchni komórek przy wykorzystaniu enzymów – na przykład kolagenazy [15]. Również ciągłe poszukiwania odpowiednich podłoży hodowlanych wzbogacanych dodatkiem płodowej surowicy cielęcej lub innymi substancjami wspomagającymi wzrost komórek nowotworowych, takimi jak insulina czy też EGF [9], pozwoliły na zwiększenie skuteczności poszukiwań pierwotnych aberracji chromosomowych, odpowiadających zmianom rzeczywiście występującym w guzie nowotworowym, a nie wynikającym z warunków hodowli.

Niewątpliwą zaletą badań wykorzystujących cytogenetykę klasyczną jest możliwość jednoczesnej analizy wszystkich chromosomów i wyodrębnienia wszystkich rodzajów aberracji chromosomowych, często bardzo skomplikowanych, mogących obejmować cały kariotyp. Strategia ta jest jednak obarczona wieloma ograniczeniami i wadami, do których zaliczyć należy wspomniane wyżej problemy z samą naturą badanego materiału (zwłaszcza guzów litych), a także często selektywny wzrost *in vitro* poszczególnych populacji komórek guza nowotworowego, możliwość wykrywania zaburzeń nie mniejszych od 10 Mpz (milionów par zasad), częste trudności w identyfikacji pochodzenia chromosomów markerowych.

Z pomocą wyżej opisanej metodzie przyszły techniki cytogenetyki molekularnej, które rozwinęły się z cytogenetyki klasycznej przez włączenie nowoczesnych technik, głównie opartych na wykorzystaniu barwników fluorescencyjnych. Wyróżnić w niej można trzy główne modyfikacje fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. *fluorescent in situ hybridization*, FISH).

W pierwszej z nich jako „podłoże” do hybrydyzacji wykorzystuje się płytkę metafazową uzyskaną najczęściej w wyniku przeprowadzonej hodowli *in vitro* tkanki nowotworowej. Do DNA odpowiednio przygotowanej płytki metafazowej hybrydują określone, interesujące nas sondy, będące wyznakowanymi odcinkami DNA komplementarnymi z poszczególnymi odcinkami chromosomów. Dobranie odpo-

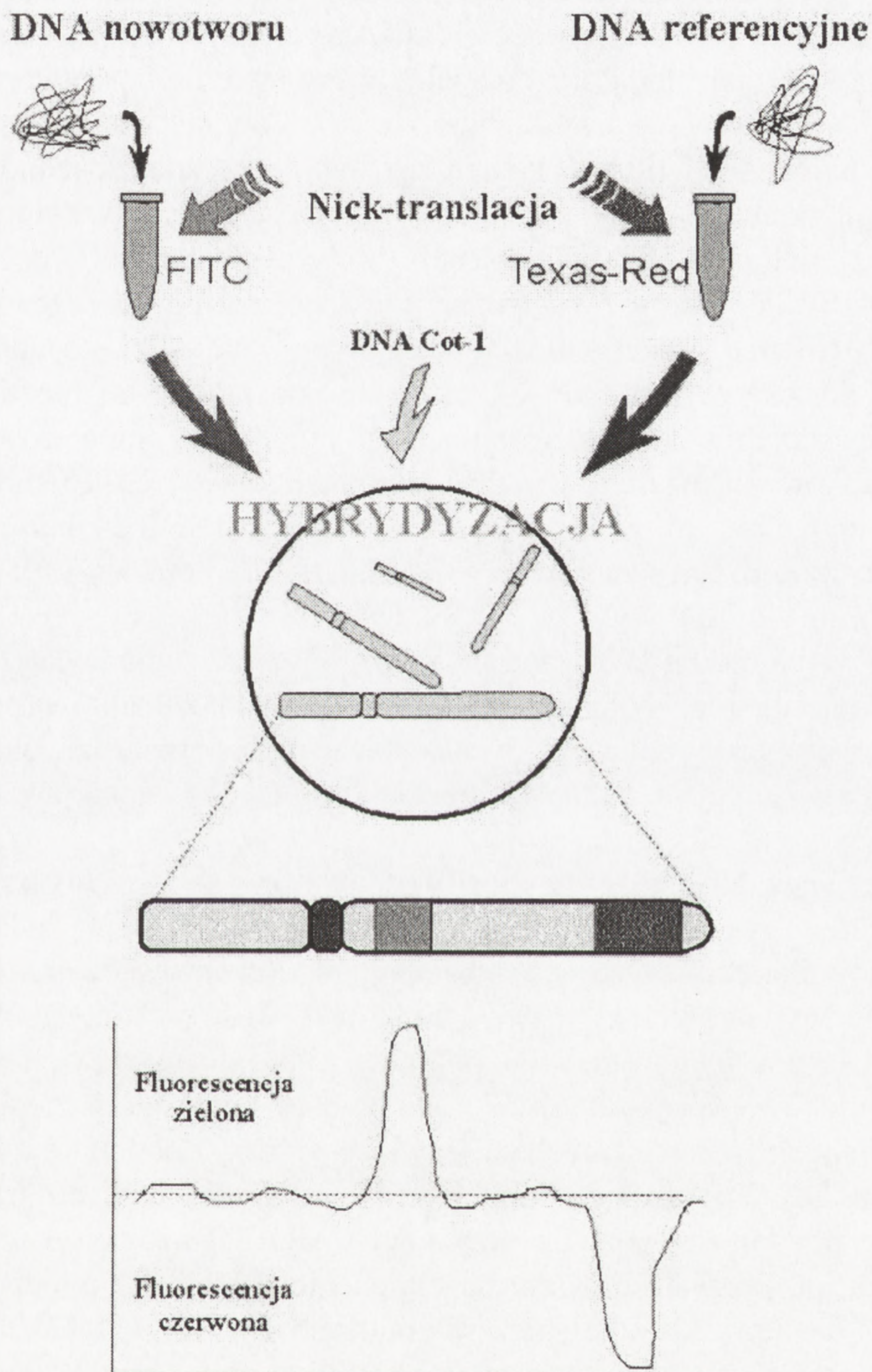
wiednich sond pozwoli przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego określić miejsce hybrydyzacji, a co za tym idzie, zidentyfikować aberrację, której nie dało się jednoznacznie określić wykorzystując cytogenetykę klasyczną i mikroskop świetlny. Dotyczy to przede wszystkim małych translokacji i tzw. chromosomów *Double Minutes* oraz chromosomów markerowych o nieznanym pochodzeniu. Szczególnie obiecująca wydaje się odmiana techniki FISH, np. tzw. *multicolor FISH*, **M-FISH** bazująca na 24 sondach malujących (ang. *painting probes*), pokrywających całe chromosomy, co po jednoczesnej ich hybrydyzacji pozwala na identyfikację niemal wszystkich możliwych aberracji chromosomowych [19,20]. Poważną wadą niniejszej metody są jednak ogromne koszty nie tylko odczynników (wyznakowane mieszaninami 6 różnych fluorochromów fragmenty DNA dla wszystkich chromosomów), ale również systemu komputerowego sprzężonego z mikroskopem.

Drugą metodą opartą na FISH jest **interfazowa fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ***. W przeciwieństwie do poprzedniej metody, hybrydyzacja sond następuje do jąder komórkowych tkanek przygotowanych w postaci skrawków mikroskopowych (o grubości od kilku do kilkudziesięciu μm) lub zawiesin komórkowych uzyskanych drogą trawienia enzymatycznego i utrwalania. Interfazowa FISH służy przede wszystkim do wykrywania aberracji liczby chromosomów, a także pewnych translokacji, wiążących się zazwyczaj z powstaniem fuzji genów, np. fuzji genów *BCR-ABL* charakterystycznej dla niektórych nowotworów układu krwiotwórczego. [22].

Zaletą obydwu opisanych modyfikacji FISH jest ich wysoka rozdzielczość, która w przypadku FISH do płytek metafazowych wynosi od 1 do 3 Mbp, natomiast dla FISH interfazowy waha się między 100 Kbp a 1 Mbp. Ograniczeniem (poza M-FISH) jest tu jednak liczba sond i co za tym idzie fragmentów chromosomów, które można przebadać w jednym eksperymencie (nie więcej niż kilka).

Zupełnie inne podejście do analizy aberracji chromosomowych reprezentuje opracowana na początku lat dziewięćdziesiątych **porównawcza hybrydyzacja genomów** (ang. *comparative genomic hybridization*, CGH) [10]. Głównym jej założeniem jest jednoczesna i kompetytywna hybrydyzacja dwu wyznakowanych różnymi fluorochromami pul DNA wyizolowanych z komórek nowotworowych oraz komórek niezmiennych (prawidłowych) do normalnej płytki metafazowej (patrz schemat metody, rys. 1). DNA wyznakowuje się w reakcji nick-translacji, w czasie której następuje wbudowanie zmodyfikowanych na dwa różne sposoby nukleotydów:

- skoniugowane z biotyną lub digoksygeniną w strategii znakowania pośredniego wymagającego później użycia odpowiednich, znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał,
- skoniugowane z fluoresceiną (FITC) lub fluorochromem Texas Red w przypadku znakowania bezpośredniego nie wymagającego dalszych zabiegów.



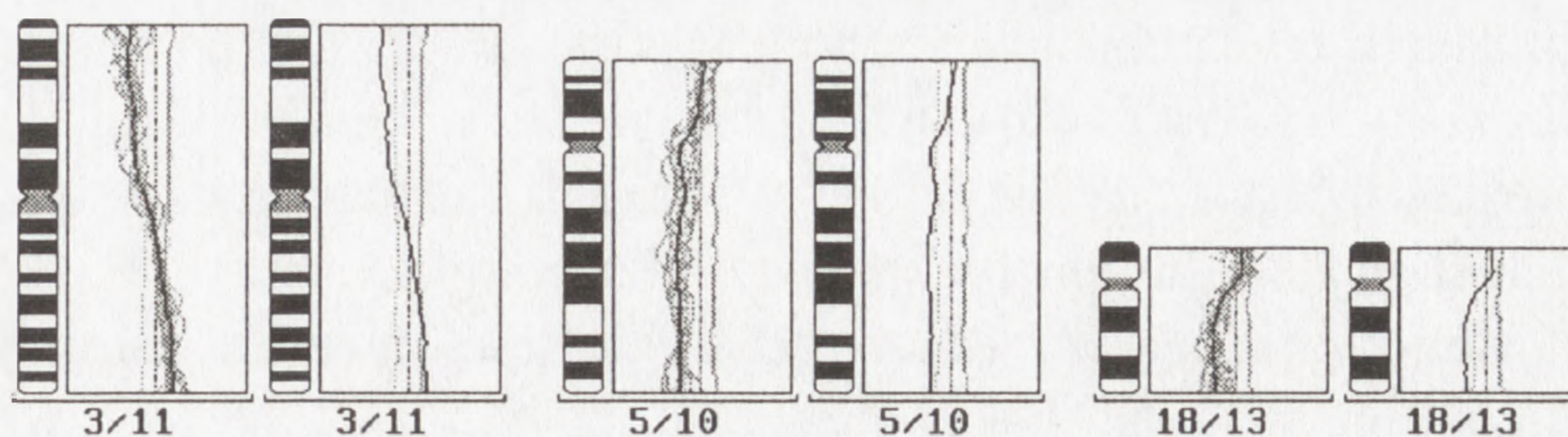
RYSUNEK 1. Schemat metody porównawczej hybrydyzacji genomów (CGH). DNA pochodzące z nowotworu i tkanki prawidłowej (referencyjne) znakowane jest w odrębnych reakcjach nick-translacji fluorochromami, odpowiednio FITC i Texas-Red. Dalej mieszaninę obydwóch DNA oraz ludzkiego DNA typu Cot-1 hybryduje się do płytek metafazowych uzyskanych od zdrowego dawcy. Obrazy mikroskopowe chromosomów dla poszczególnych fluorochromów zbierane są przez komputer, który dalej oblicza wzdłuż każdego analizowanego chromosomu stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej, określając w ten sposób zmiany liczby kopii DNA w poszczególnych jego odcinkach

Po przeprowadzeniu hybrydyzacji do płytek metafazowych mieszaniny DNA wyznakowanych odpowiednio fluorochromem o zielonej fluorescencji (DNA nowotworowe) i czerwonej fluorescencji (DNA referencyjne, otrzymane z normalnych komórek dawcy o tej samej płci co analizowany materiał nowotworowy) podlegają one dalej analizie przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w zestaw odpowiednich filtrów i kamerę cyfrową podłączoną do jednostki komputera. Dla każdej płytki metafazowej kolekcjonowane są trzy obrazy w kolorach czerwonym (Texas-Red), zielonym (FITC) i niebieskim otrzymywanym dzięki dobarwianiu barwnikiem DAPI, który umożliwia późniejsze rozpoznanie poszczególnych chromosomów. Kolejnym etapem po ułożeniu kariotypu jest analiza stosunku fluorescencji czerwonej do zielonej na całej długości chromosomów, co możliwe jest po zastosowaniu specjalnie w tym celu napisanego programu komputerowego. Aby uniknąć przypadkowych rezultatów, najczęściej analizuje się 10–16 chromosomów dla każdego przypadku, a wynikiem końcowym jest uśredniony kariogram przedstawiający stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej dla wszystkich przeanalizowanych chromosomów (rys. 2).

Do ciekawych modyfikacji metody należą doświadczenia wykorzystujące do hybrydyzacji mieszaninę DNA z kilku guzów od różnych pacjentów (przy zachowaniu ilościowych proporcji) pozwalających wskazać bądź potwierdzić charakterystyczne i najczęściej występujące zmiany w liczbie kopii DNA w analizowanej grupie [12].

Niewątpliwą zaletą CGH jest możliwość analizy aberracji w obrębie wszystkich chromosomów wykonując pojedynczą hybrydyzację. Kolejną zaletą metody jest możliwość uniknięcia często niemożliwych do przeprowadzenia badań z wykorzystaniem cytogenetyki klasycznej, a także możliwość wykorzystania archiwalnych zbiorów materiału tkanki guza, dysponując pełną informacją o przebiegu leczenia i losach pacjentów. Wadą niniejszej metody jest z kolei ograniczenie się wyłącznie do aberracji niezrównoważonych, czyli wiążących się z nadmiarem lub niedoborem fragmentów DNA. Wszelkie aberracje zrównoważone, czyli np. translokacje i inwersje, nie poddają się analizie przy użyciu CGH. Rozdzielczość CGH jest stosunkowo niska, pozwala bowiem na określenie delecji nie mniejszych niż około 10 Mbp [2] i amplifikacji również w granicach 10 Mbp [11,17]. Problematiczne okazało się również badanie zmian w obrębie chromosomu Y, który ze względu na bardzo duży udział heterochromatyny blokowanej w czasie hybrydyzacji zwykle nie jest poddawany dalszej analizie zmian stosunku fluorescencji czerwonej do zielonej.

Występowanie nieprawidłowych chromosomów obserwowanych w podziałach mitotycznych komórek nowotworowych stwierdzono praktycznie w przypadku wszystkich ludzkich nowotworów [18]. Również nowotwory należące do grupy HNSCC (ang. *head and neck squamous cell carcinoma*), do których zalicza się płaskonabłonkowego raka krtani, nie stanowiły tu wyjątku. W tej grupie nowotworów



RYSUNEK 2. Przykładowe wykresy stosunków fluorescencji zielonej do czerwonej dla chromosomów 3, 5 i 18. Lewy reprezentuje wykresy dla pojedynczych analizowanych chromosomów, natomiast prawy wartość średnią

często obserwowano złożone aberracje strukturalne wraz z liczbowymi, wykrywanymi zarówno przy wykorzystaniu cytogenetyki klasycznej [5,8,9], jak i molekularnej [3,4]. Najczęściej utracie ulegały ramiona 3p, 8p, 9p, 11q, 13q, 14p, 15p i 18q, co sugerowało obecność w nich genów supresorowych w wymienionych regionach, a istotnych dla procesu nowotworzenia w przypadku HNSCC. Do regionów chromosomowych ulegających najczęściej amplifikacji należą 1q, 3q, 8q, 15q, a także bardzo specyficzny dla HNSCC rejon 11q13 [1]. Stwierdzono również, że nowotwory jamy ustnej, gardła środkowego i niskiego reprezentują aberracje bardziej kompleksowe niż nowotwory krtani [8].

W bardzo wielu przypadkach nowotworów głowy i szyi u mężczyzn obserwowano ubytki materiału genetycznego dotyczące chromosomu Y obejmujące cały chromosom [9,23], co miało by tłumaczyć zwiększoną w porównaniu z kobietami zachorowalność na nowotwory HNSCC wśród mężczyzn. Tym niemniej często postuluje się, iż delecje w obrębie chromosomu Y są raczej wynikiem zaawansowanego wieku pacjenta niż trwałą aberracją w nowotworze [7].

Występowanie tak złożonych aberracji chromosomowych w znaczącej liczbie przeanalizowanych przypadków sugeruje, iż rozwój nowotworów z grupy HNSCC jest wynikiem akumulacji zmian genetycznych w czasie całego procesu onkogenezy.

Badania własne nad obecnością aberracji chromosomowych skoncentrowane były na określeniu aberracji charakterystycznych dla procesu powstawania przerzutów, do czego wykorzystano technikę porównawczej hybrydyzacji genomów. Pierwsze doświadczenia prowadzone były na materiale guzów pierwotnych uwzględniając przy tym informacje o obecności przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych [13]. Druga część doświadczeń przeprowadzona była na guzach pierwotnych i odpowiadających im przerzutach, co dostarczyło informacji na temat różnic jakościowych lub/i ilościowych dotyczących aberracji chromosomowych [14].

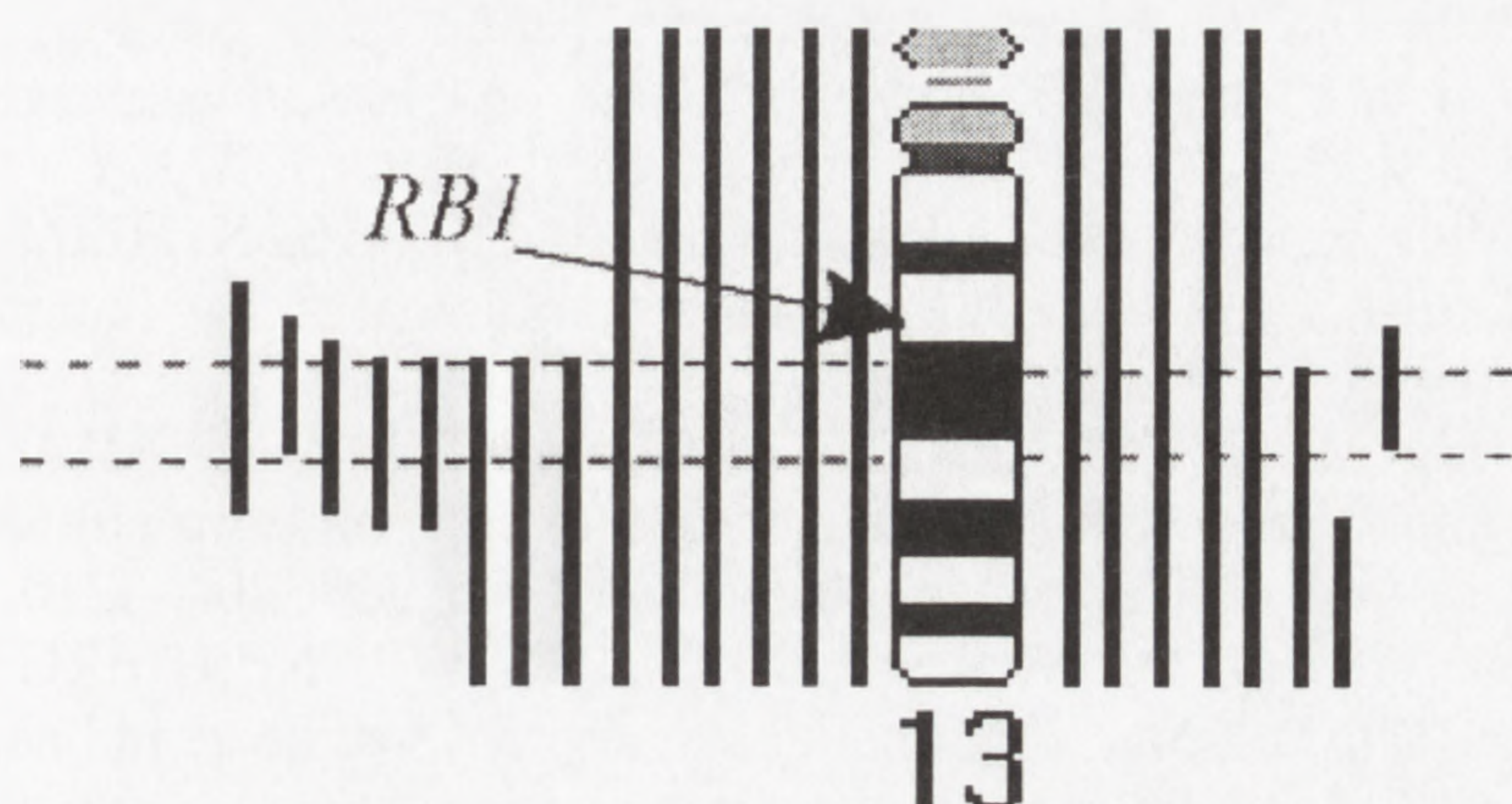
Zmiany ilościowe DNA w obrębie poszczególnych chromosomów w pierwszej grupie stwierdzono w 60,0% analizowanych przypadków z niewielką przewagą

wśród guzów tworzących przerzuty. Aberracje najczęściej obserwowane były w postaci amplifikacji (chromosomy 3q, 8q i 9q) oraz delecji materiału genetycznego (chromosomy 18q, 3p, 5q i 13q).

Najważniejszą obserwacją poczynioną w tej części badań była statystycznie istotna przewaga delecji materiału genetycznego w pierwotnych guzach płaskonabłonkowego raka krtani tworzącego przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych, w stosunku do guzów pierwotnych nie tworzących przerzutów. Fakt ten zwraca uwagę na znaczenie utraty materiału genetycznego w rozwoju choroby nowotworowej i jej wpływ na późniejsze rokowania.

Analiza guzów pierwotnych raka krtani i odpowiadających im przerzutów wykazała obecność aberracji chromosomowych w około 90% przypadków w obydwu podgrupach. Amplifikacje materiału genetycznego najczęściej obserwowano w obrębie ramion chromosomowych 3q, 11q, 5p oraz 1q, które stwierdzono w przynajmniej 30% analizowanych przypadków (guzów pierwotnych lub przerzutów). Obok amplifikacji w badanym materiale odnotowano obecność licznych delecji materiału genetycznego obejmujących wiele różnych regionów chromosomowych. Do najczęściej występujących należały delecje w obrębie ramion chromosomów 3p, 13q, 5q, 9p i 4p, które wystąpiły co najmniej w 30% jednej z analizowanych podgrup (guzów pierwotnych bądź odpowiadających im przerzutów). Szczególnie istotne okazały się delecje w obrębie chromosomu 13, które znacznie częściej obserwowano w przerzutach (różnica istotna statystycznie). W scharakteryzowanych w niniejszej pracy guzach pierwotnych raka krtani delecje w większości przypadków obejmowały cały chromosom 13, podczas gdy w odpowiadających im przerzutach znaczącą część stanowiły utraty tylko fragmentu chromosomu (rys. 3). Najmniejszy wspólny region ulegający utracie obejmował odcinek 13q21-q22 i nie pokrywał się z locus genu *RB1* (w 5 na 14 przypadków były to regiony ramienia q bliższe części telomerowej). Obserwacje te są częściowo w zgodzie z danymi uzyskanymi przez Bockmühl i wsp. [4], którzy w połowie przeanalizowanych przypadków nowotworów głowy i szyi stwierdzili delecje w rejonie 13q21-q31. Również w przypadku drobnokomórkowego raka płuc wskazano na delecje materiału genetycznego obejmujące prążek 13q21 w ponad połowie analizowanych przypadków [16]. Niestety nie określono jak dotąd żadnych potencjalnych genów supresorowych mających swe loci we wspomnianym wyżej rejonie chromosomowym.

Wykorzystując technikę interfazowej fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* przebadano guzy pierwotne i odpowiadające im przerzuty, czego celem było określenie aberracji liczbowych chromosomu Y w komórkach nowotworowych (dane niepublikowane). Brak chromosomu Y stwierdzono w około 80% przypadków zarówno w grupie guzów pierwotnych, jak i przerzutach. Utraty chromosomu Y obserwowano wcześniej w bardzo wielu przypadkach nowotworów głowy i szyi u mężczyzn [9, 23]. Utrata chromosomu Y obserwowana była również w innych nowotworach, np. przełyku [6], co wskazuje na istotność tej zmiany dla procesu nowotworzenia.



RYSUNEK 3. Delecje materiału genetycznego w obrębie chromosomu 13 zaobserwowane w guzach pierwotnych (linie po prawej stronie) i przerzutach raka krtani (linie po lewej stronie). Linie przerywane wskazują minimalny wspólny region delecji; *RBI* – locus genu białka retinoblastomy

Tym niemniej często postuluje się, iż delecje w obrębie chromosomu Y są raczej wynikiem zaawansowanego wieku pacjenta niż trwałą aberracją w nowotworze [7]. Z drugiej jednak strony obserwowano również zjawisko normalnego występowania chromosomu Y w zdrowych komórkach otaczających komórki nowotworowe raka przetyku pozbawionych chromosomu Y [6], co trudno jest wyjaśnić wyłącznie zaawansowanym wiekiem pacjentów.

Badania własne potwierdzają szeroko znany fakt, że występowanie aberracji chromosomowych w tkance nowotworów człowieka jest bardzo często obserwowanym zjawiskiem. Istotność tego zjawiska dla rozwoju choroby nowotworowej w przypadku raka krtani, jak również innych nowotworów głowy i szyi potwierdzają liczne badania w wielu ośrodkach naukowych. Z kolei rozwój nowoczesnych technik cytogenetyki molekularnej przyczynił się zdecydowanie do pogłębiania wiedzy o znaczeniu aberracji chromosomowych, zwłaszcza w przypadku guzów litych i co za tym idzie biologicznych procesów przebiegających w obrębie guza nowotworowego, takich jak powstawanie lokalnych i odległych przerzutów.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AKERVALL J, JIN Y, WENNERBERG J, ZÄTTERSTRÖM E, KJELLÉN E, MERTENS F, WILLÉN R, MANDAHL N, HEIM S, MITELMAN F. Chromosomal abnormalities involving 11q13 are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer* 1995; **76**: 853–859.
- [2] BENTZ M, PLESCH A, STILGENBAUER S, DOHNER H, LICHTER P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; **21**: 172–175.
- [3] BOCKMÜHL U, PETERSEN S, SCHMIDT S, WOLFG, JAHNKE V, DETEL M, PETERSEN I. Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and nonmetastasizing primary head and neck carcinomas. *Cancer Res* 1997; **57**: 5213–5216.
- [4] BOCKMÜHL U, SCHWENDEL A, DIETEL M, PETERSEN I. Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 1996; **56**: 5325–5329.

- [5] CAREY T, VAN DYKE D, WORSHAM M. Nonrandom chromosome aberrations and clonal populations in head and neck cancer. *Anticancer Res* 1993; **13**: 2561–2568.
- [6] HUNTER S, GRAMLICH T, ABBOTT K, VARMA V. Y chromosome loss in esophageal carcinoma: An *in situ* hybridization study. *Genes Chromosom Cancer* 1993; **8**: 172–177.
- [7] JIN C, JIN Y, WENNERBERG J, AKERVALL J, GRENTHE B, MANDAHL N, HEIM S, MITELMAN F, MERTENS F. Clonal chromosome aberrations accumulate with age in upper aerodigestive tract mucosa. *Mut Res* 1997; **374**: 63–72.
- [8] JIN Y, MERTENS F, JIN C, AKERVALL J, WENNERBERG J, GORUNOVA J, MANDAHL N, HEIM S, MITELMAN F. Nonrandom chromosome abnormalities in short-term cultured primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1995; **55**: 3204–3210.
- [9] JIN Y, MERTENS F, MANDAHL N, HEIM S, OLEGARD C, WENNERBERG J, BJÖRKLUND A, MITELMAN F. Chromosome abnormalities in eighty-three head and neck squamous cell carcinomas: influence of culture conditions on karyotypic pattern. *Cancer Res* 1993; **53**: 2140–2146.
- [10] KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, SUDAR D, RUTOVITZ D, GRAY J, WALDMAN F, PINKEL D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; **258**: 818–821.
- [11] KALLIONIEMI OP, KALLIONIEMI A, PIPER J, ISOLA J, WALDMAN F, GRAY J, PINKEL D. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; **10**: 231–243.
- [12] KNUUTILA S, ARMENGOL G, BJÖRKQVIST AM, EL-RIFAI W, LARRAMENDY M, MONNI O, SZYMANSKA J. Comparative genomic hybridization study on pooled DNAs from tumors of one clinical-pathological entity. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; **100**: 25–30.
- [13] KUJAWSKI M, AALTO Y, JASKULA-SZTUL R, SZYFTER W, SZMEJA Z, SZYFTER K, KNUUTILA S. DNA copy number losses are more frequent in primary larynx tumors with lymph node metastases than in tumors without metastases. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; **114**: 31–34.
- [14] KUJAWSKI M, SARLOMO-RIKALA M, GABRIEL A, SZYFTER K, KNUUTILA S. Recurrent DNA copy number losses associated with metastasis of larynx carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; **26**: 253–257.
- [15] LIMON J, DAL CIN P, SANDBERG A. Application of long-term collagenase disaggregation for the cytogenetic analysis of human solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; **23**: 305–313.
- [16] PETERSEN I, LANGRECK H, WOLFG, SCHWENDEL A, PSILLE R, VOGT P, REICHEL M, RIED T, DIETEL M. Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p. *Br J Cancer* 1997; **75**: 79–86.
- [17] PIPER J, RUTOVITZ D, SUDAR D, KALLIONIEMI OP, WALDMAN F, GRAY J, PINKEL D. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995; **19**: 10–26.
- [18] SOLOMON E, BORROW J, GODDARD A. Chromosome aberrations in cancer. *Science* 1991; **254**: 1153–1160.
- [19] SPEICHER M, GWYN BALLARD S, WARD D. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996; **12**: 368–375.
- [20] TOSI S, GIUDICI G, RAMBALDI A, SCHERER S, BRAY-WARD P, DIRSCHERL L, BIONDI A, KEARNEY L. Characterization of the human myeloid leukemia-derived cell line GF-D8 by multiplex fluorescence *in situ* hybridization, subtelomeric probes, and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; **24**: 213–221.
- [21] WEBER R, SCHEER M, BORN I, JOOS S, COBBERS J, HOFELE C, REIFENBERGER G, ZOLLER J, LICHTER P. Recurrent chromosomal imbalances detected in biopsy material from oral premalignant and malignant lesions by combined tissue microdissection universal DNA amplification and comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1998; **153**: 295–303.
- [22] WELLS S, PHILLIPS C, FARHI D. Detection of BCRab1 in Acute Leukemia by Molecular and Cytogenetic Methods. *Mol Diagn* 1996; **1**: 305–313.

- [23] WORSHAM M, WOLMAN S, CAREY T, ZARBO R, BENNINGER M, VAN DYKE D. Common clonal origin of synchronous primary head and neck squamous cell carcinomas: analysis by tumor karyotypes and fluorescence *in situ* hybridization. *Human Pathology* 1995; **26**: 251–261.
- [24] ZATONSKI W, BECHER H, LISSOWSKA J, WAHRENDORF J. Tobacco, alcohol, and diet in the etiology of laryngeal cancer: a population-based case-control study. *Cancer Causes Control* 1991; **2**: 3–10.
- [25] ZATONSKI W, TYCZYŃSKI J. Nowotwory złośliwe w Polsce w 1994 roku. Warszawa 1997.
- [26] ZATONSKI W, TYCZYŃSKI J, DIDKOWSKA J. Nowotwory złośliwe krtani w Polsce w latach 1963–1989. *Otolaryngologia* 1992; **46**: 203–210.

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

ZAGADNIENIA METODYCZNE W ANALIZIE MOLEKULARNEJ RAKA KRTANI

METHODOLOGICAL ASPECTS OF MOLECULAR ANALYSIS IN LARYNGEAL CANCER

Krzysztof SZYFTER^{1, 2}, Paweł JAŁOSZYŃSKI¹, Maciej KUJAWSKI¹,
Renata JASKUŁA-SZTUL¹, Małgorzata JARMUŻ¹, Jacek BANASZEWSKI²,
Wojciech BIEGALSKI³, Piotr DĄBROWSKI², Marzena GAJECKA¹,
Wojciech GOLUSINSKI², Sebastian KITA³, Maciej PABISZCZAK²

¹Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, ²Klinika Otolaryngologii AM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ³Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Otolaryngologii AM w Poznaniu

Streszczenie: Przedmiotem pracy jest przedstawienie technik, które znalazły zastosowanie w biologii molekularnej i analizie genetycznej tytonio-zależnego raka krtani. Spośród technik molekularnych omówiono: elektroforezę pojedynczych nici DNA (*comet assay*), analizę radiochemiczną adduktów kancerogen:DNA, metody stosowane do badania uszkodzeń genów *P53* i *P16* (mutacje, utrata heterozygotyczności) oraz histochemiczne wykrywanie markerów proliferacji komórek. Cytogenetykę klasyczną i molekularną (FISH, CGH) wykorzystano do badań niestabilności chromosomowej, aberracji chromosomów i niezrównoważenia liczby kopii DNA. Opisano metodykę genotypowania defektów genów enzymów detoksykacyjnych opartą na technice PCR. Postuluje się konieczność stosowania szerokiego zestawu technik do badań poznawczych. Niektóre z technik stwarzają nadzieje na zastosowania aplikacyjne.

Słowa kluczowe: rak krtani, techniki molekularne, cytogenetyka, czynnik genetyczny

Summary: The review presents techniques applied in molecular biology and genetic background of tobacco smoke-associated laryngeal cancer. The following molecular techniques are described: comet assay, a radiochemical method of carcinogen:DNA adduct identification, and methods used for an analysis of defects of tumour suppressor genes (mutations, loss of heterozygosity) and histochemical detection of markers of cell proliferation. Classical and molecular cytogenetics were applied to estimate chromosome instability, chromosome aberrations and imbalance in DNA copy number. PCR-based genotyping is presented as a useful technique to estimate a significance of genetic factor in relation to defects of detoxifying enzymes. The main message is a need of application of a broad spectrum of

molecular and cellular techniques in order to understand the molecular basis of laryngeal cancer. Certain techniques seem to be promising in diagnostic attempts.

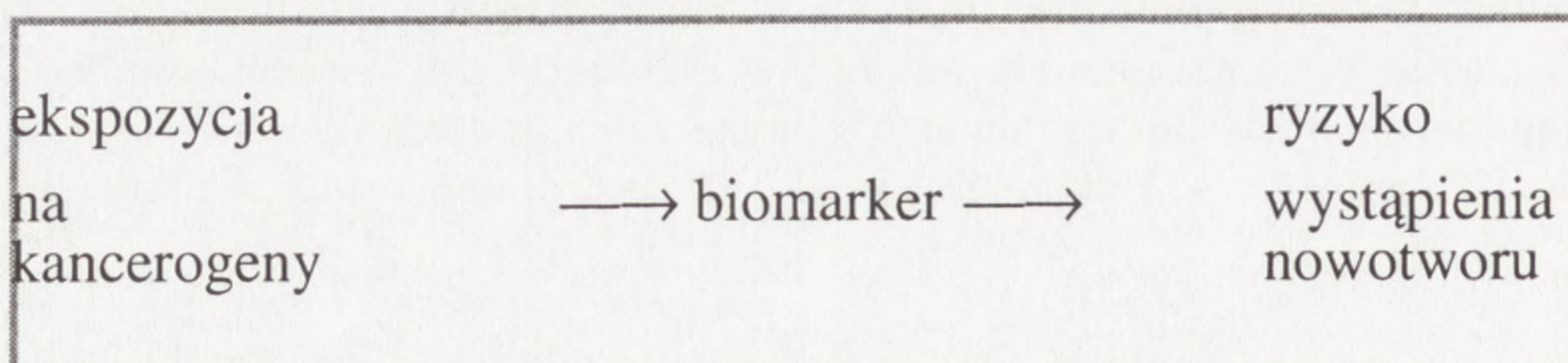
Key words: laryngeal cancer, molecular methods, cytogenetics, genetic factor

Badania biologii molekularnej i analiza genetyczna raka krtani mają w założeniu wesprzeć wysiłki klinicystów w zakresie profilaktyki i terapii raka krtani. Oczekuje się zatem, że niezależnie od doskonalenia technik diagnostycznych i terapeutycznych postęp prac poznawczych ostatecznie przyniesie korzyści aplikacyjne. Zainteresowanie rakiem krtani wynika z faktu, że choroba ta stanowi w Polsce poważny problem medyczny i społeczny [32,55,56], na który składają się następujące aspekty:

- badania epidemiologiczne dowodzące, że rak krtani stanowi istotne zagrożenie u mężczyzn, zajmując w ostatnich latach 3–5 pozycję wśród najczęściej występujących chorób nowotworowych [54,56],
- współczynniki zachorowalności (13,6/100 000) i śmiertelności (7,4/100 000) mężczyzn z powodu raka krtani w Polsce w roku 1994 najwyższe w Europie, a w latach 1963–1993 wykazujące stałą tendencję wzrostową [32,56],
- powyższe współczynniki znajdujące odpowiednik w postaci liczby sprzedanych papierosów, umieszczają Polskę (w przeliczeniu na osobę) na pierwszym miejscu w światowym rankingu palenia papierosów [55],
- odsetek pięcioletniego przeżycia po podjęciu terapii przeciwnowotworowej pozostający na niskim poziomie w porównaniu z innymi chorobami nowotworowymi [19],
- cechująca raki głowy i szyi niska podatność na działanie cytostatyków, praktycznie uniemożliwiająca stosowanie chemioterapii [4,19].

Celem artykułu jest przedstawienie technik biologii molekularnej i genetyki stosowanych w badaniach podstawowych nad rakiem krtani. Własne wieloletnie zaangażowanie w tej dziedzinie [52] pozwala na wymierną ocenę potencjału poznawczego, zakresu stosowania i jego ograniczeń oraz pracochłonności poszczególnych technik.

Niezależnie od kierowania starań w stronę oczekiwań klinicystów, badania prowadzono w kategoriach epidemiologii molekularnej [45], której istotę badań stanowi poszukiwanie relacji między ekspozycją na czynniki kancerogenne a ryzykiem genetycznym wystąpienia choroby nowotworowej w ogóle, wystąpienia przerzutów i/lub nawrotu choroby. Kategorią mierzalną w badaniach epidemiologów molekularnych jest biomarker, którym może być dowolna zmienna chemiczna, fizyczna,



komórkowa lub fizjologiczna pojawiająca się w wyniku ekspozycji na kancerogeny i mająca wpływ na dalszy przebieg procesu kancerogenezy. Przyjęło się stosowanie podziału na biomarkery molekularne, cytogenetyczne i fizjologiczne.

Techniki, którymi posługiwaliśmy się w naszych badaniach, były nakierowane na dwa pierwsze typy biomarkerów, to znaczy odpowiadające uszkodzeniom DNA (poziom molekularny) i aberracjom chromosomów (poziom komórkowy i subkomórkowy). Ponadto prowadzono badania nad polimorfizmem genetycznym w celu wykazania roli czynnika genetycznego, co wymagało dodatkowego zestawu technik badawczych.

1. MATERIAŁ DO BADAŃ

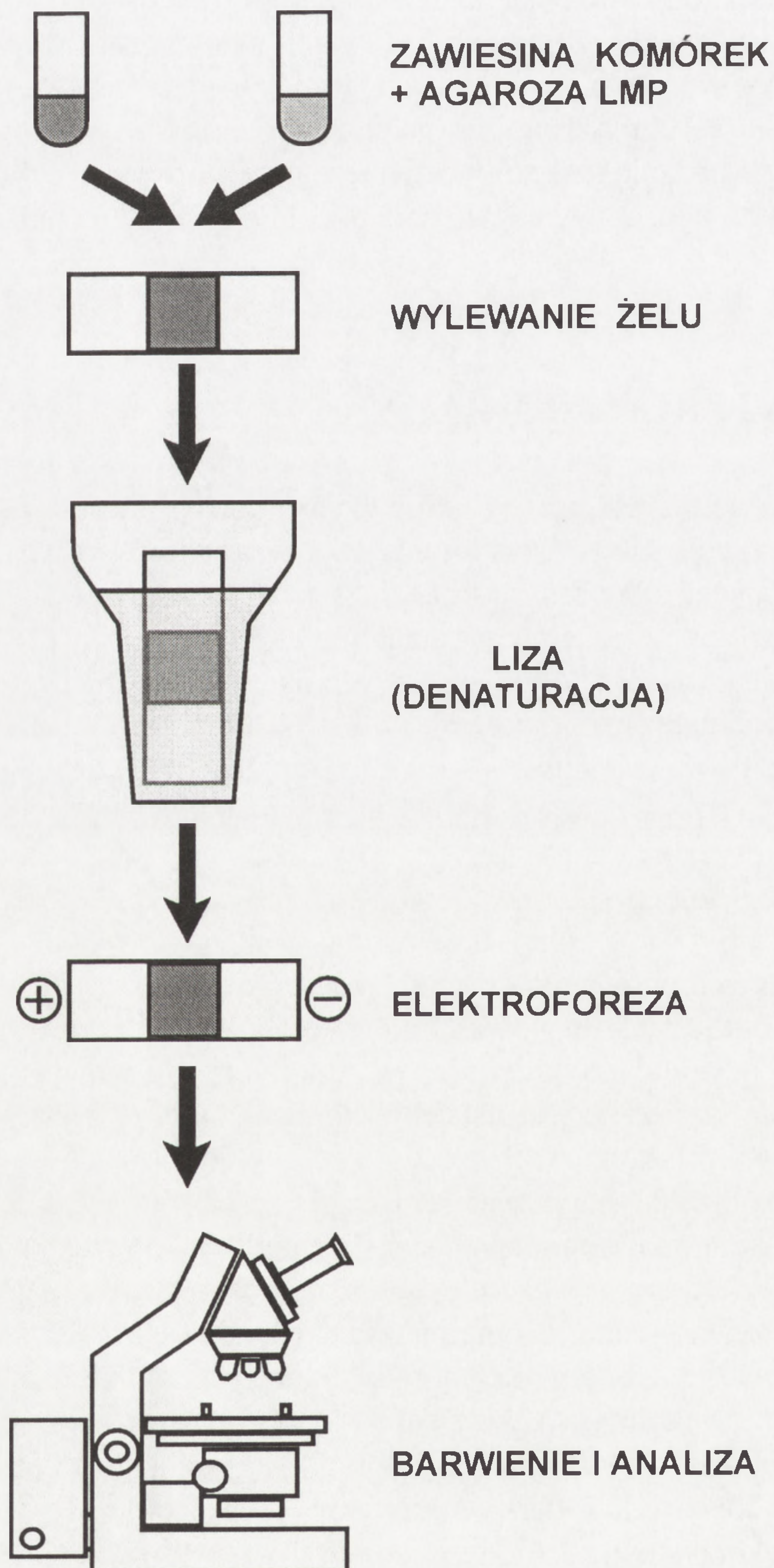
Podstawowym źródłem materiału biologicznego do badań są próbki tkanek pacjentów uzyskiwane w trakcie leczenia. Nowotwory krtani, zwłaszcza zaawansowane, są usuwane chirurgicznie w zabiegu określanym mianem laryngektomii. Podczas zabiegu wycinany jest nie tylko guz, ale także margines prawidłowej tkanki otaczającej. W przypadku wystąpienia przerzutów miejscowych usuwa się także okoliczne węzły chłonne szyi. Następnie materiał poddawany jest analizie histopatologicznej. Pobiera się również miejscowo małe wycinki błony śluzowej gardła, ale te próbki na ogół nie są przeznaczane do badań podstawowych, bowiem całkowicie służą celom diagnostycznym.

Inne źródło materiału biologicznego stanowi krew żylna pacjentów, z której wydziela się populację leukocytów lub bardziej homogeną frakcję limfocytów. Zaznaczyć należy, że w kategoriach epidemiologii molekularnej komórki krwi obwodowej stanowią zastępcze źródło materiału wobec komórek błony śluzowej krtani, które mają charakter komórek docelowych dla kancerogenów dymu tytoniowego. Dla poprawności wnioskowania konieczne jest ustalenie korelacji między występowaniem biomarkera w zastępczych komórkach modelowych i w komórkach docelowych. Problem ten będzie pojawiał się jeszcze w dalszej części opracowania.

Najczęściej pierwszym krokiem analizy molekularnej jest izolacja DNA z komórek. DNA można izolować z materiału wcześniej zabezpieczonego, jak też ze świeżo pobranego. Badania cytogenetyczne, przynajmniej w zakresie cytogenetyki klasycznej, wymagają przeprowadzenia hodowli komórkowej lub krótkiej inkubacji komórek. Hodowla komórek guzów litych jest zabiegiem dosyć trudnym technicznie m.in. ze względu na trudności z zachowaniem sterylności [31] i dlatego część danych pochodzi z analizy hodowanych *in vitro* limfocytów krwi obwodowej.

Do badań poznawczych wykorzystuje się też linie komórkowe wyprowadzone z nowotworów krtani.

2. ANALIZA MOLEKULARNA



RYSUNEK 1. Schemat postępowania podczas analizy pęknięć cząsteczki DNA techniką *comet assay*

2.1. Pęknięcia nici DNA

Od kilku lat ogromną popularnością cieszy się technika elektroforezy pojedynczych komórek (ang. *comet assay*) jako względnie prosta i wiarygodna metoda oceny genotoksyczności na podstawie detekcji pęknięć łańcucha DNA [23]. Schemat kolejnych etapów wykonania *comet assay* przedstawiono na rysunku 1. Komórki eksponowane wcześniej na czynnik genotoksyczny unieruchamia się w mikrożelu agarozowym i poddaje lizie, mającej na celu usunięcie większości białek. Następnym etapem jest elektroforeza DNA pozostałego w miejscach „zastopienia” komórek. Nici DNA migrują w kierunku anody z prędkością proporcjonalną do liczby pęknięć, co przy stałym czasie elektroforezy daje zróżnicowanie odległości migracji DNA w zależności od stopnia jego uszkodzenia. Efekt powyższej procedury obserwuje się korzystając z mikroskopu fluorescencyjnego, po wybar-

wieniu żelu barwnikiem fluorescencyjnym. DNA nie zawierający pęknięć nie migruje i pozostaje w miejscu zatopienia komórki, co widoczne jest w postaci kolistych obiektów; natomiast uszkodzony DNA tworzy „ogony”, nadające obserwowanym obiektom charakterystyczny kształt komet. Analizy ilościowej dokonuje się przeważnie na podstawie parametrów geometrycznych i intensywności fluorescencji różnych elementów komety, korzystając najczęściej z komputerowych systemów analizy obrazu.

Technika *comet assay* pozwala na ocenę genotoksyczności dymu tytoniowego lub jego składników [39]. Technika tą posługiwano się także w celu oceny właściwości genotoksycznych leków przeciwnowotworowych oraz podatności komórek na ich działanie (analiza chemiooporności) [2].

Możliwe jest także odwrotne podejście badawcze, to znaczy w miejsce indukowania uszkodzeń DNA *in vitro* przez modelowe kancerogeny monitoruje się usuwanie uszkodzeń z komórek eksponowanych uprzednio *in vivo* na środowiskowe kancerogeny. Takie podejście pozwala na ocenę potencjału naprawczego DNA [7,14]. Zainteresowanie tym problemem wynika z faktu, że defekty mechanizmów naprawy DNA są czynnikami zwiększającymi ryzyko wystąpienia i rozwoju chorób nowotworowych. Ocena wydajności usuwania uszkodzeń DNA jest wykorzystywana do analizy polimorfizmu genetycznego w zakresie indywidualnego zróżnicowania potencjału naprawczego DNA komórek (osób).

Doświadczenie własne w zakresie stosowania techniki *comet assay* zostało dotychczas wykorzystane do problematyki biologii raka krtani w nieznacznym stopniu. Uzyskano bardzo wstępne wyniki na temat indywidualnego zróżnicowania usuwania uszkodzeń DNA indukowanych przez benzo(a)piren i H_2O_2 . Wybór obu modelowych mutagenów wiązał się z kancerogennością dymu tytoniowego, wynikającą m.in. z ekspozycji na policykliczne węglowodory aromatyczne i reaktywne formy tlenu.

2.2. Oznaczanie adduktów kancerogen:DNA

Większość kancerogenów wchodzi w interakcję z DNA (bezpośrednio lub w wyniku aktywacji metabolicznej) i modyfikuje jego strukturę przez tworzenie trwałych połączeń znanych jako addukty kancerogen:DNA. Kancerogeny chemiczne jako czynniki elektrofilowe atakują miejsca nukleofilowe w cząsteczce DNA i wytwarzają wiązania kowalencyjne. Preferencyjnym miejscem wiązania kancerogenów są egzogenne ugrupowania ($-NH_2$ i $-OH$) puryn oraz pozycje C8 i N7 pierścienia pięcioczłonowego guanozyny. Addukty kancerogen:DNA uchodzą za wyznacznik biologicznie efektywnej dawki kancerogenu, która uległa związaniu przez komórki DNA [34].

Ze względu na znaczenie adduktów DNA w procesie mutagenezy opracowano szereg metod ich oznaczania. Ogólnie techniki te można podzielić na: radiochemiczne,

immunologiczne i spektrofluorymetryczne. W najpowszechniejszym użyciu jest technika ^{32}P -*postlabelling* (nie ma propozycji polskiej nazwy), której głównym atutem jest uniwersalność, tzn. możliwość zastosowania tej metody do analizy różnych rodzajów adduktów DNA [35,51].

Podstawowe etapy postępowania (rys. 2) to:

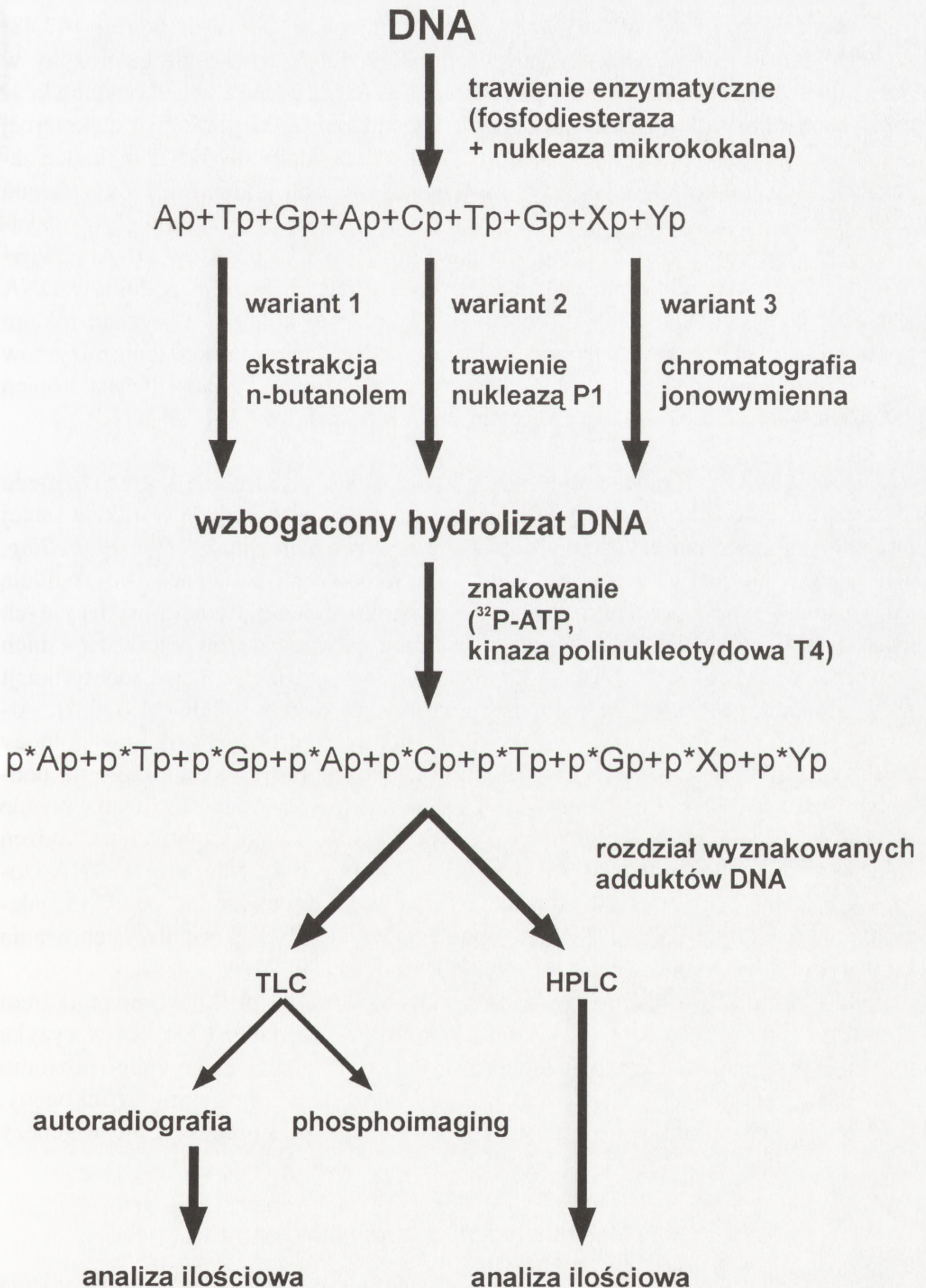
- enzymatyczne trawienie DNA do nukleozydo-3'-fosforanów,
- częściowa eliminacja prawidłowych nukleotydów z hydrolizatu DNA,
- wprowadzenie w pozycję 5' drugiej grupy fosforanowej zawierającej ^{32}P przy udziale kinazy polinukleotydowej z faga T4,
- rozdział chromatograficzny znakowanych nukleotydów,
- analiza jakościowa i ilościowa rozdzielonych adduktów DNA.

W istocie istnieje szereg adaptacji techniki ^{32}P -*postlabelling* przystosowanych to detekcji i oznaczeń różnych typów adduktów. Poszczególne warianty różnią się od siebie najczęściej na etapie wzbogacenia hydrolizatu DNA w pulę modyfikowanych nukleotydów, czyli adduktów DNA. I tak ekstrakcja hydrolizatu DNA n-butanolem jest szczególnie przydatna do analizy adduktów policyklicznych węglowodorów aromatycznych, a trawienie P1 nukleazą zaleca się podczas analizy adduktów amin aromatycznych. Równoległe zastosowanie obu wariantów pozwala na uzyskanie poglądu odnośnie względnego udziału obu typów adduktów, ponieważ ich współwystępowanie ma miejsce właśnie w wyniku ekspozycji na dym tytoniowy. Dalej, do analizy alkilowanych pochodnych guanozyny wprowadza się etap podczyszczania hydrolizatu DNA na kolumnie z silnym jonowymieniaczem.

Ostatnie etapy techniki ^{32}P -*postlabelling* obejmują rozdział i oznaczenia ilościowe adduktów DNA. Twórcy techniki zaproponowali rozdział za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na polietyloiminocelulozie (PEI-celuloza). Metodyka ta, stosowana w dalszym ciągu, znalazła alternatywę w stosowaniu wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC), która znajduje coraz powszechniejsze uznanie ze względu na większe możliwości w zakresie identyfikacji poszczególnych adduktów DNA.

Również oznaczanie ilościowe adduktów DNA wykonuje się obecnie w dwojaki sposób. Metoda oryginalna jest oparta na pomiarze radioaktywności poszczególnych plam na chromatogramie wizualizowanych uprzednio za pomocą autoradiografii. Nowszą technikę stanowi *phosphoimaging*, łącząca w jednym etapie analizę jakościową i ilościową z jednoczesnym drastycznym skróceniem czasu niezbędnego do przeprowadzenia tego etapu pracy.

Niedogodnością techniki ^{32}P -*postlabelling* jest względnie wysoka cena i niska możliwość oceny prawidłowości postępowania w trakcie wieloetapowego eksperymentu.



RYSUNEK 2. Etapy detekcji i analizy ilościowej adduktów kancerogen:DNA techniką ³²P-postlabelling

W badaniach własnych przy wykorzystaniu techniki ^{32}P -*postlabelling* [47,48] wykazaliśmy obecność aromatycznych adduktów DNA i N7-alkiloguanozyny w prawidłowej śluzówce krtani, w komórkach nowotworu krtani i w leukocytach krwi obwodowej chorych na raka krtani. Zgodnie z postulatami epidemiologii molekularnej określiliśmy relację między poziomem alkilowanych adduktów DNA w tkance zastępczej i docelowej, wykazując liniową zależność obu zmiennych. Ze względu na duże różnice wyników indywidualnych podjęto próbę określenia wpływu czynników zewnętrznych i osobniczych na poziom ilościowy adduktów DNA. Stwierdzono, że pierwszoplanowym czynnikiem kształtującym poziom adduktów DNA jest ekspozycja czynna na dym tytoniowy. W dalszej kolejności wyznacznikami poziomu są: płeć i czynnik genetyczny zidentyfikowany przez uszkodzenia enzymów odpowiedzialnych za detoksykację kancerogenów. Mniejsze znaczenie ma stopień zaawansowania choroby nowotworowej i wiek pacjentów [46].

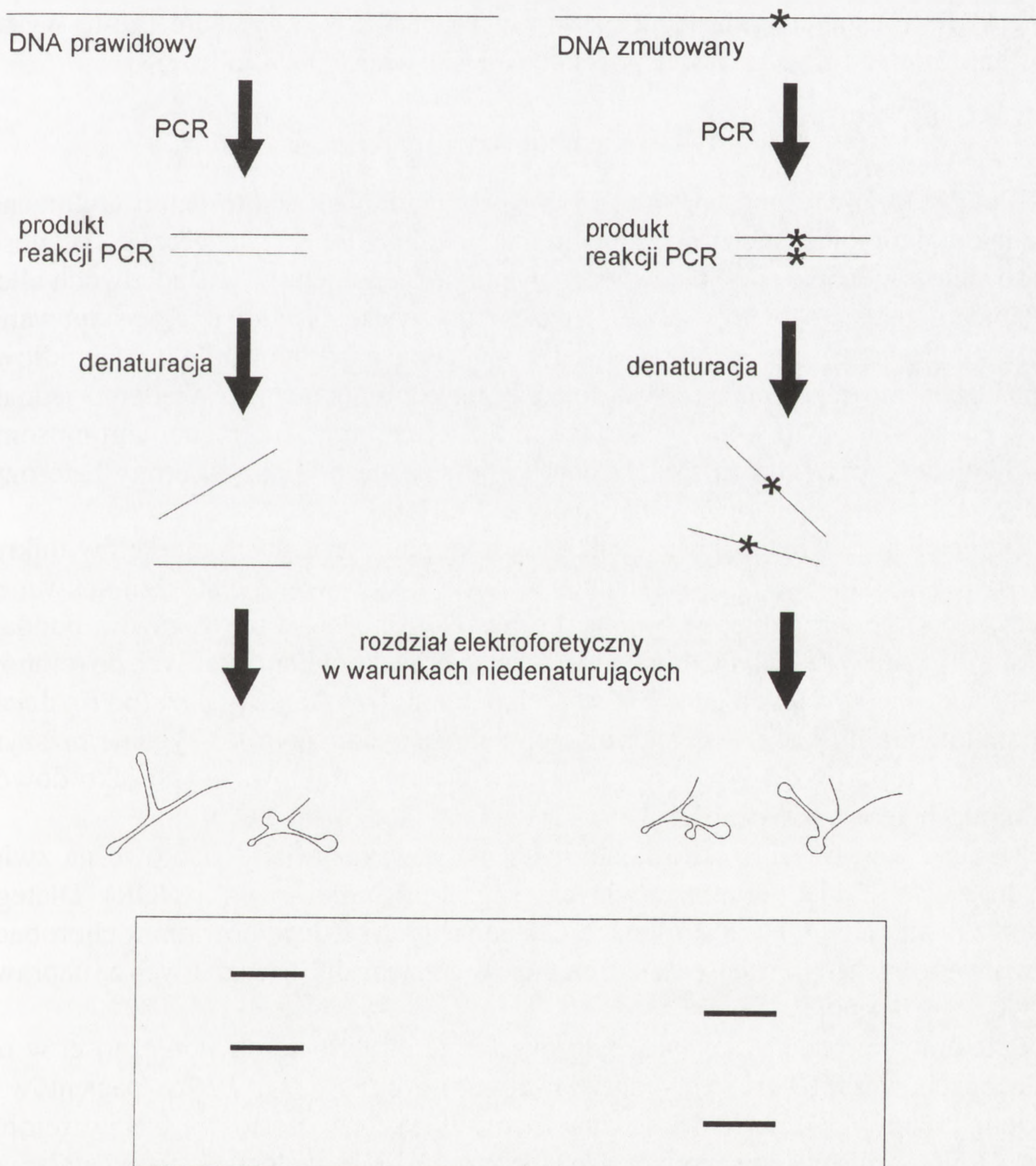
Detekcja oksydacyjnych modyfikacji zasad DNA jest trudniejsza ze względu na możliwość dodatkowego wprowadzenia tego rodzaju uszkodzeń w trakcie samej procedury. Przedstawiono szereg propozycji opartych na technice ^{32}P -*postlabelling*, ale na ogół nie znalazły one potwierdzenia w dalszych badaniach lub znajdują się jeszcze w fazie optymalizacji [11]. Większość ustaleń na temat oksydacyjnych uszkodzeń cząsteczki DNA uzyskano za pomocą dwóch metod. Pierwszą z nich jest rozdział hydrolizatu DNA za pomocą chromatografii gazowej i identyfikacji rozdzielonych związków za pomocą spektroskopii masowej (GC-MS) [12]. Alternatywnym rozwiązaniem jest rozdział produktów hydrolizy DNA przy pomocy chromatografii cieczowej (HPLC) i identyfikacja wybranych składników na podstawie detekcji elektrochemicznej [1]. Ta ostatnia metoda była stosowana przede wszystkim do analizy 8-oksoguaniny. Obie drogi analizy oksydacyjnych uszkodzeń DNA wymagają kosztownego wyposażenia aparaturowego. Niemniej w DNA izolowanym z guzów i prawidłowej tkanki krtani zidentyfikowaliśmy sześć oksydacyjnych pochodnych zasad DNA, a w trakcie badań jest analiza współwystępowania aromatycznych adduktów i oksydacyjnych modyfikacji DNA.

Jednocześnie stwierdzono, że addukty DNA, które są doskonałym markerem ekspozycji na kancerogeny, wykazują ograniczoną przydatność do oceny ryzyka rozwoju i progresji raka krtani. Tłumaczy się to faktem analizy całkowitego poziomu uszkodzeń genomowego DNA, podczas gdy tylko określone regiony (onkogeny, geny supresorowe) aktywnie uczestniczą w uruchamianiu procesu kancerogenezy [3].

2.3. Analiza mutacji wybranych genów

Stwierdzenie kończące powyższy akapit stało się punktem wyjścia do podjęcia badań nad mutacjami genu *P53*. Produkt białkowy tego genu wchodzi w skład

kompleksu białek kontrolujących cykl komórkowy. Strukturę genu *P53* wyznacza 11 eksonów, w których wykryto liczne mutacje w nowotworach głowy i szyi. Zdecydowana większość wykrytych mutacji zlokalizowano w rejonie obejmującym eksony 5–8 [42]. Dlatego typowa analiza mutacji w genie *P53* jest nakierowana na ten właśnie rejon. Za pomocą reakcji PCR z wykorzystaniem serii starterów odpowiadającym sekwencjom w obrębie tych eksonów amplifikuje się fragmenty genu *P53*. Otrzymane fragmenty poddaje się elektroforezie w warunkach nie denaturujących, pozwalających na wykrycie różnic szybkości migracji zależnych od



RYSUNEK 3. Detekcja mutacji DNA za pomocą techniki analizy polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA

konformacji jednoniciowych fragmentów DNA. Ten etap dał nazwę technice (rys. 3) znanej jako analiza polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (ang. *single-strand conformation polymorphism* – SSCP). Dopełnieniem analizy jest sekwencjonowanie fragmentów DNA o nietypowej migracji i porównaniu ich sekwencji ze znaną sekwencją „dzikiego” genu *P53*.

Zastosowanie techniki PCR/SSCP pozwoliło na ustalenie miejsc szczególnie często ulegających mutacjom (ang. *hot-spots*) w kodonach: 220, 245, 246 i 248. Niektóre z tych mutacji można było powiązać z ekspozycją na policykliczne węglowodory aromatyczne i N-nitrozoaminy obecne w dymie tytoniowym. Badania własne potwierdziły te ustalenia, ale jednocześnie wykazały także względnie częste występowanie mutacji T→A, której pochodzenia nie udało się ustalić [57].

2.4. Utrata heterozygotyczności

Mutacje genowe mogą prowadzić do nieprawidłowej ekspresji lub utworzenia produktu, który jest nietrwały lub niefunkcjonalny. Pojęcie heterozygotyczności stosowane w genetyce do opisu występowania jednego genu w postaci dwóch alleli w kancerogenezie nabiera bardziej zawężonego znaczenia i dotyczy występowania obok zmutowanego genu prawidłowej kopii genu na drugim allelu. Prawidłowa kopia genu może rekompensować funkcję genu zmutowanego. Wiadomo jednak, że w chorobach nowotworowych często ma miejsce utrata fragmentu chromosomu zawierającego prawidłową formę genu, co jest znane pod nazwą utraty heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity* – LOH) [37].

Do detekcji LOH stosuje się analizę wysoko polimorficznych markerów mikrosatelitarnych. Mikrosatelity występują w postaci motywów powtórzeń sekwencji dwu-, trój- i czteronukleotydowych. Próbkę DNA uzyskiwaną z guzów poddaje się amplifikacji w reakcji PCR przy udziale primerów komplementarnych do rejonów w obrębie analizowanych genów lub w ich pobliżu. Uzyskanie prążka (po rozdzieleniu produktów amplifikacji w denaturującym żelu sekwencyjnym) o sygnale niższym o co najmniej 50% od sygnału prążka prawidłowego traktowane jest jako dowód na utratę heterozygotyczności.

Mutacje w rejonach mikrosatelitarnych mogą wskazywać dodatkowo na zwiększoną częstość błędów replikacyjnych (ang. *replication errors* – ROR). Dlatego jako uzupełnienie LOH często stosuje się analizę tych błędów, bowiem w chorobach nowotworowych mają miejsce także mutacje w genach odpowiedzialnych za naprawę DNA typu *mismatch*.

Przedmiotem badań własnych było określenie utraty heterozygotyczności w rejonach genów supresorowych (antynowotworowych) *P53* i *P16* u pacjentów z rakiem krtani [33]. Stwierdzono znacząco zwiększoną częstość LOH w rejonie genu *P53* i nieznacznie podwyższoną częstość LOH w locus odpowiadającym genowi *P16*. Badana grupa składała się niemal wyłącznie z pacjentów w zaawan-

sowanym stadium choroby i stąd nasze ustalenia nie pozostają w sprzeczności z pracami innych autorów, którzy wykazali zwiększoną częstość LOH w locus *P16* we wczesnej fazie choroby oraz stałą, wysoką częstość LOH w locus *P53* przez cały okres choroby nowotworowej [17,38].

2.5. Detekcja markerów proliferacji komórek

W stanie podstawowym komórki nie podejmują proliferacji, pozostając we fazie G_0 cyklu komórkowego. Podjęcie cyklu komórkowego przez komórki śluzówki krtani może oznaczać początek szeregu zmian zmierzających w kierunku transformacji nowotworowej. Z tego faktu wynika znaczenie wczesnego wykrywania przechodzenia komórek w fazę proliferacji. Znane są przynajmniej dwa białka, PCNA i Ki67, których obecność świadczy o podjęciu proliferacji i stąd pełnią one rolę molekularnych markerów proliferacji. Oba białka pojawiają się w komórce poczynając od późnej fazy G_1 i są obecne podczas faz S, G_2 i M [41].

Oznaczeń białkowych markerów proliferacji dokonuje się za pomocą techniki immunohistochemicznej na skrawkach histologicznych. Komercyjnie dostępne są mysie, monoklonalne przeciwciała anty-PCNA i królicze, poliklonalne przeciwciała anty-Ki67. Przeciwciała modyfikowane biotyną wiążą się z awidyną sprzężoną z peroksydazą, która z kolei w obecności wody utlenionej doprowadza do reakcji barwnej z dwuaminobenzzydynam (DAB). Ocenę ilościową prowadzi się określając liczbę wybarwionych ziaren pod mikroskopem świetlnym [15].

W grupie 120 pacjentów z rakiem krtani oceniliśmy obecność białek PCNA i Ki67 oraz dodatkowo białka P53. Poziom białek skorelowany z postępem choroby dowiódł wzrastającego udziału komórek proliferujących w masie guza. Stwierdzenie wzrastającego ilościowo poziomu białka P53 zinterpretowano jako obecność produktu zmutowanego genu *P53*, niezdolnego do wypełniania funkcji kontroli cyklu komórkowego [16].

3. ANALIZA NA POZIOMIE KOMÓRKOWYM I SUBKOMÓRKOWYM

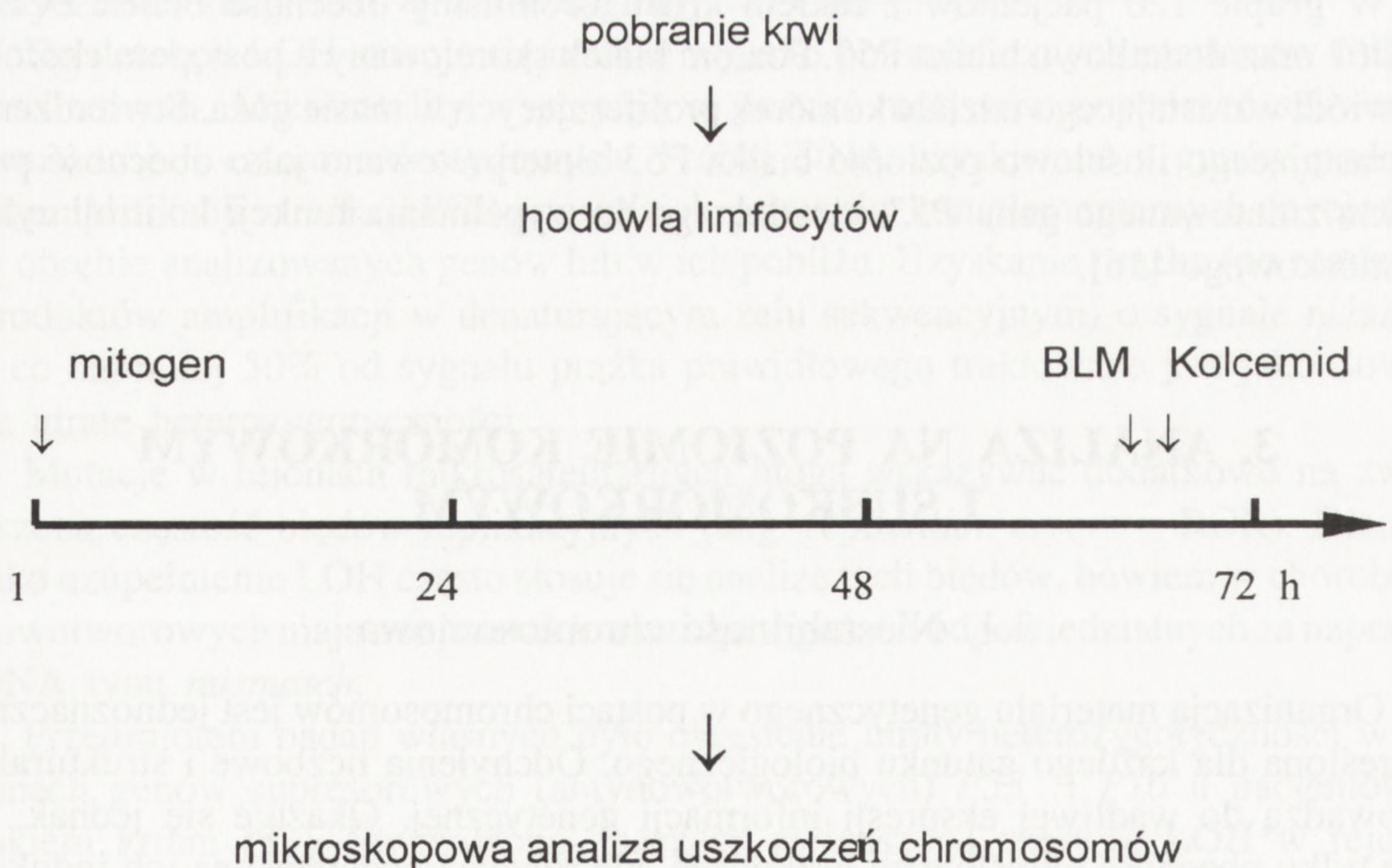
3.1. Niestabilność chromosomowa

Organizacja materiału genetycznego w postaci chromosomów jest jednoznacznie określona dla każdego gatunku biologicznego. Odchylenia liczbowe i strukturalne prowadzą do wadliwej ekspresji informacji genetycznej. Okazuje się jednak, że nie tylko obecność określonych uszkodzeń, ale również podatność na ich indukcję znana jako niestabilność chromosomowa stanowi obciążenie genetyczne i jest czynnikiem ryzyka wystąpienia chorób nowotworowych. Dodać należy, że niestabilność

chromosomowa jako cecha konstytutywna jest niezależna od takich czynników osobniczych, jak wiek i płeć [24].

W połowie lat osiemdziesiątych w zespole T.C. Hsu (M.D. Anderson Cancer Research Center, Houston, Texas) opracowano technikę liczbowej oceny niestabilności chromosomowej, która zyskała nazwę testu bleomycynowego od nazwy mutagenu zastosowanego do indukcji uszkodzeń chromosomów [20,21]. O wyborze bleomycyny znanej głównie ze stosowania w chemioterapii zdecydowało jej szerokie spektrum efektów genotoksycznych (przerwy jedno- i dwuniciowe DNA, miejsca apurynowe) i klastogennych (pęknięcie i złamania chromosomów, chromosomy koliste, izochromosomy, wymiany chromatyd siostrzanych). Efekt klastogenny pozwala uznać bleomycynę jako radiomimetyk. W rezultacie wrażliwość na bleomycynę może być traktowana szerzej jako wrażliwość na różnorodne mutageny. Test jest przeprowadzany na limfocytach krwi obwodowej, a podatność chromosomów limfocytarnych na działanie bleomycyny traktuje się jako wyznacznik podatności organizmu na mutageny.

Przeprowadzenie testu bleomycynowego (rys. 4) polega na pobraniu krwi żyłnej, założeniu hodowli *in vitro* i eksponowaniu w tych warunkach limfocytów na bleomycynę w fazie G2 cyklu komórkowego. Po 72 godzinach inkubacji hodowlę kończy się standardowo, a utrwalone chromosomy metafazowe rozkłada na podstawowe szkiełka mikroskopowe, suszy i wybarwia odczynnikiem Giemzy. Barwnik ten nie pozwala, co prawda, na identyfikację poszczególnych chromosomów, ale najlepiej



RYSUNEK 4. Ideogram zastosowania testu bleomycynowego do oceny niestabilności chromosomów

uwidacznia aberracje strukturalne. Parametrami ocenianymi w teście bleomycynowym są: liczba pęknięć chromosomów na komórkę (ang. *breaks per cell*, b/c) i odsetek komórek, w których stwierdzono obecność uszkodzeń.

Ten prosty test pozwala nie tylko na identyfikację wysokiego ryzyka genetycznego związanego z ekspozycją na kancerogeny, ale również wskazuje na podwyższone ryzyko wystąpienia nowotworów w rodzinach oraz predyspozycje do mnogich nowotworów pierwotnych bądź nowotworów wtórnych [6,43]. Wszystkie te ustalenia dotyczą chorób nowotworowych, których etiologia wiąże się z egzogenną ekspozycją na kancerogeny, a do takich należy rak krtani. Badania własne potwierdziły wcześniejsze ustalenia innych autorów odnośnie wysokiego poziomu niestabilności chromosomowej u pacjentów z rakiem krtani. Nowością było natomiast stwierdzenie związku między poziomem niestabilności chromosomowej a złośliwością histologiczną guza [10].

Kryterium niestabilności chromosomowej może nabrać szybko praktycznego znaczenia. Zdaniem części autorów hiperniestabilność chromosomowa ($b/c > 1$) winna być traktowana jako przeciwwskazanie stosowania radioterapii, prowadzącej w takich przypadkach do nadmiernego odczynu popromiennego, łącznie z powstawaniem dodatkowego ogniska nowotworowego [44].

3.2. Analiza rozmieszczenia uszkodzeń chromosomów indukowanych bleomycyną

Badania nad niestabilnością chromosomową w obrębie testu bleomycynowego nie wychodzą poza analizę ilościową. Jednakże już sami twórcy testu bleomycynowego zwrócili uwagę na nielosowe rozłożenie miejsc uszkodzanych w chromosomach limfocytów krwi obwodowej, w warunkach ekspozycji na bleomycynę *in vitro*. Stwierdzono nie tylko, że uszkodzenia chromosomów indukowane bleomycyną lokalizują się na określonych pozycjach, ale także profil rozmieszczenia uszkodzeń jest zależny od typu choroby nowotworowej [9]. Pewnym potwierdzeniem tych badań są obserwacje dotyczące nieprzypadkowego rozkładu uszkodzeń w chromosomach poddanych napromieniowaniu [22,27]. Zaznaczyć jednak należy, że istnieją doniesienia dowodzące całkowicie losowego rozmieszczenia uszkodzeń chromosomów, niezależnego od wielkości chromosomów i gęstości genów [36].

Zasadniczo procedura badania lokalizacji uszkodzeń w chromosomach różni się od opisanej w sekcji 3.1. tylko w jednym punkcie. Konieczna jest zmiana podejścia do wybarwiania chromosomów. Jak już wspomniano wyżej, jednolite wybarwienie chromosomów odczynnikami Giemzy pozwala na zakwalifikowanie chromosomów do poszczególnych grup, ale nie odróżnia ich w obrębie tych grup. Dlatego po dokonaniu ilościowej oceny aberracji chromosomowych przeprowadza się odbarwienie preparatów cytogenetycznych za pomocą roztworów wodnych etanolu o wzrastającym stężeniu i następnie prowadzi się prążkowe wybarwienie chromo-

somów. W naszych badaniach zastosowaliśmy barwienie chromosomów odczynikiem DAPI, dzięki czemu otrzymywano obraz prążkowy zbliżony do wzoru Q. W badanym materiale uszkodzenia najczęściej występowały w chromosomach pary 1, 2, 3, 5 i 7 [28].

3.3. Niezrównoważenie materiału genetycznego

W przeciwstawieniu do technik opisanych w punktach 3.1 i 3.2, gdzie przedmiotem badań są chromosomy limfocytów krwi obwodowej, analizę niezrównoważenia materiału genetycznego można prowadzić w komórkach docelowych dla danego mutagenu/kancerogenu, co oznacza prawidłową i nowotworowo zmienioną śluzówkę krtani czy materiał uzyskany z węzłów chłonnych, do których nastąpiły przerzuty.

Równoczesne występowanie większej liczby kopii pewnych odcinków DNA i utraty innych fragmentów znane jest jako niezrównoważenie materiału genetycznego. Prowadzenie badań niezrównoważenia liczby kopii DNA w chromosomach stało się możliwe dopiero z chwilą opracowania techniki znanej jako porównawcza hybrydyzacja genomów (ang. *comparative genomic hybridization*, CGH) [13]. Technika ta łączy podejście cytogenetyczne i molekularne i tym samym razem z techniką FISH, malowaniem chromosomów i innymi wchodzi w zakres pojęcia „cytogenetyka molekularna”.

Istotą techniki jest uzyskanie dwóch wyznakowanych różnymi fluorochromami próbek DNA (znakowanie prowadzi się w reakcji nicktranslacji) wyizolowanych z komórek prawidłowych i zmienionych nowotworowo. Próbki te po fragmentacji poddaje się jednoczesnej i kompetytywnej hybrydyzacji do normalnej płytki metafazowej z utrwalonymi referencyjnymi chromosomami. Wynikiem przeprowadzonej hybrydyzacji jest mikroskopowy obraz płytki metafazowej, będący rezultatem nałożenia się trzech różnobarwnych obrazów: zielonego (FITC), czerwonego (*Texas Red*) i niebieskiego (DAPI). Po ułożeniu kariotypu przeprowadzana jest analiza stosunku fluorescencji czerwonej do zielonej na całej długości chromosomów, co możliwe jest po zastosowaniu specjalnie w tym celu napisanego programu komputerowego. Aby uniknąć przypadkowych rezultatów, najczęściej analizuje się 10–16 chromosomów z każdej próby, a wynikiem końcowym jest uśredniony kariogram przedstawiający stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej dla wszystkich zbadanych chromosomów.

Za pomocą techniki CGH dokonaliśmy analizy dynamiki zmian w przebiegu raka krtani [29,30]. Stwierdzono różnice profilu niezrównoważenia materiału genetycznego pomiędzy stadium nowotworu miejscowego a stadium przerzutów miejscowych. Różnice te oznaczały przede wszystkim narastającą dezintegrację genomu DNA, co uwidaczniało się w postaci rosnącej przewagi utrat nad amplifikacją DNA. Pogłębianie się tego procesu obserwowano porównując materiał pochodzący z guzów pierwotnych i z węzłów chłonnych szyi, do których nastąpiły

przerzuty. Można zatem uznać, że kumulacja utrat materiału genetycznego towarzyszy przebiegowi choroby nowotworowej krtani (chorobom nowotworowym?). Pełne omówienie dynamiki uszkodzeń chromosomów w przebiegu raka krtani jest przedmiotem odrębnego opracowania w tym samym tomie (Kujawski i Szyfter).

3.4. Aberracje liczbowe chromosomów

Dotychczasowe badania nie doprowadziły do wykrycia aberracji liczbowych bądź strukturalnych typowych dla raka krtani. Po stronie aberracji liczbowych wskazywano jedynie na częstą utratę chromosomu Y. Ma to miejsce najpewniej tylko w komórkach nowotworowych (a więc nie w prawidłowej śluzówce krtani), ale nie ma tu jeszcze pełnego rozpoznania [26,53].

Do badania utraty chromosomu Y stosowane są dwie techniki. Pierwszą jest opisana wyżej cytogenetyka klasyczna obejmująca prążkowe wybarwienie chromosomów. Do identyfikacji chromosomu Y dobrze nadaje się wybarwienie techniką prążków Q (barwienie kwinakryną). Drugie podejście stanowi fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). Istotą tej techniki jest hybrydyzacja sond znakowanych fluorochromami do określonych miejsc chromosomowych. Dla stwierdzenia obecności chromosomu (lub jego braku) najpewniejszy wynik daje zastosowanie sondy specyficznej do rejonu centromerowego. Zalecane jest także stosowanie kontroli w postaci sondy do innego chromosomu.

Wyniki własnych badań dotyczące utraty chromosomu, w których jako kontrolę stosowano sondę specyficzną dla rejonu centromerowego chromosomu 6, znajdują się dopiero w fazie opracowania.

W badaniach cytogenetycznych łączących podejście klasyczne i molekularne pokładane są obecnie największe nadzieje na ustalenia diagnostyczne, a w tym rokownicze. Dynamika zmian profilu uszkodzeń chromosomów z możliwością przypisania określonych uszkodzeń konkretnym fazom choroby doczekała się już opracowania spójnych i przejrzystych modeli o potencjale aplikacji diagnostycznych [5].

4. ZNACZENIE CZYNNIKA GENETYCZNEGO

Przy bardzo jednoznacznie określonej etiologii raka krtani wskazującej na palenie papierosów jako element sprawczy, rolę czynnika genetycznego określa się pytaniem, dlaczego tylko część palaczy ma chorobę nowotworową [8,50]. Również w opisanych wyżej badaniach molekularnych i komórkowych w sposób niezamierzony wykazywano rolę czynnika genetycznego. Przykładowo, podczas analizy poziomu aromatycznych adduktów DNA stwierdzono ogromny rozrzut wyników indywidualnych,

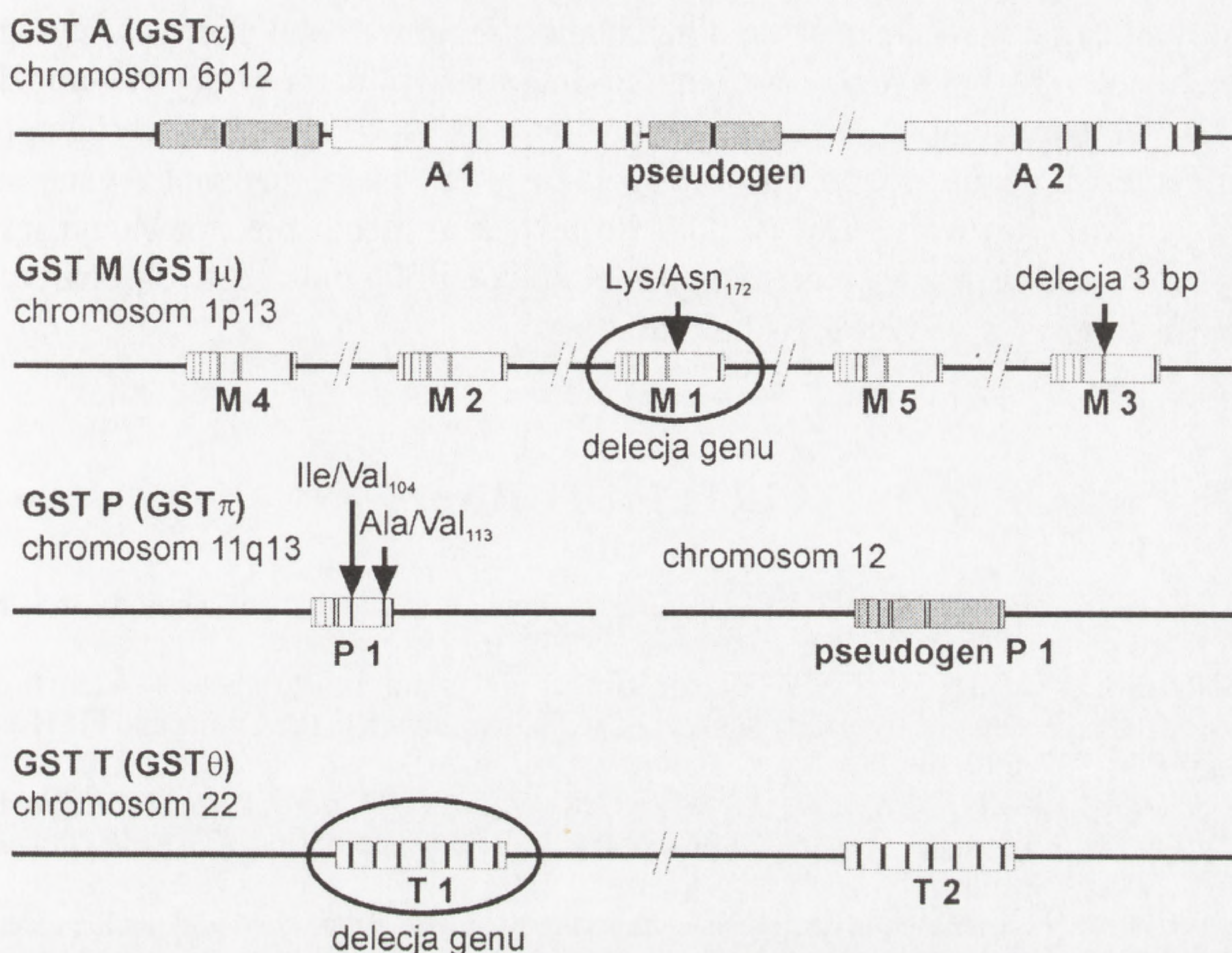
który pozostawał znaczny nawet po zawężeniu grupy do mężczyzn wypalających ok. 20 papierosów dziennie. Fakt ten interpretowano jako genetycznie determinowane zróżnicowanie podatności na działanie kancerogenów obecnych w dymie tytoniowym. Również niezależność profilu aromatycznych i alkiłowanych adduktów DNA, powstających w wyniku ekspozycji z tego samego źródła tłumaczono genetycznie zdeterminowanym zróżnicowaniem aktywności różnych grup enzymów odpowiedzialnych za metabolizm policyklicznych węglowodorów aromatycznych i N-nitrozoamin [47]. Bardziej bezpośredni dowód roli czynnika genetycznego w kształtowaniu ryzyka zachorowania na raka krtani pochodził z oceny niestabilności chromosomowej opisanej w dziale 3.1.

Ocena ryzyka genetycznego jest łatwiejsza w przypadku chorób jednogenowych, co jednak nie dotyczy chorób nowotworowych. Jednakże i w tej drugiej grupie istnieje kilka tzw. genów wysokiej penetracji warunkujących wystąpienie m.in.: raka piersi, polipowatości jelita grubego, czy choroby *ataxia-telangiectasia*. Ponieważ geny tego typu nie zostały zidentyfikowane w raku krtani, podobnie jak w wielu chorobach nowotworowych do oceny ryzyka genetycznego pozostają geny białek odpowiedzialnych za metabolizm kancerogenów w organizmie tzn. warunkujących aktywację metaboliczną i detoksykację kancerogenów oraz usuwanie uszkodzeń DNA. Grupa tych genów jest określana jako geny niskiej penetracji. Ponieważ większość aktywowanego kancerogenu ulega detoksykacji, zwróciliśmy uwagę na polimorfizm tych genów zakładając, że międzyosobnicze zróżnicowanie procesu detoksykacji różnicuje także ryzyko genetyczne [40].

Badaniem objęto geny następujących enzymów: transferaza S-glutationu (izoenzymy: GST M1, GST M3, GST P1 i GST T1), hydroksylaza epoksydowa (EPHX1) i N-acetylotransferaza (NAT2). Celem badań była ocena częstości występowania genów uszkodzonych u chorych na raka krtani w porównaniu z populacją osób zdrowych.

Zasadniczo genotypowanie wykonuje się za pomocą techniki PCR z wykorzystaniem starterów dobranych do badanych genów. Ułatwieniem pracy jest znajomość lokalizacji i struktury wymienionych genów łącznie z polimorfizmem wpływającym na funkcję genu. W prostym przypadku do wykrycia polimorfizmu wystarcza standardowa technika PCR. Istnienie kilku wariantów polimorficznych wymaga wprowadzenia dodatkowych metod wymienionych poniżej:

- wstępna analiza długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragments length polymorphism*, RFLP), co miało miejsce w przypadku *GST M3*, *GST P1*, *EPHX1* i *NAT2*,
- stosowanie techniki multiplex PCR, polegającej na jednoczesnej amplifikacji fragmentów co najmniej dwóch loci genowych (*GST M1* i *GST T1*),
- konieczność zastosowania allelo-specyficznego PCR miała miejsce w przypadku genu *GST M1*, gdzie allele A i B różnią się tylko jedną zasadą. Loci



RYSUNEK 5. Rozmieszczenie loci genowych transferaz glutationowych odpowiedzialnych za wystąpienie polimorficznych form enzymów

genowe (w tym polimorficzne) transferaz glutationowych oraz ich lokalizację na chromosomach przedstawiono na rysunku 5.

Po przebadaniu ca. 240 pacjentów [25] stwierdzono nieznaczną nadreprezentację niektórych uszkodzonych genów w porównaniu z grupą kontrolną. W dalszym ciągu badań wykazano tendencję do współwystępowania defektów genowych. Ponieważ enzymy detoksykacyjne w przeciwieństwie do genów aktywujących kancerogeny nie wykazują wysokiej specyficzności i tym samym może występować kompensowanie aktywności jednego enzymu przez inny [18], wnioskujemy, że dopiero kumulacja defektów genowych w szlaku detoksykacji stanowi czynnik ryzyka genetycznego raka krtani. Dowód na poprawność tego wniosku uzyskaliśmy wykazując znaczący wzrost poziomu aromatycznych adduktów DNA wraz z krotnością defektów genowych enzymów detoksykacyjnych [49]. Ponadto stwierdziliśmy efekt maskowania roli czynnika genetycznego przez wysoką ekspozycję na egzogenne kancerogeny [R. Jaskuła-Sztul, praca doktorska, Poznań, 1998].

5. PODSUMOWANIE

Uzyskanie wglądu w biologię nowotworów krtani wymaga stosowania całej baterii technik badawczych, które dostarczają uzupełniających się wyników. W stwierdzeniu

tym jest zawarta konieczność współdziałania biologów molekularnych, cytogenetyków, histologów i biochemików. Dopiero interdyscyplinarne podejście umożliwi w miarę pełne poznanie mechanizmu przemian od ekspozycji na kancerogen przez wystąpienie klinicznie rozpoznawalnego raka krtani aż po zaawansowane stadia choroby nowotworowej. Niestety dotychczasowe ustalenia nie pozwalają jeszcze na złożenie jednoznacznej oferty w postaci aplikacji diagnostycznych opartych na ocenie ilościowej pojedynczego biomarkera.

LITERATURA

- [1] ADACHI S, ZEISIG M, MÖLLER L. Improvements in the analytical method for 8-hydroxyguanosine in nuclear DNA. *Carcinogenesis* 1995; **16**: 253–258.
- [2] ANDERSON D, YU TW, BROWNE MA. The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the Comet and FISH assays. *Mutat Res* 1997; **390**: 69–77.
- [3] BANASZEWSKI J, SZMEJA Z, SZYFTER W, SZYFTER K, BARANCZEWSKI P, MÖLLER L. Analysis of aromatic DNA adducts in laryngeal biopsies. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000, w druku.
- [4] BIER H. Chemotherapeutic drug resistance in the management of head and neck cancer. *Eur J Otorhinolar* 1993; **250**: 200–208.
- [5] CALIFANO J, VAN DER RIET P, WESTRA W, NAWROZ H, CLAYMAN G, PIAntADOSI S, CORIO R, LEE D, GREENBERG B, KOCH WM, SIDRANSKY D. Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; **56**: 2488–2492.
- [6] CLOOS J, BRAAKHUIS BJM, STEEN I, COOPER MP, DE VRIES N, NAUTA JJP, SNOW GB. Increased mutagen sensitivity in head and neck scc patients, particularly those with multiple primary tumors. *Int J Cancer* 1994; **56**: 816–819.
- [7] COLLINS AR, AI-GUO M, DUTHIE SJ: The kinetics of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 1995; **336**: 69–77.
- [8] COPPER MP, JOVANOVIĆ A, NAUTA JJP, BRAAKHUIS BJM, DE VRIES N, VAN DER WAAL I, SNOW GB. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; **121**: 157–160.
- [9] DAVE BJ, HSU TC, HONG WK, PATHAK S. Nonrandom distribution of mutagen-induced chromosome breaks in lymphocytes of patients with different malignancies. *Int J Oncol* 1994; 733–740.
- [10] DĄBROWSKI P, KITA S, SZYFTER W, SZMEJA Z, JARMUŻ M, SZYFTER K. Ukryta niestabilność chromosomowa a ryzyko wystąpienia raka krtani. *Otolaryngol Pol* 1999; **53**: 245–251.
- [11] DEVANABOYINA U, GUPTA RC: Sensitive detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by ³²P-postlabelling and the basal levels in rat tissues. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 917–924.
- [12] DIZDAROGLU M. Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett* 1993; **315**: 1–6.
- [13] FOROZAN F, KARHU R, KONONEN J, KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI O. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 1997; **13**: 405–409.
- [14] GEDIK CM, EWEN SWB, COLLINS AR: Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat* 1992; **62**: 313–320.

- [15] GOLUSINSKI W, OLOFSSON J, SZMEJA Z, MAJEWSKI P. p53, PCNA and Ki67 in laryngeal cancer. *Pol J Pathol* 1996; **47**: 175–182.
- [16] GOLUSINSKI W, OLOFSSON J, SZMEJA Z, SZYFTER K, SZYFTER W, BICZYSKO W, HEMMINKI K. Alteration of p53 gene structure and function in laryngeal squamous cell cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1997; **254** (suppl.1), S133–S137.
- [17] GONZALES MV, PELLO MF, LOPEZ-LARREA C, SUAREZ C, MENENDEZ MJ, COTO E. Loss of heterozygosity and mutation analysis of the *p16* (9p21) and *p53* (17p13) genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 1995; **1**: 1043–1049.
- [18] HIRVONEN A. Combination of susceptible genotypes and individual responses to toxicants. *Environ Health Perspect* 1997; **105**: 755–758.
- [19] HONG WK, LIPPMAN SM, WOLF GT. Recent advances in head and neck cancer - larynx preservation and cancer chemoprevention. *Cancer Res* 1993; **53**: 5113–5120.
- [20] HSU TC. Genetic predisposition to cancer with special reference to mutagen sensitivity. *In vitro Cell Devel Biol* 1987; **23**: 591–603.
- [21] HSU TC, CHERRY LM, SAMAN NA. Differential mutagen susceptibility in cultured lymphocytes of normal individuals and cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1985, **17**: 307–313.
- [22] ILYINSKIKH NN, ILYINSKIKH IN, ILYINSKIKH EN. Chromosome breakage at sites of oncogens in a population accidentally exposed to radioactive chemical pollution. *Mutagenesis* 1999; **14**: 83–86.
- [23] JAŁOSZYŃSKI P, KUJAWSKI M, SZYFTER K. Elektroforeza pojedynczych komórek (*comet assay*) – użyteczna technika badania uszkodzeń DNA. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 339–354.
- [24] JARMUŻ M, SZYFTER K. Zastosowanie testu bleomycynowego do określania predyspozycji genetycznej do zachorowania na nowotwory. *Wsp Onkol* 1999; **3**: 188–190.
- [25] JASKUŁA-SZTUL R., REINEKAINEN M, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, SZMEJA Z, SZYFTER W, SZYFTER K, HIRVONEN A. Glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and susceptibility to smoking related larynx cancer. *Biomarkers* 1998; **3**: 149–155.
- [26] JIN CH, JIN Y, WENNERBERG J, AKERVALL J, GRENTHE B, MANDAHL N, HEIM S, MITELMAN F, MERTENS F. Clonal chromosome aberrations accumulate with age in upper aerodigestive tract mucosa. *Mutat Res* 1997; **374**: 63–72.
- [27] JOHNSON KL, NATH J, PLUTH JM, TUCKER JD. The distribution of chromosome damage, non-reciprocal translocations and clonal aberrations in lymphocytes from Chernobyl clean-up workers. *Mutat Res* 1999: 77–85.
- [28] KITA S, JARMUŻ M, DĄBROWSKI P, BIEGALSKI W, JEŻEWSKA A, KOWALCZYK M, SZYFTER W, SZYFTER K. Ocena indukowanych bleomycyną aberracji struktury chromosomów w limfocytach chorych na raka krtani. *Otolaryngol Pol* 1999; **53**: 253–258.
- [29] KUJAWSKI M, AALTO Y, JASKUŁA-SZTUL R, SZYFTER W, SZMEJA Z, SZYFTER K, KNUUTILA S. DNA copy number losses are more frequent in primary larynx tumors with lymph node metastases than in tumors without metastases. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; **114**: 31–34.
- [30] KUJAWSKI M, SARLOMO-RIKALA M, GABRIEL A, SZYFTER K, KNUUTILA S. Recurrent DNA copy number losses associated with metastasis of larynx carcinoma. *Gene, Chrom Cancer* 1999; **26**: 253–257.
- [31] LIMON J, MITELMAN F. Znaczenie aberracji chromosomowych w litych guzach nowotworowych człowieka. *Pat Pol* 1994; **45**: 1–15.
- [32] LISOWSKA J, ZATOŃSKI W. Tumors of the larynx in Poland in comparison to other European countries. Etiological hypotheses. *Otolaryngol Pol* 1992; **46**: 211–216.
- [33] LOUHELAINEN J, SZYFTER K, SZYFTER W, HEMMINKI K. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in larynx cancer. *Int J Oncol* 1997; **10**: 247–252.
- [34] PHILLIPS DH. DNA adducts in human tissues: Biomarkers of exposure to carcinogens in tobacco smoke. *Environ Health Perspect* 1996; **104**, suppl. 4: 453–458.

- [35] PHILLIPS DH. Detection of DNA modifications by ^{32}P -postlabelling assay. *Mutat Res* 1997; **378**: 1–12.
- [36] PUERTO S, SURRALLES J, RAMIREZ MJ, CREUS A, MARCOS R. Equal induction and persistence of chromosome aberrations involving chromosomes with heterogenous lengths and gene densities. *Cytogenet Cell Genet* 1999; **87**: 62–68.
- [37] RANSOM DT, LEONARD JH, KEARSLEY JH, TURBETT GR, HEEL K, SOSARS V, HAYWARD NK, BISHOP JF. Loss of heterozygosity studies in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head & Neck* 1996; **18**: 248–253.
- [38] REED AL, CALIFANO J, CAIRNS P, WESTRA WH, JONES RM, KOCH W, AHRENDT S, EBY Y, SEWELL D, NAWROZ H, BARTEK J, SIDRANSKY D. High frequency of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; **56**: 3630–3633.
- [39] ROJAS E, VALVERDE M, SORDO M, OSTROSKY-WEGMAN P: DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 1996; 115–120.
- [40] SEIDEGARD J, EKSTROM G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Env Health Perspect* 1997; **105** suppl 4: 791–798.
- [41] SHERR CHJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; **274**: 1672–1677.
- [42] SOMMERS KD, MERRICK MA, LOPEZ ME, INCOGNITO LS, SCHECHTER GL, CASEY G. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Res* 1992; **52**: 5997–6000.
- [43] SPITZ MR, HOQUE A, TRIZNA Z, SCHANTZ SP, AMOS CHI, KING TM, BONDY ML, HONG WK, HSU TC. Mutagen sensitivity as a risk factor for second malignant tumors following malignancies of the upper aerodigestive tract. *J Nat Cancer Inst* 1994; 1681–1684.
- [44] SPITZ M, LIPPMAN SM, JIANG H, LEE JJ, KHURI F, HSU TC, TRIZMA Z, SCHANTZ SP, BENNER S, HONG WK. Mutagen sensitivity as a predictor of tumor recurrence in patients with cancer of the upper aerodigestive tract. *J Nat Cancer Inst* 1998; **90**: 243–245.
- [45] SZYFTER K. Epidemiologia molekularna. [w] Barciszewski J, Łastowski K, Twardowski T. (red.) Nowe tendencje w biologii molekularnej, inżynierii genetycznej oraz medycynie. Wyd. SORUS, Poznań 1996; t. II: 353–372.
- [46] SZYFTER K, BANASZEWSKI J, JAŁOSZYŃSKI P, PABISZCZAK M, SZYFTER W, SZMEJA Z. Carcinogen:DNA adducts in tobacco smoke-associated cancer of the upper respiratory tract. *Acta Bioch Pol* 1999; **46**: 275–287.
- [47] SZYFTER K, HEMMINKI K, SZYFTER W, SZMEJA Z, BANASZEWSKI J, PABISZCZAK M. Tobacco smoke-associated N7-alkylguanine in DNA of larynx tissue and leucocytes. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 501–506.
- [48] SZYFTER K, HEMMINKI K, SZYFTER W, SZMEJA W, BANASZEWSKI J, YANG K. Aromatic DNA adducts in larynx cancer biopsies and leukocytes. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 2195–2199.
- [49] SZYFTER K, JASKUŁA-SZTUL R, BANASZEWSKI J, MÖLLER L, SZYFTER W, SZMEJA Z. Wykazanie roli czynnika genetycznego w raku krtani na podstawie analizy genotypów enzymów detoksykacyjnych. *Wsp Onkol* 1998; **2**: 159–161.
- [50] SZYFTER K, JASKUŁA-SZTUL R, KUJAWSKI M, KITA S, JARMUŻ M, DĄBROWSKI P. Czynniki genetyczne w raku krtani. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 123–136.
- [51] SZYFTER K, KRÜGER J, ERICSON P, VACA C, AFÖRSTI, HEMMINKI K. () ^{32}P -postlabelling analysis of DNA adducts in humans: Adduct distribution and method improvement. *Mutat Res* 1994; **313**: 269–276.
- [52] SZYFTER K, SZMEJA Z, SZYFTER W, HEMMINKI K, BANASZEWSKI J, JASKUŁA-SZTUL R, LOUHELAINEN J. Molecular and cellular alterations in tobacco smoke-associated larynx cancer. *Mutat Res* 1999; **445**: 259–274.
- [53] WORSHAM M, BENNINGER MJ, ZARBO RJ, CAREY TE, VAN DYKE DL. Deletion 9p22pter and loss of Y as primary chromosome abnormalities in a squamous cell carcinoma of the vocal cord. *Genes Chrom Cancer* 1993; **6**: 58–60.

- [54] WRONKOWSKI Z, ZWIERKO M. Malignant tumors in Poland, [w] Onkologia kliniczna, UICC, Polish edition by PWN, Warsaw 1994; addendum
- [55] ZATOŃSKI W, BECHER H, LISSOWSKA J, WAHRENDORF J. Tobacco, alcohol, and diet in the etiology of laryngeal cancer: A population-based case-control study. *Cancer Causes & Control* 1991; **2**: 3–10.
- [56] ZATOŃSKI W, TYCZYŃSKI J, DIDKOWSKA J. Malignant tumors of the larynx in Poland in the years 1963–1989. *Otolaryngol Pol* 1992; **46**: 203–210.
- [57] ZHANG LF, HEMMINKI K, SZYFTER K, SZYFTER W, SÖDERKVIST P. p53 mutations in larynx cancer. *Carcinogenesis* 1996; **15**: 2949–2951.

Adres autora: ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań
e-mail: szyfkris@rose.man.poznan.pl

PRZYSZŁOŚĆ TERAPII GENOWEJ W SCHORZENIACH NEUROLOGICZNYCH*

FUTURE OF GENE THERAPY IN NEUROLOGICAL DISORDERS

Jerzy NOWAK, Danuta JANUSZKIEWICZ-LEWANDOWSKA

Zakład Genetyki Człowieka PAN i Instytut Pediatrii AM w Poznaniu

Streszczenie: W ostatnich latach terapia genowa jest najszybciej rozwijającą się dziedziną medycyny. Terapię genową można określić jako próbę uzyskania efektu leczniczego przez transfer genu do określonych komórek. Dzięki specyficznym wektorom możliwe jest wprowadzenie terapeutycznych genów do komórek docelowych *ex vivo* i *in vivo*. Na modelach zwierzęcych uzyskano wiele obiecujących wyników w leczeniu chorób neurologicznych. Wydaje się, że w niedalekiej przyszłości terapia genowa będzie wykorzystana w leczeniu choroby Parkinsonsa, Alzheimerera, dystrofii mięśniowej Duchenne'a i w swardnieniu rozsianym. W przeprowadzonych do tej pory licznych próbach klinicznych uzyskano w części przypadków regresję guzów mózgu po zastosowaniu genów samobójców i gancyklowiru. Należy sądzić, że w przyszłości technologia transferu genu stanie się nową metodą zapobiegania i leczenia chorób neurologicznych.

Słowa kluczowe: terapia genowa, transfer genu, choroby neurologiczne

Summary: In the last years gene therapy is the most rapidly developing discipline of medicine. Gene therapy may be defined as experimental treatment of various diseases by the gene transfer technology. Therapeutical genes carried by specific vectors can be introduced into targeted cells by means of the *ex vivo* and *in vivo* approaches. Many promising results have been obtained in animal models of neurological disorders. Therefore gene therapy is most likely to be applied in the treatment of disorders including Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Duchenne muscular dystrophy and multiple sclerosis. In a number of clinical trials using suicide genes and gancyclovir regression of brain tumours have been observed. It is a great hope that in the future gene transfer technology will be a common method of neurological disorders treatment and prevention.

Key words: gene therapy, gene transfer, neurologic disorders

*Praca wykonana w ramach projektu badawczego KBN 4PO5A13514

W ciągu ostatnich kilku lat obserwujemy dynamiczny rozwój nowej dyscypliny medycznej, za jaką można uważać terapię genową. Z uwagi na dotychczasowe osiągnięcia, zdaniem autorów, terapię genową można określić jako próbę uzyskania efektu leczniczego przez transfer materiału genetycznego do określonych komórek lub tkanek. Celem terapii genowej może być również zapobieganie wielu chorobom. Z uwagi na obecny stan zaawansowania badań podstawowych i klinicznych jeszcze przez długie lata nie można liczyć na wysoką skuteczność terapii genowej.

Możliwe formy terapii genowej obejmują wprowadzenie prawidłowego genu bez zmiany genu zmutowanego; modyfikację genu *in situ*; „chirurgię genową” polegającą na wycinaniu genu z defektem i insercji genu prawidłowego oraz zastosowanie kombinacji wyżej omówionych form. Wprowadzenie terapeutycznego genu ma na celu wzmocnienie słabej funkcji, rekonstytucję brakującej czynności lub supresję niepożądanego aktywności [19, 23, 24].

Terapię genową można podzielić na dwie zasadnicze grupy:

- pierwsza to somatyczna obejmująca transfer materiału genetycznego do komórek somatycznych w celach leczniczych,
- druga to terapia genowa komórek rozrodczych zakładająca zapobieganie chorobom genetycznym przez wprowadzenie genu do komórek rozrodczych.

W zakresie transferu genu do komórek somatycznych, niekoniecznie w celach leczniczych, należy wyodrębnić wzmocnienie genetyczne [9]. Celem wzmocnienia genetycznego jest uzyskanie poprawy określonych cech, jak np. obniżenie wagi, wzrost włosów, zwiększenie siły mięśniowej, odmłodzenie skóry.

TERAPIA *EX VIVO* I *IN VIVO*

Terapeutyczne geny lub sekwencje mogą być wprowadzane do docelowych komórek lub tkanek dwoma zasadniczymi sposobami. Pierwsza grupa obejmuje techniki transferu genu w warunkach *ex vivo*, tj. modyfikację genetyczną *in vitro* komórek pobranych od chorego [5,12]. Najczęściej pobrane komórki są hodowane w celu ich namnożenia i po genetycznej modyfikacji wprowadzane są z powrotem do organizmu chorego [14]. Jest to więc rodzaj autotransplantacji zmienionych komórek. Drugi sposób to terapia genowa *in vivo* polegająca na bezpośrednim wprowadzeniu terapeutycznego genu do tkanek chorego. Zaletą terapii *ex vivo* jest stosunkowo wysoka wydajność, wadą niewiadoma dotycząca długości przeżycia i funkcjonowania genetycznie zmienionych komórek w organizmie chorego. Zaletą terapii genowej *in vivo* jest pominięcie hodowli komórek *in vitro* jako pracochłonnej i potencjalnie narażonej na zakażenie oraz możliwość łatwego uzyskania określonej ilości plazmidowego DNA. Zasadniczą wadą terapii *in vivo* jest niewielka wydajność transferu genu z uwagi na gorszy dostęp do docelowych tkanek w porównaniu z podejściem

ex vivo. Ponadto, w wyniku metod *in vivo* uzyskuje się stosunkowo niski poziom integracji podanego DNA.

Transfer leczniczego genu do komórki docelowej i uzyskanie jego stabilnej ekspresji stanowi jeden z elementów powodzenia terapii genowej. Gen można wprowadzić do komórki różnymi metodami fizykochemicznymi, z których w terapii genowej wykorzystywana jest technika elektroporacji i wprowadzania liposomów po fuzji DNA [7,15,27]. Z metod biologicznych powszechnie wykorzystuje się wprowadzanie do komórki genów za pomocą wektorów wirusowych i niewirusowych.

WEKTORY RETROWIRUSOWE

Zasadniczym problemem terapii genowej jest znalezienie takiego wektora, który w sposób swoisty rozpoznawałby komórki docelowe. Najczęściej używany wektor – zmodyfikowany retrowirus jest wiązany do powierzchni komórki przez receptor, którego budowa nie jest znana. Retrowirusy są cząsteczkami niestabilnymi, co może stwarzać problemy w uzyskiwaniu ilości koniecznej do stosowania ich na szerszą skalę. Również w warunkach *in vivo* retrowirusy mogą być szybko inaktywowane przez układ komplementu. Stąd też zastosowanie retrowirusów prawie wyłącznie w terapii *ex vivo*, oparte na procedurze transferu genu w warunkach *in vitro* i wprowadzaniu do organizmu genetycznie zmodyfikowanych komórek [6]. Integracja retrowirusa z genomem zachodzi tylko w komórkach dzielących się [32]. Część wektorów (retrowirusowych i tzw. *adenoassociated virus*) ulega integracji z genomowym DNA. Sam mechanizm integracji retrowirusa z genomem nie został jeszcze poznany. Losowa integracja z genomem komórki może wpływać na różny poziom ekspresji transgenu w różnych komórkach, jak również na stabilność transgenu. Istnieje jednak ryzyko, że losowa integracja może spowodować aktywację lub inaktywację funkcjonalnych genów. W genomie retrowirusa można wbudować odcinek DNA nie dłuższy niż 1 kb, co ogranicza zastosowanie większych terapeutycznych genów. Ostatnio opracowano system retrowirusowych wektorów wyprowadzonych z wirusa HIV, które są w stanie zakażać również komórki nie ulegające podziałom [13].

WEKTORY ADENOWIRUSOWE

Znalazły zastosowanie przede wszystkim w próbach terapii mukowiscydozy z uwagi na ich tropizm do komórek epitelialnych układu oddechowego [2,8]. Adenowirusy wykazują również tropizm w stosunku do komórek mięśniowych i neuronów. W przeciwieństwie do retrowirusów charakteryzują się dużą stabilnością. Adenowirusy można modyfikować do wektorów pozbawionych zdolności do re-

plikacji. Głównym ograniczeniem stosowania wektorów adenowirusowych jest indukcja odpowiedzi immunologicznej. Odpowiedź skierowana jest przeciwko samemu wirusowi lub komórkom zainfekowanym adenowirusem. Wektory adenowirusowe są tak modyfikowane, żeby usunąć geny kodujące najbardziej immunogenne białka. Podejmowane były próby stosowania immunosupresji równocześnie z podawaniem wektorów adenowirusowych. Kolejne podawanie wektorów często nie powoduje wzrostu ekspresji transgeny, lecz nasila reakcje zapalne spowodowane prawdopodobnie przeciwciałami antywirusowymi neutralizującymi wektory. Niektóre białka adenowirusowe mogą wywierać cytotoksyczny wpływ na transdukowane komórki. W przypadku adenowirusów ekspresja terapeutycznego genu często jest krótkotrwała. Wektory adenowirusowe mogą pomieścić geny wielkości 7,5 kb [38]. Ostatnio próbuje się konstruować adenowirusowe minichromosomy zdolne pomieścić znacznie większe odcinki DNA dzięki usunięciu wszystkich kodujących sekwencji wirusa. Dzięki temu zmniejsza się ryzyko wystąpienia odpowiedzi immunologicznej. Wektory adenowirusowe wydają się być najbardziej przydatne w leczeniu chorób, w których długotrwała ekspresja terapeutycznego genu nie jest konieczna, np. w nowotworach.

WEKTORY ZWIĄZANE Z ADENOWIRUSAMI

Wektory te (*adenoassociated virus* – AAV) są zdolne do integracji z genomem komórki i przechodzą do komórek potomnych w trakcie kolejnych podziałów. W przeciwieństwie do retrowirusów ulegają integracji głównie do chromosomu 19. Jednakże integracja nie jest tak efektywna jak w przypadku retrowirusów. Mogą wbudować odcinek DNA wielkości do 5 kb. Wektory te są bardzo stabilne. Mogą przenosić, czyli transdukować terapeutyczny gen do różnych rodzajów komórek zarówno dzielących się, jak i nie ulegających podziałom. Ograniczeniem tych wektorów jest jednoniciowość DNA; wklonowane z AAV transgeny pozostają utajone. W wyniku koinfekcji wirusa wspomagającego (*helper*) i AAV dochodzi do indukcji replikacji. Ostatnia praca Russella i Hiraty [30] wykazała, że zmodyfikowany AAV może skutecznie integrować w ściśle określonym miejscu genomu zgodnie z mechanizmem homologicznej rekombinacji. Uzyskanie homologicznej rekombinacji aż w 1% ludzkich fibroblastów wskazuje na możliwość wprowadzania zmian w genomowym DNA w ściśle określonym miejscu.

REGULACJA EKSPRESJI TRANSGENU

Istotną sprawą jest kontrola ekspresji wprowadzonych genów. Ekspresja transgeny może być regulowana w sposób niespecyficzny lub swoisty, związany z obecnością promotorów lub wzmacniaczy (ang. *enhancer*) [26]. Nieswoiste elementy regulacyjne

(ang. *housekeeping type element*) zapewniają ekspresję w większości komórek. Regulacja ekspresji jest w takim przypadku niemożliwa, a jej wielkość zależy od liczby kopii transgenu i aktywności danego rodzaju komórek. Zastosowanie tkankowo-specyficznych promotorów pozwala na ekspresję wprowadzonego genu w docelowej tkance i zapobiega jego aktywności w innych komórkach. Użycie promotora obcego może prowadzić do konstytutywnej bądź indukowanej ekspresji transgenu. Dobrym przykładem jest promotor wrażliwy na kortykosteroidy (ang. *corticosteroid response element*). Jego zastosowanie umożliwia włączanie i wyłączanie ekspresji transgenu. Niektóre retrowirusy preferencyjnie integrują się w transkrypcyjnie aktywnej chromatynie. Mechanizm ten nie jest poznany, jednak w takim przypadku istnieje prawdopodobieństwo uszkodzenia prawidłowo funkcjonującego genu przez transgen. Poziom produktu ekspresji transgenu w niektórych chorobach, jak np. w hemofilii, ma mniejsze znaczenie [17]. Efekt terapeutyczny można osiągnąć przy ekspresji zapewniającej poziom kilku procent wartości prawidłowego stężenia czynnika krzepnięcia krwi.

INDUKCJA ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

W wielu próbach terapii genowej istotnym problemem jest odpowiedź immunologiczna skierowana przeciwko białkom wektora. Odpowiedź immunologiczna może być indukowana przez komórki, do których został wprowadzony transgen. Również produkt transgenu, normalnie nie występujący w organizmie, może indukować odpowiedź immunologiczną typu humoralnego lub komórkowego [26].

WEKTORY W TERAPII GENOWEJ CHORÓB NEUROLOGICZNYCH

W terapii genowej chorób neurologicznych wykorzystywane są wektory pochodne wirusa opryszczki pospolitej, wektory retrowirusowe, adenowirusowe i wektory związane z adenowirusami (AAV – *adenoassociated virus*) [4,10]. Wektory pochodne wirusa opryszczki (HSV – *herpes simplex virus*) mogą być bardzo przydatne w terapii genowej chorób neurologicznych z uwagi na ich neurotropizm i łatwą zdolność do infekcji wielu komórek. Wektory HSV o wielkości 150 Kbp DNA mogą „pomieścić” insert wielkości do 20 kbp i charakteryzują się wysoką wydajnością transdukcji neuronów i komórek glejowych. Mogą infekować również komórki dzielące się, nie integrują się jednak z genomem komórki i co za tym idzie wykazują stosunkowo krótkotrwałą, rzędu kilku tygodni ekspresję transgenu. Wektory HSV mogą mieć w przyszłości zastosowanie do wprowadzania terapeutycznych genów głównie w leczeniu choroby Parkinsona. W doświadczeniach na zwierzętach próbuje się stosować atenuowane mutanty HSV replikujące tylko w komórkach

guza. W chorobach neurologicznych mogą być również wykorzystane do transferu genu wektory retrowirusowe. Ograniczeniem stosowania tych wektorów jest ich zdolność do infekcji wyłącznie komórek dzielących się. Nie posiadają zdolności do replikacji i mogą tylko jednorazowo zainfekować komórkę. Wektory retrowirusowe charakteryzuje wysoka wydajność transferu genu i stabilna integracja z genomem komórki.

W terapii genowej stosuje się również metody fizykochemicznego transferu genu do komórek docelowych. Do metod tych można zaliczyć wprowadzenie terapeutycznego genu przez liposomy, elektroporację, transfekcję DNA wytrąconego fosforanem wapnia i bezpośrednią iniekcję DNA. Tą ostatnią metodę można stosować głównie w odniesieniu do komórek mięśniowych.

KOMÓRKI DOCELOWE W TERAPII CHORÓB NEUROLOGICZNYCH

Komórkami docelowymi w terapii chorób neurologicznych mogą być komórki glejowe, płodowe komórki neuronalne, astrocyty, oligodendrocyty, komórki Schwanna, fibroblasty oraz mioblasty [4,10]. W doświadczalnych modelach terapii genowej chorób neurologicznych duże nadzieje wiąże się z genetycznie modyfikowanymi fibroblastami i mioblastami. Prekursorowe komórki neuronalne mogą być przeszczepiane jako niemodyfikowane, które różnicują się do dojrzałych neuronów w warunkach *in vivo* [32]. Ponadto istnieje możliwość *in vitro* genetycznej modyfikacji komórek prekursorowych. Oddzielną grupę stanowią komórki nowotworów centralnego układu nerwowego, do których można bezpośrednio, *in vivo* wprowadzać terapeutyczny gen [37].

MOŻLIWOŚCI GENOTERAPII CHOROBY PARKINSONA

Choroba Parkinsona jest jedną z najczęstszych chorób neurodegeneracyjnych, występującą u około 0,1–1% populacji. Duża część przypadków choroby Parkinsona wiąże się z brakiem czynników neurotroficznych, działaniem wolnych rodników tlenowych lub ekspozycją na inne toksyny. Cechą charakterystyczną jest utrata neuronów produkujących dopaminę. Leczenie choroby Parkinsona doustnym podawaniem pochodnych dopaminy staje się mniej skuteczne w miarę postępu procesu chorobowego. Miejscowe dostarczenie L-DOPA przez transfer genu wydaje się być atrakcyjną alternatywą. Można to osiągnąć przez transfer *in situ* neuronów produkujących hydroksylazę tyrozyny, która jest odpowiedzialna za biosyntezę L-DOPA z tyrozyny [31]. Transfer genu hydroksylazy tyrozyny *in situ* mógłby zwiększać miejscową produkcję L-DOPA. U modelowych zwierząt, najczęściej szczurów iniekcje apomorfiny lub 6-hydroksydopaminy prowadzą do niedoboru

dopaminy, wywołując objawy podobne do choroby Parkinsona [11]. U tych zwierząt wykazano dużą skuteczność w eliminacji objawów braku L-DOPA przez transfer genu hydroksylazy tyrozynowej, który hamował objawy spowodowane podawaniem neurotoksyn niszczących dopaminergiczne neurony. W badaniach modelowych u szczura wprowadzono gen hydroksylazy tyrozyny stosując wektory wirusa opryszczki, charakteryzujące się wysokim neurotropizmem [12]. Podobnie pozytywne wyniki uzyskano przy pomocy wektorów pochodnych adenowirusa (*adenoassociated virus*). Również obiecujące wyniki uzyskano przez wszczepianie genetycznie modyfikowanych fibroblastów i mioblastów syntetyzujących hydroksylazę tyrozyny. Należy wspomnieć o niezwykle atrakcyjnych wynikach u myszy transgenicznych z wysoką ekspresją dysmutazy nadtlenkowej. U myszy tych wykazano oporność na uszkodzenia przez wolne rodniki komórek produkujących dopaminę.

PERSPEKTYWY TERAPII GENOWEJ CHOROBY ALZHEIMERA

Choroba Alzheimerera charakteryzuje się postępującą demencją, atrofią kory mózgu, utratą neuronów spowodowaną przez odkładanie się złożeń beta-amyloidu w korze mózgu i hipokampie oraz degenerację neuronów cholinergicznym. Zapobieganie degeneracji neuronów cholinergicznym można osiągnąć przez podawanie czynnika wzrostu NGF (*nerve growth factor*) [36]. Podobny efekt można osiągnąć przez transplantację genetycznie modyfikowanych fibroblastów produkujących NGF. Pozytywne wyniki uzyskano na modelu szczura, gdzie zaobserwowano wzrost liczby neuronów z receptorami dla NGF [36]. Zachęcające wyniki do przyszłej genoterapii choroby Alzheimerera osiągnięto u zwierząt przez przeszczepy genetycznie modyfikowanych fibroblastów produkujących brakujące neurotransmitery na przykład acetylocholinę. W badaniach na zwierzętach uzyskano pozytywne efekty genoterapii mierzone zdolnością do uczenia i zapamiętywania.

PRÓBY TERAPII GENOWEJ GUZÓW MÓZGU

Duża część eksperymentów terapii genowej nowotworów polega na stosowaniu tzw. „szczepionek przeciwrakowych”. Genetycznie zmodyfikowane komórki nowotworowe mają za zadanie wzmocnienie swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej [24]. Komórki używane w szczepionkach najczęściej wykazują ekspresję antygenów nowotworowych w połączeniu z antygenami zgodności tkankowej [33]. W wielu przypadkach genetycznie zmodyfikowane komórki nowotworowe produkują cytokiny, które stymulują cytotoksyczne limfocyty T [29]. Wykazano, że cytokiny produkowane miejscowo w guzie są bardziej efektywne w potencjalizacji odpowiedzi przeciwnowotworowej w porównaniu z cytokinami podawanymi dożylnie [16].

Transfekcja genem tej samej cytokiny może w wielu przypadkach prowadzić do zwiększenia odpowiedzi immunologicznej, w niektórych zaś pozostaje bez efektów [20,22]. Szczepionki z zasady używane są do profilaktyki chorób. W terapii genowej szczepionki w założeniu mają mieć działanie terapeutyczne, a nie zapobiegawcze. Część stosowanych szczepionek z komórek genetycznie zmodyfikowanych nie wykazuje większej efektywności działania niż podawanie naświetlanych komórek nowotworowych wraz z adiuwantem [3]. Ogólnie można stwierdzić, że wyniki stosowania szczepionek w terapii genowej nie są zbyt obiecujące. Z reguły odpowiedź na stosowane szczepionki w sensie zmniejszenia masy guza występuje tylko u części pacjentów, często poprawa jest tylko częściowa lub przejściowa [22].

Pewne nadzieje na lepszą skuteczność szczepionek wiązane są z zastosowaniem komórek dendrytycznych działających jako bardzo efektywne komórki prezentujące antygen [21]. Komórki dendrytyczne można uzyskać ze szpiku kostnego lub z krwi obwodowej i namnożyć je w hodowli *in vitro* z udziałem czynnika GM-CSF i IL-4. Dodanie do hodowli mieszaniny peptydów rozpoznawanych na komórkach nowotworowych przez cytotoksyczne limfocyty T sprawia, że tak przygotowane komórki dendrytyczne wprowadzone z powrotem do organizmu prezentują te peptydy w warunkach *in vivo* powodując stymulację swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Dzięki szczepieniu pacjentów z czerniakiem, komórkami dendrytycznymi preinkubowanymi ze swoistymi peptydami albo z lizatem komórek nowotworowych uzyskano znaczną poprawę u 5 z 16 chorych [21]. Obiecujące wyniki uzyskano również szczepiąc chorych z czerniakiem, swoistymi dla tego nowotworu syntetycznymi peptydami wiążącymi się selektywnie z cząsteczkami HLA-A2. Wyraźną poprawę stanu klinicznego uzyskano u 13 z 31 pacjentów otrzymujących szczepionkę wraz z interleukiną 2 [28].

Duże nadzieje w leczeniu guzów mózgu wiąże się z terapią genową prowadzoną *in vivo* [25]. W przeciwieństwie do tkanki mózgowej, której komórki nie ulegają podziałom, komórki guzów mózgu wykazują wysokie tempo proliferacji. Teoretycznie do szybko dzielących się komórek guzów mózgu można wprowadzać terapeutyczne geny, które nie ulegają transferowi do komórek prawidłowych. Aktualne strategie terapii genowej guzów mózgu obejmują bezpośrednie niszczenie komórek nowotworowych przez transfer genów kodujących toksyny [34]. Największe nadzieje wiązane są z bezpośrednim wprowadzaniem do tkanki guza genów tak zwanych „samobójców” pochodnych wirusa opryszczki pospolitej, kodujących kinazę tymidynową. Enzym ten powoduje konwersję nietoksycznego gancyklowiru w środek niszczący komórki nowotworowe. W przypadku transferu genu kinazy tymidynowej do komórek guza mózgu obserwuje się tak zwany *bystander effect* polegający na niszczeniu przez gancyklowir również przylegających komórek, w których nie doszło do ekspresji genu kinazy tymidynowej HSV. W doświadczeniach na zwierzętach wykazano, że w celu całkowitego zniszczenia tkanki guza wystarczy efektywny transfer genu kinazy tymidynowej do około 20% komórek guza. Niezwykle pomyślne

wyniki, polegające na całkowitej regresji glejaka 9L u szczura uzyskano przez wprowadzenie do tkanki nowotworowej fibroblastów produkujących kinazę tymidyny HSV z następowym podaniem gancyklowiru [35]. W terapii genowej z zastosowaniem transferu genu kinazy tymidynowej podano HSV kilkudziesięciu pacjentom z guzami mózgu. Z uwagi na zbyt krótki okres obserwacji trudno mówić o wyleczeniu chorych z glejakami mózgu przez transfer genu kinazy tymidynowej i podawanie gancyklowiru, jednakże wstępne wyniki obserwacji klinicznych poparte monitorowaniem przy pomocy rezonansu magnetycznego wskazują na wyraźne zmniejszenie się objętości guza. Na ostateczną ocenę wyników leczenia guzów mózgu transferem genu kinazy tymidynowej i podawaniem gancyklowiru należy jeszcze poczekać.

DYSTROFIA MIĘŚNIOWA DUCHENNE’A/BECKERA

Dystrofia mięśniowa Duchenne’a/Beckera jest najczęściej występującą genetycznie uwarunkowaną chorobą mięśni. Dystrofia jest sprzężona z chromosomem X i występuje z częstością 1/3500 urodzeń noworodków płci męskiej. Z uwagi na występowanie dwóch chromosomów u dziewcząt prawie nigdy nie występuje dystrofia Duchenne’a. Drugi chromosom X kompensuje mutację genu DMD na jednym chromosomie. Kobiety z mutacją genu DMD same nie chorują, jednak są nosicielkami i przekazują patologiczny gen potomstwu.

Gen dystrofiny zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu X w regionie p21. Jest to największy znany gen u człowieka wielkości ok. 2,5 mln par zasad. Większość przypadków dystrofii DMD uwarunkowana jest delecjami w genie DMD oraz zmianami ramki odczytu. Wskutek tych mutacji dochodzi do braku dystrofiny lub produkcji białka nieprawidłowego.

Modele zwierzęce dystrofii mięśniowej umożliwiają przeprowadzenie doświadczeń nad skutecznością terapii genowej. U myszy mdx brak dystrofiny spowodowany jest mutacją obejmującą pojedynczy nukleotyd [1]. Szczególnie przydatne do badań przedklinicznych okazały się psy rasy złoty retriever xmd, u których przebieg dystrofii mięśniowej wykazuje szereg podobieństw z dystrofią Duchenne’a. Jeszcze przed podjęciem pierwszych prób z terapią genową stosowano u chorych dzieci iniekcje domięśniowe prawidłowych komórek mięśniowych – mioblastów. Wcześniejsze doświadczenia na zwierzętach sugerowały, że mioblasty ulegają fuzji z komórkami zmienionymi patologicznie i produkują dystrofinę [18]. Niestety, pierwsze próby kliniczne z podawaniem mioblastów zakończyły się niepowodzeniem spowodowanym niską proliferacją mioblastów chorego, brakiem migracji mioblastów z miejsca podania. Ponadto, u chorych z zaawansowaną chorobą występujące zwłóknienie i odkładanie tłuszczu w tkance mięśniowej może być odpowiedzialne za słaby efekt terapeutyczny podawanych mioblastów. Najwcześniejsze próby transferu genu DMD podjęto w latach dziewięćdziesiątych u myszy mdx, którym podawano w

iniekcjach domięśniowych DNA [1]. W wyniku podania DNA dystrofina była produkowana w 1–2% włókien mięśniowych. Podejmowano również próby transferu genu dystrofiny z użyciem wektora adenowirusowego. Wyniki okazały się znacznie lepsze – uzyskano ekspresję dystrofiny w 5–50% włókien mięśniowych [18]. Dotychczas były podejmowane próby z różnymi konstrukcjami genu dystrofiny oraz wieloma wektorami. Z uwagi na wielkość genu DMD w próbach terapii genowej używane są konstrukcje złożone ze znacznie okrojonego genu DMD. Skonstruowane minigeny DMD podawane myszom mdx były w stanie spowodować produkcję dystrofiny i poprawę funkcjonowania mięśni [1]. Z wektorów stosowanych w próbach terapii genowej dystrofii mięśniowej należy wymienić wektory wirusowe: retrowirusowe, pochodne wirusa opryszczki pospolitej i związane z adenowirusami. Ciekawym podejściem było zastosowanie fibroblastów transfekowanych specyficzną konstrukcją, dzięki której fibroblasty były zmieniane w mioblasty. Z kolei użycie liposomów łącznie z wektorem wirusowym HVJ (*heamagglutinating virus of Japan*) umożliwiło wprowadzenie całego genu (cDNA) dystrofiny człowieka łącznie z promotorem do mięśni myszy mdx [1]. Uzyskaną ekspresję dystrofiny w 26% włókien mięśniowych należy uznać za wysoką i zachęcającą do podejmowania dalszych badań. Dla uzyskania poprawy struktury i funkcji mięśni nie jest konieczna pełna ekspresja dystrofiny we wszystkich mięśniach. Wartości rzędu 20% prawidłowych już zapobiegają dystrofii włókien mięśniowych. Zasadniczym problemem w eksperymentalnych próbach terapii genowej dystrofii mięśniowej jest uzyskanie trwałej ekspresji dystrofiny. Niestety, ekspresja dystrofiny stosunkowo szybko spada bez względu na rodzaj zastosowanego wektora [1].

Oprócz najczęściej stosowanej metody podawania domięśniowego terapeutycznego genu podejmowane były również u zwierząt próby iniekcji dootrzewnowej, dożylniej oraz dosercowej.

PRZYSZŁOŚĆ TERAPII GENOWEJ W NEUROLOGII

Z innych strategii o potencjalnie dużym znaczeniu w przyszłości wymienić należy korektę zmutowanych genów przeciwnowotworowych, hamowanie ekspresji onkogenów przez transfer sekwencji antysensownych. Mniejsze znaczenie w przyszłościowej terapii genowej chorób neurologicznych będą miały strategie prowadzące do zwiększania immunogenności komórek nowotworowych oraz wzmacnianie swojej aktywności przeciwnowotworowej limfocytów cytotoksycznych. Nie można wykluczyć, że dzięki technologii transferu genu będzie możliwa regeneracja ognisk demielinizacyjnych w stwardnieniu rozsianym.

Perspektywy terapii genowej chorób mięśniowych będą dotyczyły w pierwszym rzędzie wypracowania metod pozwalających uzyskać długotrwałą ekspresję dystrofiny w większości włókien mięśniowych. Niezwykle atrakcyjną wydaje się mo-

żliwość wypracowania efektywnych metod wprowadzania terapeutycznego genu dystrofiny nie tylko do mięśni szkieletowych, ale również do mięśnia sercowego.

Precyzyjna korekta mutacji genu stanowi podstawowy cel terapii genowej. Zastąpienie sekwencji zmutowanej prawidłową przez homologiczną rekombinację wydaje się najbardziej obiecującym podejściem. Ostatnio Cole-Strauss i wsp. [7] przedstawili wyniki wskazujące na korektę punktowej mutacji odpowiedzialnej za anemię sierpowatą przez wykorzystanie hybrydowych oligonukleotydów RNA/DNA. Wyniki te wskazują na istnienie możliwości precyzyjnej korekty mutacji punktowej. Podobne badania zostały wykonane przez Krena i wsp. [17], którzy wywołali punktową mutację w genie czynnika krzepnięcia IX u szczura przez ukierunkowaną mutagenezę. Duża wydajność ukierunkowanej mutagenezы w doświadczeniach Krena pozwala sądzić, że korekta genu, przy użyciu hybrydowych cząsteczek RNA/DNA może okazać się przełomem w terapii genowej chorób jednogenowych.

Wydaje się, że po okresie swoistej euforii nadszedł obecnie czas na zintensyfikowanie badań podstawowych, które powinny przyczynić się do dalszego znaczącego postępu terapii genowej. Terapia genowa chorób neurologicznych dopiero zaczyna się rozwijać. Na obecnym etapie rozwoju terapii genowej nie można jeszcze mówić o skutecznym leczeniu chorób, a szczególnie nowotworowych. Z tego względu nie należy stwarzać nadziei, zwłaszcza ciężko chorym pacjentom na „cudowne” wyleczenie za pomocą nowej formy terapii. Można mieć natomiast pewność, że w przyszłości terapia genowa będzie stawała się podstawową metodą zapobiegania i leczenia wielu chorób.

LITERATURA

- [1] ACSADI G, LOCHMULLER H, JANI A. Dystrophin expression in muscles of mdx mice after adenovirus mediated *in vivo* gene transfer. *Human Gene Therapy* 1996; 7:129–140.
- [2] BELLON G, MICHEL-CALEMARD L, THOUVENOT D, JAGNEAUX V, POITEVIN G, MALCUS C, ACCART M, LAYANI MP, AYMARD M, BERNON H, BIENVENU J, COURTNEY M, DORING G, GILLY B, GILLY R, LAMY D, LEVREY H, MOREL Y, PAULIN C, PERRAUD F, RODILLON L, SENE C, SO S, TOURAINE-MOULIN F, SCHATZ D, PAVIRANI A. Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Hum Gen Ther* 1997; 8: 15–25.
- [3] BLANKENSTEIN T, QIN Z. Cancer vaccines in gene therapy. *Gene Therapy* 1996; 3: 95–96.
- [4] BLÖMER U, NALDINI L, VERMA IM, TRONO D, GAGE FH. Application of gene therapy to the CNS. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1397–1404.
- [5] BLEASE RM, CULVER KW, MILLER AD, CARTER CS, FLEISHER T, CLERICI M, SHEARER G, CHANG L, CHIANG W, TOLSTSHEV P, GREENBLATT JJ, ROSENGERG SA, KLEIN H, BERGER M, MULLEN CA, RAMSEY WJ, MUUL L, MORGAN RA, ANDERSON WF. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995; 270: 475–480.
- [6] CARRASCO CH, FERSON D. Retrovirus-mediated wild type p53 gene transfer to tumours of patients with lung cancer. *Nature Med* 1996; 2: 985–991.

- [7] COLE-STRAUSS A, YOON K, XIANG Y, BYRNE BC, RICE MC, GRYN J, HOLLOMAN WK, KMIEC EB. Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science* 1996; **273**, 6: 1386–1388.
- [8] CRYSTAL R, MCELVANEY M, ROSENFELD M, CHU C, MASTRANGELI A, HAY J, BRODY S, JAFFE H, EISSLER N, DANIEL C. Administration of an Adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nature Genet* 1994; **8**: 42–50.
- [9] CULVER K, ANDERSON F, BLEASE R. Lymphocyte gene therapy. *Hum Gene Ther* 1991; **2**: 107–109.
- [10] FRIEDMANN T. Gene therapy for neurological disorders. *TIG* 1994; **10**, **6**: 210–214.
- [11] GASH DM, ZANG ZH, OVADIA A, et al. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDMF. *Nature* 1996; **380**: 252–254.
- [12] GROSSMANN M, RAPER S, KOZARSKY K, STEIN E, ENGELHARDT J, MULLER D, LUPIEN P, WILSON J. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nature Genet* 1994; **6**: 335–341.
- [13] HAUBRICH R, McCUTCHAN JA. Sponsor: Viagen Inc. An open-label, phase I/II clinical trial to evaluate the safety and biological activity of HIV-IT (V) (HIV-1 IIIB env/rev retroviral vector) in HIV-1-infected subjects. *Hum Gene Ther* 1995; **6**: 941–955.
- [14] HOOGERBRUGGE PM, VALERIO D, LEVINSKY RJ, HARVEY M, MOSELEY A, SKEOCH CH, FAIRBANKS LD, GASPARI B, MORGAN G, PERIGNON JL, LE DEIST F, DEBREE M, FISCHER A, VAN BEUSECHEM VW. Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency. *Gene Ther* 1996; **3**: 179–183.
- [15] HUI KM, ANG PT, TAY SK. Phase I study of immunotherapy of cutaneous metastases of human carcinoma using allogeneic and xenogeneic MHC DNA-liposome complexes. *Gene Ther* 1997; **4**: 783–790.
- [16] JANTSCHKEFF P, BONGARTZ G, DIETRICH PY, SCHATZ C, MEHTALIM, COURTNEY M, HERMANN R, ROCHLITZ C. Phase I study of cytokine-transfected xenogeneic cells (Vero-IL2) in patients with metastatic solid tumors. *J Mol Med* 1997; **75** (5): B31 (98).
- [17] KREN BT, BANDYOPADHYAY P, STEER CJ. *In vivo* site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Med* 1998; **4**: 285–290.
- [18] LOCHMULLER H, PETROF BJ, PARI G et al. Transient immunosuppression by FK506 permits a sustained high-level dystrophin expression after adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer to skeletal muscles of adult dystrophic (mdx) mice. *Gene Therapy* 1996; **3**: 706–716.
- [19] LU DR, ZHOU JM, ZHENG B, QIU XF, XUE JL, WANG JM, MENG PL, HAN FL, MING BH, WANG XP. Stage I clinical trial of gene therapy for hemophilia B. *Sci China B (China)* 1993; **36** (11): 1342–1351.
- [20] MACKIEWICZ A, GÓRNY A, ŁACIAK M, MALICKI J, MURAWA P, NOWAK J, WIZNEROWICZ RG, HAWLEY PC, HEINRICH SRJ. Gene therapy of human melanoma. Immunization of patients with autologous tumor cells admixed with allogeneic melanoma cells secreting interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *Human Gene Therapy* 1995, **6**: 805–811.
- [21] NESTLE FO, ALIJAGIC S, GILLIET M, SUN Y, GRABBE S, DUMMER R, BURG G, SCHADENDORF D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Med* 1998; **4**, **3**: 328–
- [22] NOWAK J, JANUSZKIEWICZ D, MAZUREK J, ZACHIAK M, MALICKI J, MURAWA P, WIZNEROWICZ M, HEINRICH SRJ, MACKIEWICZ A. Gene therapy of human melanoma – from animal experiments to the clinical trial. Rozdział w książce: Interdisciplinary approaches to gene therapy: legal, ethical and scientific aspects, ed. by S. Muller, J.W. Simon, J.W. Vesting, Springer Verlag Heidelberg 1997: 27–39.
- [23] NOWAK J. Postępy terapii genowej chorób dziedzicznych. *Kosmos* 1994; **43**, **2**: 571–584.

- [24] NOWAK J. Możliwości i perspektywy terapii genowej chorób nowotworowych. *Kosmos* 1995; **44**, 2: 465–478.
- [25] OLDFIELD EH, RAM Z, CHIANG Y, BLAESE RM. Intrathecal gene therapy for the treatment of leptomeningeal carcinomatosis. GTI 0108. A phase I/II study. *Hum Gene Ther* 1995; **6**: 55–85.
- [26] OSTROVE JM. Safety testing programs for gene therapy viral vectors. *Cancer Gene Therapy* 1994; **1**: 125–131.
- [27] PORTEOUS DJ, DORIN JR, MCLACHLAN G, DAVIDSON-SMITH H, DAVIDSON H, STEVENSON BJ, CARTHERS AD, WALLACE WAH, MORALEE S, HOENES C, KALLMEYER G, MICHAELIS U, NAUJOKS K, HOLP, SAMWAYS JM, IMRIE M, GREENING AP, INNES JA. Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 1997; **4**: 210–218.
- [28] ROSENBERG SA, YANG JC, SCHWARTZENTRUBER DJ, HWU P, MARINCOLA FM, TOPALIAN SL, RESTIFO NP, DUDLEY ME, SCHWARZ SL, SPIESS PJ, WUNDERLICH JR, PARKHURST MR, KAWAKAMI Y, SEIPP CA, EINHORN JH, WHITE DE. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature Med* 1998; **4**, 3: 321–325.
- [29] RUBIN J, CHARBONEAU JW, READING C, KOVACH JS. Phase I study of immunotherapy of hepatic metastases of colorectal carcinoma by direct gene transfer. *Hum Gene Ther* 1994; **5**: 1385–1399.
- [30] RUSSELL D, HIRATE RK. Human gene targeting by viral vectors. *Nature Genetics* 1998; **18**: 225–228.
- [31] SABATE O, HORELLOU P, VIGNE E, et al. Transplantation into the rat brain of human neural progenitors that were genetically modified using adenoviruses. *Nature Genetics* 1995; **9**: 256–260.
- [32] SAKIYAMA Y. Clinical study of gene therapy for ADA deficiency. *Arerugi* 1996; **45**: 621–626.
- [33] SCOTT MF, ZWIEBEL JA. Gene therapy of cancer. *Cancer Invest* 1993; **11**: 676–688.
- [34] SIKORA K. Genetic approaches to cancer therapy. *Gene Therapy* 1994; **1**: 149–151.
- [35] TAPSCOTT SJ, MILLER AD, OLSON JM, BERGER MS, GROUDINE M, SPENCE AM. Gene therapy of rat 9L gliosarcoma tumors by transduction with selectable genes does not require drug selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **97**: 8185–8189.
- [36] TUSZYNSKI MH, ROBERTS J, SENUT MC, et al. Gene therapy in the adult primary brain: intraparenchymal grafts of cells genetically modified to produce nerve growth factor prevent cholinergic neuronal degeneration. *Gene Therapy* 1996; **3**: 305–314.
- [37] WEBER F, BOJAR H, PRESACK HB, FLOETH F, LENARTZ D, KIWIT J, BOCK W. Gene therapy of glioblastoma – one year clinical experience with ten patients. *J Mol Med* 1997; **75** (5): B40 (126).
- [38] ZABNER J, COUTURE L, GREGORY R, GRAHAM S, SMITH A, WELSH M. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 1993; **75**: 207–216.

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

KLONOWANIE SSAKÓW STAN OBECNY I PERSPEKTYWY

MAMMALIAN CLONING: NOW AND FUTURE

Maciej KURPISZ, Antoni HORST

Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Streszczenie: W pracy scharakteryzowano pokrótce techniki klonowania oraz postęp w klonowaniu ssaków, zwłaszcza przez transfer diploidalnego jądra z somatycznej komórki zróżnicowanej do cytoplastu. Zarysowano podstawowe problemy w synchronizacji cyklu komórkowego, rekonstruowanego „klonu”, pochodzącego z dwóch różnych typów komórek. Opisano wydajność klonowania w aspekcie uzyskiwania owiec, krów, myszy oraz małpy *Rhesus* oraz zależność powodzenia klonowania od typu komórki służącej jako dawca jądra diploidalnego. Omówiono perspektywy klonowania narządowego, na tle osiągnięć w uzyskiwaniu komórek omni-(toti) potencjalnych (klonowanie terapeutyczne) i ich przypuszczalne zastosowanie w medycynie. Poruszono problemy etyczne, które pojawiły się w związku z rysującymi się możliwościami klonowania reprodukcyjnego u ludzi.

Słowa kluczowe: klonowanie, ssaki, zwierzęta gospodarskie, klonowanie narządowe.

Summary: The techniques of cloning have been briefly characterized as well as recent advances in mammalian cloning, by using diploid nuclear transfer from somatic, differentiated cell to cytoplasm. There are mentioned basic problems resulting from attempts to synchronize the cell cycle in newly reconstructed 'clone' originating from two different types of cells. It is described the cloning efficiency presently obtained for sheep, cow, mouse and *Rhesus* monkey and relationship between a success ratio and a type of donor cell (source of diploid nucleus). It is outlined a perspective for therapeutic cloning, based on recent advances in generation of omni-(toti) potential stem cells. Due to possible applications of cloned tissues (organs) in medicine and possibility of reproductive cloning in humans – new ethical considerations do emerge and have to be carefully discussed.

Key words: cloning, mammals, farm animals, tissue (organ) cloning.

1. WSTĘP

Jeszcze kilka lat temu klonowanie komórek ssaków należało do dziedziny literatury fantastycznej lub wręcz zjawisk zaliczanych do cudów. Za obowiązującą uważano maksymę znakomitego anatomopatologa Virchowa *omnis cellula e cellula eiusdem generis* – co oznacza, że żywa komórka może powstać jedynie z żywej komórki

i co dało początek teorii witalistycznej. Dopiero w połowie dwudziestego wieku odkrycie i złamanie kodu genetycznego przez J. Watsona, F. Cricka i M. Wilkinsa (1953) wskazało, że życie powstaje na zasadzie kodowania białek i innych składników organizmu syntetyzowanych przy udziale materiału genetycznego, czyli DNA, który, jak dzisiaj wiemy, można także uzyskać z elementów materiału nieożywionego.

Klonowanie organizmów w świecie roślin należy do bardzo starych technik hodowlanych i przyczyniło się do wyprodukowania wielu bardzo pożytecznych odmian roślin, stanowiących obecnie podstawę naszego żywienia. Dziś często nie zdajemy sobie sprawy, czy dany produkt jest produktem naturalnie występującym w przyrodzie, czy też w jego powstaniu nie zachodził proces klonowania.

Istotne trudności klonowania wystąpiły dopiero u organizmów wyższych, które dla zachowania swej integralności wytworzyły szereg mechanizmów obronnych, dlatego też ich klonowanie wydawało się podówczas wręcz niemożliwe.

Badania nad transferem jąder komórkowych datują się na lata trzydzieste i następne, kiedy to znany badacz biologii rozwoju Hans Spemann (w roku 1938) sugerował wiodącą rolę jądra komórkowego w kierowaniu procesem rozwojowym i wykazał na oocytach żab i innych płazów, że transfer jądra komórkowego powoduje ich szybki rozwój.

W latach sześćdziesiątych John Gurdon, znany biolog z Oksfordu, przenosząc jądra ze zróżnicowanej tkanki jelita żaby do enukleowanej komórki jajowej, otrzymywał żywe kijanki.

Następne badania nad przeszczepianiem jąder komórkowych u ssaków stanowią już prawdziwą rewolucję, doprowadzając do sklonowania myszy, królika, świni, owcy, kozy, krowy i małpy *Rhesus* [6, 10, 14]. We wszystkich tych przypadkach stosowano technikę enukleacji dojrzałych oocytów I. bądź II. stadium rozwojowego, a jako komórkowych dawców diploidalnego jądra – komórek embrionalnych *in statu nascendi* lub hodowanych *in vitro*. Dopiero od niedawna do klonowania zastosowano również diploidalne jądra ze zróżnicowanych komórek somatycznych.

Wyniki ostatnich badań dowodzą, że problem sklonowania człowieka wydaje się być w zasięgu ręki i jedynie aspekty moralno-etyczne stoją obecnie na przeszkodzie do jego realizacji.

Jednak dla celów *stricte* medycznych największe nadzieje wzbudza możliwość wybiórczego klonowania poszczególnych narządów, przez co możliwa byłaby szeroka i nieszkodliwa wymiana schorzałych narządów na nowe, pobierane obecnie od żywych dawców (np. nerka) bądź ludzkich zwłok.

2. KLONOWANIE SSAKÓW

Klasyczną definicją klonowania jest uzyskanie potomstwa (w świecie roślinnym lub zwierzęcym) drogą aseksualnego rozmnażania. Obecnie definicja klonowania znacznie się poszerzyła i rozumiemy ją także jako utworzenie pewnego produktu,

który jest genetycznie identyczny ze swoim organizmem (komórką) rodzicielskim. W żargonie laboratoryjnym terminem klonowanie możemy także określić namnożenie w warunkach *in vitro* identycznego genetycznie produktu (linia komórkowa o 1-komórkowym rodowodzie) albo też uzyskanie (namnożenie) i wyodrębnienie genu. W świecie żywym, także u ssaków występuje naturalne klonowanie, kiedy to powstają identyczne organizmy potomne (tzw. jednojajowe) bliźnięta, trojaczki itp. Fakt ten powoduje refleksję, że uzyskanie organizmów potomnych, w postaci identycznych, fizycznych kopii nie jest aż taką niezwykłością ani też oryginalną „konstrukcją” myśli ludzkiej. Wyodrębnianie struktur komórkowych (jądra i cytoplazmy) oraz naprzemienne ich łączenie z różnych komórek macierzystych nie jest także szczytem nowatorstwa, bowiem u płazów tę metodę stosuje się od początku lat pięćdziesiątych [1]. Są również akcenty polskie, pochodzące z prac nad rekonstrukcją oocytów, łączonych z jądrem komórkowym innych komórek [15]. Jednak wytwarzanie identycznych kopii organizmów żywych drogą tzw. „transferu” jądra komórki-dawcy do (wcześniej poddanego enukleacji) oocyta, czyli cytoplazmy komórki-biorcy jest tylko jedną z wielu opcji technicznych, która może przyczynić się do wytworzenia identycznego organizmu potomnego. Wiadomo jest bowiem, że na wczesnych etapach rozwoju zarodkowego, każda z komórek (blastomerów) jest zdolna do wytworzenia samodzielnego bytu, kiedy hoduje się ją osobno. Ma ona zdolność multiplikacji i różnicowania w oddzielny organizm, który może być na wczesnym etapie przeniesiony do organizmu zwierzęcia biorczego, które wypełnia funkcję matczyną [11]. W innej technice, tzw. klonowania chimerycznego, możliwe jest utworzenie organizmu-mieszańca, składającego się z kilku komórek tworzących płód (z jednego zarodka) oraz komórek pomocniczych (tworzących później trofoblast) pochodzących z innego organizmu zarodkowego [8]. W innej metodzie, zwanej „diploidyzacją” stosuje się namnożenie haploidalnej gamety, w której po jednokrotnym zapłodnieniu komórki jajowej [9] usuwa się jedno z przedjądrzy, a następnie doprowadza do replikacji DNA, przy równoczesnym zahamowaniu pierwszej cytokinezy mitotycznej, cytochalazyną B.

Najbardziej popularną i najpowszechniej stosowaną obecnie metodą jest transplantacja jądra komórkowego diploidalnej komórki-biorcy i wprowadzenie jej do tzw. cytoplastu, tj. komórki biorczej zawierającej jedynie cytoplazmę (np. oocytu po enukleacji). Taką też techniką uzyskano słynną owieczkę Dolly [19]. Jednakże najwyższą trudnością procedury uzyskiwania organizmu potomnego z zrekonstruowanego oocyta są skomplikowane relacje zachodzące między jądrem komórki-dawcy a cytoplazmą komórki-biorcy, które znajdują się w różnej fazie aktywności metabolicznej [2]. Najprostszym sposobem na obniżenie różnic pomiędzy stanem aktywności jądra i cytoplazmy, pochodzących z 2 różnych komórek, jest manipulowanie kinazami cyklu komórkowego w cytoplazmie komórki-biorcy w okresie rekonstrukcji, przy czym najważniejszą jest modulacja aktywności czynnika MPF (*maturation promoting factor*), obecnego w cytoplazmie komórki jajowej. Czynniki MPF

jest główną kinazą komórkową, odpowiedzialną za rozpad błony jądrowej i kondensację chromatyny w komórkach mitotycznych i mejotycznych [12]. Stwierdzono, że w rekonstrukcji jądro-cytoplazma, pochodzących od 2 różnych komórek, dla powodzenia eksperymentu nieodzowny jest brak aktywności MPF bądź jego bardzo wysoki poziom. Na przykład sprzyjającą synchronizacji jest inaktywacja MPF w oocycie, w stadium metafazy występująca na krótko po penetracji plemnika do komórki jajowej [5]. W powodzeniu doświadczeń Wilmuta i wsp. z owcą Dolly kluczową sprawą było zapewnienie optymalnego stanu synchronizacji między jądrem komórki dawcy a cytoplazmą, zwłaszcza gdy jądro pochodziło od komórki somatycznej, a nie totipotencjalnej. (Znany jest fakt, że duże powodzenie klonowania z wykorzystaniem np. blastomerów wiąże się z sytuacją, że na etapie moruli komórki te pozostają w stadium interfazy, przy czym cytoplazma pozbawiona jest aktywności MPF [2]). Wyciszenie komórki-dawcy w fazie G0 (wygaszenie czynności metabolicznych) i następową aktywacja „klonu” zarodkowego (pulsami elektrycznymi) w kilka godzin po połączeniu spełniają powyższe warunki synchronizacji cyklu komórkowego obu składowych [3], co zostało następnie potwierdzone, w przypadku rekonstrukcji cytoplazmy oocyta z jądrem komórki somatycznej gruczołu sutkowego 6-letniej owcy matki [19].

Innym interesującym problemem (i krytycznym dla wyniku klonowania u ssaków) jest typ komórek wykorzystywanych jako źródło diploidalnego jądra, służących do rekonstrukcji klonu. W przypadku owcy były to komórki nabłonkowe gruczołu sutkowego (efektywność klonowania – 3,4%), płodowych fibroblastów (efektywność klonowania – 5,9%) oraz komórki embrionalne (efektywność klonowania – 5,6%) [19]. W przypadku innych zwierząt gospodarskich (krów) dokonywano prób przy użyciu jąder diploidalnych z komórek nabłonka jajowodów oraz wzgórek jajonośnego [7]. W prawidłową blastocystę rozwinęło się o połowę mniej zarodków, pochodzących z rekonstruowanych „klonów” z jąder komórek jajowodowych w stosunku do komórek wzgórek jajonośnego. Inny cykl doświadczeń dla uzyskania klonowanych krów odbył się z użyciem płodowych fibroblastów [4], w którym wykazano, że obok zakończonych sukcesem doświadczeń z wygaszaniem aktywności metabolicznej jądra od komórek-dawcy (wprowadzanie w fazę G0), uzyskano również pozytywne wyniki, gdy źródłem diploidalnego jądra były fibroblasty aktywnie dzielące się. Następnie wykazano, że sukces klonowania zależy od zablokowania czynności metabolicznych na etapie G1 cyklu komórkowego, o ile zablokowanie cyklu życiowego jest wystarczająco długie. Zastanawiający jest wyjątkowo wysoki odsetek żywych cieląt, uzyskanych od stadium blastocysty do żywych urodzin (w sumie przetrwało 40% cieląt) w doświadczeniach Kato i wsp. [7]), gdy diploidalne jądra pochodziły z komórek-dawców pozostających w bliskim sąsiedztwie z komórką jajową (jajowód, wzgórek jajonośny). Pozostaje otwarte pytanie, czy efektywność ta spowodowana jest lepszą szansą na zsynchronizowanie metaboliczne, zachodzące pomiędzy tymi komórkami pozostającymi w organizmie w bardzo bliskim sąsie-

dztwie. Pewnym potwierdzeniem dla tej hipotezy jest cykl doświadczeń z klonowaniem myszy [18]. W tych doświadczeniach jako źródło jąder służyły komórki Sertolego, neurony oraz komórki wzgórka jajonośnego. W efekcie jedynymi sklonowanymi osobnikami mysimi były zwierzęta, które „zaprogramowane” zostały materiałem genetycznym, pochodzącym z komórek wzgórka jajonośnego (efektywność klonowania 2–3%). W przypadku pozostałych komórek płody nie przeżywały wczesnych stadiów organogenezy.

Zrozumiałym zainteresowaniem środowiska naukowego cieszyły się udane doświadczenia z klonowaniem małpy *Rhesus*, które mogą przynieść nieograniczone źródło genetycznie identycznych kopii organizmów należących do naczelnych [20]. W tym jednakże przypadku źródłem dla diploidalnego jądra stała się linia komórkowa zarodkowych komórek niezróżnicowanych (ES – *embryonic stem cell*) uzyskana z blastocysty małpy po zapłodnieniu *in vitro*. Jednak wydajność uzyskiwanych tą drogą organizmów nie była tak wysoka, jak oczekiwano i mierząc efektywność w postaci żywych płodów w stosunku do liczby transferów zarodkowych wyniosła tylko 3,8%, a więc była porównywalna z uzyskaną dla owcy. W drugim etapie doświadczeń uzyskano także klony małpy *Rhesus*, posługując się diploidalnymi jądrami pochodzącymi z płodowych lub dojrzałych fibroblastów. Niemniej, we wszystkich zebranych tu i opisanych doświadczeniach nadal podstawowym problemem dostarczania identycznych genetycznie organizmów ssaków drogą rozmnażania aseksualnego jest niska efektywność procedury klonowania. Stanowi to w tej chwili bardzo silną zaporę dla ewentualnych prób klonowania człowieka lub też organizmów genetycznie modyfikowanych (wprowadzanie transgeny czy też ukierunkowanej mutagenezy w jądrze komórki-dawcy).

3. KLONOWANIE NARZĄDOWE

Największe zainteresowanie współczesnej medycyny, a także firm biotechnologicznych budzą jednak komórki omni-(toti) potencjalne, które stanowią początek dla każdego typu komórki, tkanki, a w konsekwencji narządu. Historycznie istnieją trzy określenia dla komórek omnipotentnych (w zależności od ich pochodzenia). Jako macierzyste komórki embrionalne (EG – *embryonic stem cells*) określa się komórki pochodzące z bardzo wczesnego okresu zarodkowego (utrzymują się jeszcze krótko po implantacji); komórki EC (*embryonal carcinoma*) są również komórkami omnipotentnymi, jednak są one uzyskiwane z linii nowotworowych wczesnego etapu zarodkowego; komórki EG (EG – *embryonic germ cell*) wyosabia się z płodowych komórek germinalnych (rozrodczych). Wszystkie wymienione typy komórek mają nieograniczony potencjał proliferacyjny i zdolność do różnicowania w kierunku wszystkich 3 listków zarodkowych.

W uzyskujących najwięcej uwagi badaniach dotyczących otrzymywania omnipotentnych komórek u naczelnych, szczególny rozgłos dotyczył prac Thomsona

i wsp. [16], którzy uzyskali linię komórkową z blastocysty 15-letniej małpy *Rhesus*, wypłukanej z jajowodu po 6 dniach od owulacji. Komórki trofektodermy usuwano technikami immunologicznymi, podczas gdy komórki warstwy wewnętrznej przesiewano i klonowano *in vitro* na mikroplątkach. Sklonowaną linię komórkową zakodowano pod nazwą R278,5 i pozostała ona niezróżnicowana przez ponad 1 rok hodowli zatrzymując charakterystykę ES. Co ciekawe, gdy komórki R278,5 podano myszom o upośledzonej odporności (SCID – *severe-combined immunodeficiency mice*) komórki te różnicowały się w kierunku tkanek pochodzących ze wszystkich 3 listków zarodkowych, w zależności od środowiska.

Dla uzyskania komórek omnipotencjalnych u człowieka posłużono się trzema różnymi sposobami. Grupa Shambloott i wsp. [13], w roku 1998 izolowała pierwotne komórki germinalne (PGC – *primordial germ cells*) z tzw. grzebienia gonadalnego, w 5–9 tygodni po zapłodnieniu (z płodu, który uległ aborcji). Podobnie, jak poprzednio, komórki przesiewano, hodowano *in vitro* w obecności czynników wzrostu oraz klonowano uzyskując hodowle, przypominające mysie komórki omnipotencjalne typu ES (EG). Charakterystyka ciałek wtrętowych zaświadczała o pochodzeniu komórek ze wszystkich listków zarodkowych.

Drugi sposób otrzymywania ludzkich ES był identyczny jak w przypadku u niższych naczelnych [17], tj. przez wyosabnianie komórki z blastocysty, z kolei zaś zarodek ludzki uzyskiwano drogą konwencjonalnego zapłodnienia pozaustrojowego (IVF). Morfologicznie (oraz porównując markery komórkowe) komórki te były niezwykle podobne do uzyskanych ES z małpy *Rhesus*. Jednak, najwięcej wrzawy prasowej, spowodowała informacja z roku 1998, kiedy to ludzkie komórki ES uzyskano z międzygatunkowej hybrydy po dokonaniu transferu jądra ludzkiej komórki somatycznej do enukleowanego oocyta krowiego. Taka hybryda oczywiście nie ma szans na przeżycie, niemniej może stać się dość wygodną drogą uzyskiwania ludzkich komórek ES. Dla niektórych zaś osób taka międzygatunkowa rekonstrukcja jest bardziej akceptowalna niż hodowanie dla podobnych celów wczesnego zarodka człowieka.

„Klonowanie międzygatunkowe” nie jest celem samym w sobie. Uzyskiwane tą drogą komórki mogą różnicować się w kierunku tkanek nabłonkowych (endoderma), mięśni, tkanki chrzęstnej i kostnej (mezoderma), tkanki nerwowej (ektoderma). Pozostawione bez czynników wzrostu, komórki takie ewoluują w kierunku komórek mięśniowych, tkanki nerwowej czy chrząstki. Jednak pozostawione w odpowiednim mikrośrodku, natychmiast odpowiadają na lokalne czynniki wzrostu, i tak na przykład pierwotne komórki neuronalne w środowisku szpiku kostnego mogą rozwinąć się w komórki krwi, a komórki zrębu szpiku kostnego przemieszczone na teren mózgu przekształcają się w komórki gleju [21]. Z kolei komórki szpiku kostnego poddane działaniu nerwowego czynnika wzrostu przekształcają się w neurony. Stąd już teraz rozważa się podawanie omnipotentnych komórek człowieka celem uzupełnienia tkanki schorzałych narządów, np. podawanie pierwotnych ko-

mórek mięśniowych do zwyrodniałego mięśnia sercowego czy też ograniczone transplantacje pierwotnych komórek neuronalnych w chorobie Parkinsona. W utrudnionej regeneracji chrząstki czy niegojących się złamań kości, komórki takie mogą stanowić naturalne uzupełnienie brakującej tkanki. Z dalszych badań wynikają wnioski, że być może wkrótce nauczymy się izolować pierwotne, omnipotentjalne (macierzyste) komórki niezarodkowe. I tak stwierdzono, że pierwotne komórki neuronalne, pod wpływem odpowiednich czynników wzrostu mogą wytwarzać komórki krwi, a omnipotentne komórki szpiku kostnego mogą stać się prekursorami wątroby czy kości, tak więc być może tzw. klonowanie terapeutyczne zaniknie jako konieczność uzyskiwania komórek omnipotentnych. Tymczasem nieocenieni Japończycy dokonali następnego skoku cywilizacyjnego, hodując w obecności kwasu retynowego (związek pokrewny witaminie A) zawiązki oczu, aż wreszcie uzyskali z żabich komórek ES w naczyniu laboratoryjnym (medium z kwasem retynowym i aktywiną) gotowe nerki. Narządy wszczepione do kijanek – znakomicie funkcjonowały. Fakty te przy nieprawdopodobnym wręcz nagłośnieniu prasowym mieszają się z jawą i rzeczywistością, niemniej wizja pełnych pól autologicznych narządów przybliżyła się z przerażającą wręcz prędkością.

4. KONTROWERSJE ETYCZNE

Na zakończenie należy zająć stanowisko i postawić pytanie, jak współczesny świat nauki zapatruje się na problem klonowania. Jak w przypadku każdej nowej nauki, tym bardziej nauki rewolucjonizującej nasze dotychczasowe poglądy na istotę życia jest oczywiste, że gdy nie znamy konsekwencji, przy każdym *novum* ogarnia nas przede wszystkim lęk. Potem pojawia się pytanie, do czego nas dane osiągnięcie prowadzi, jakie będą jego skutki – korzystne czy też niekorzystne, a nawet czy wprowadzenie tych nowości w życie nie stanie się dla ludzkości zgubą. Z drugiej strony jednak, jak to wynika z dotychczasowych osiągnięć, nauka odgrywa absolutnie kluczową rolę w poznaniu procesów życiowych. Właśnie z tego względu nauka o klonowaniu staje się pewnego rodzaju dźwignią podważającą ugruntowane poglądy na istotę życia. Nowoczesna nauka o rozrodzie zrobiła ostatnio tak duże postępy, że faktycznie zanika dawna ostra granica między żywym a martwym, co innymi słowy przeczy słynnemu ongiś twierdzeniu Virchowa. Stąd budzą się obawy i zastrzeżenia, zwłaszcza że dotyczy to człowieka uważanego w wielu wierzeniach i większości kultur za istotę stojącą na samym szczycie świata żywego, a do której nie stosują się zwykłe prawa fizyki i chemii obowiązujące w świecie nieorganicznym, a nawet u niższych żywych organizmów. Stąd rozważania etyczne dotyczące rozrodu człowieka budzą tak wiele kontrowersji. Jedna grupa uczonych jest stanowczo przeciwna kreowaniu życia przez człowieka w laboratoriach, ale są i inni, którzy w tych badaniach widzą ogromną przyszłość dla nauk biologicznych, przy czym w tym samym państwie może istnieć dualizm poglądów. Takim przykładem są USA,

gdzie z jednej strony istnieje zakaz finansowania badań nad klonowaniem z funduszy państwowych, ale jednocześnie dozwolone jest ich finansowanie z funduszy prywatnych.

Z końcem ostatniego dziesięciolecia normy etyczne w zakresie genetyki człowieka ewoluowały z taką samą złożonością, jak badania ludzkiego genomu. Szybki rozwój genetyki pozwala w niedalekiej przyszłości na poznanie indywidualnego osobnika, na poziomie jego materiału genetycznego. Postępy genetyki, w zastosowaniu do wszystkich organizmów żywych, pozwalają na określenie definicji integralności wszystkich gatunków, w tym również człowieka.

Istniejące przepisy (Deklaracje Helsińskie z 1964 roku oraz z roku 1997) wymagają przemyślenia celem wypracowania bardziej współczesnych norm bioetycznych, uwzględniających niezależnie od czysto etycznych elementów również efekty ekonomiczne, jak i potrzeby nauk medycznych.

Na zakończenie autorzy postulują przemyślenie na nowo problem integracji gatunkowej oraz tego, co czyni nas ludźmi. Jakie kryteria czynią nas bowiem specjalnym gatunkiem ludzkim?

Szybki rozwój biotechnologii w ostatnich latach zmusza nas do rozpatrywania tych zagadnień łącznie, a związek między osiągnięciami naukowymi a ekonomicznymi, staje się dla obu bardzo ważnym problemem. Kooperacja pomiędzy tymi dziedzinami opiera się w USA głównie na ekonomii i zaspokojeniu rynku. W 1997 roku publiczne placówki badawcze liczyły jedynie 37% całej produkcji biomedycznej. Dane te zmuszają do aktywnej kooperacji między instytucjami naukowymi a firmami biotechnologicznymi i stymulowania przejścia osiągnięć laboratoryjnych do praktyki.

Możliwość uzyskania wielu danych genomowych, co stanowi podstawę uzyskania wielu danych medycznych, stwarza szansę lepszego zrozumienia procesu chorobowego i tym samym leczenia. Z drugiej jednak strony powstają nowe kwestie socjalne i prawne. Badania genomu wskazują, że geny są specyficzne dla danych populacji, stąd ich zarówno duże znaczenie duchowo-kulturowe, jak i komercyjne. Stąd przeznaczenie materiału genetycznego i ich wykorzystanie powinno być uzgodnione z danym pacjentem, jak również sposób użycia tego materiału do celów komercyjnych. Ostrożność z uzyskiwaniem materiału biologicznego do celów komercyjnych winna iść w parze z przeciwstawianiem się każdym próbom ideologizacji nauki z jakiegokolwiek powodu.

LITERATURA

- [1] BRIGGS R, KING TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1952; **38**: 455–463.
- [2] CAMPBELL KHS, RITCHIE WA, WILMUT I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: Implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol Reprod* 1993; **49**: 933–942.

- [3] CAMPBELL KHS, LOI P, OTAEGUI PJ, WILMUT I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev Reprod* 1996; **1**: 40–46.
- [4] CIBELLI JB, STICE SL, GOLUEKE PJ, KANE JJ, JERRY J, BLACKWELL C, ABEL PONCE DE LEON F, ROBL JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; **280**: 1256–1258.
- [5] COLLAS P, SULLIVAN EJ, BARNES FL. Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Mol Reprod Dev* 1993; **34**: 224–231.
- [6] DI BERARDINO MA. Genomic potential of differentiated cells. New York: Columbia University Press 1997.
- [7] KATO Y, TANI T, SOTOMARU Y, KUROKAWA K, KATO J-Y, DOGUCHI H, YASUE H, TSUNODA Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998; **282**: 209–212.
- [8] MARKERT CL, PETTERS RM. Manufactured hexaparental mice show that adults are derived from three embryonic cells. *Science* 1978; **202**: 56–58.
- [9] MARKERT CL, SEIDEL GE Jr. Parthenogenesis, identical twins, and cloning in mammals. [w] Brackett BG, Seidel Jr. GE, Seidel SM [red.] *New Technologies in Animal Breeding*. New York: Academic Press 1981; 181–200.
- [10] MENGL, ELY JJ, STOUFFER RL, WOLF DP. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biol Reprod* 1997; **57**: 454–459.
- [11] MULLEN RJ, WHITTEN WK, CARTER SC. Studies on chimeric mice and half-embryos. [w] *Annual Report of the Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME* 1970: 67–68.
- [12] NURSE P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990; **344**: 503–508.
- [13] SHAMBLOTT MJ, AXELMAN J, WANG S, BUGG EM, LITTLEFIELD JW., DONOVAN PJ, BLUMENTHAL PD, HUGGINS GR, GEARHART JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13726–13731.
- [14] SUN FZ, MOOR RM. Nuclear transplantation in mammalian eggs and embryos. *Curr Top Dev Biol* 1995; **30**: 14–176.
- [15] TARKOWSKI AK, BALAKIER H. Nucleo-cytoplasmic interactions in cell hybrids between mouse oocytes, blastomeres, and somatic cells. *J Embryol Exp Morphol* 1980; **55**: 319–330.
- [16] THOMSON JA, KALISHMAN J, GOLOS TG, DURING M, HARRIS CP, BECKER RA, HEARN JP. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7844–7848.
- [17] THOMSON JA, MARSHALL VS. Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol* 1998; **38**: 133–165.
- [18] WAKAYAMA T, PERRY ACF, ZUCCOTTI M, JOHNSON KR, YANAGIMACHI R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; **394**: 369–374.
- [19] WILMUT I, SCHNIEKE AE, Mc WHIR J, KIND AJ, CAMPBELL KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; **385**: 810–813.
- [20] WOLF DP, MENG L, OUHIBI N, ZELINSKI-WOOTEN M. Nuclear transfer in the *Rhesus* monkey: practical and basic implications. *Biol Reprod* 1999; **60**: 199–204.
- [21] VOGEL G. Harnessing the power of stem cells. *Science* 1999; **283**: 1432–1434.

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

POSZUKIWANIE GENÓW ODPOWIEDZIALNYCH ZA CECHY PSYCHICZNE CZŁOWIEKA ORAZ CECHY INSTYKNTOWNE ZWIERZĄT*

SEARCHING FOR GENES RESPONSIBLE FOR PERSONALITY
TRAITS IN HUMANS AND INSTINCTIVE TRAITS IN ANIMALS

Piotr GRONEK¹, Ryszard SŁOMSKI^{2, 3}

¹ Katedra Hodowli i Produkcji Trzody Chlewnej, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań; ² Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań; ³ Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Streszczenie: W pracy przedstawiono zagadnienia związane z poszukiwaniem nowych genów odpowiedzialnych za cechy zachowania ludzi i zwierząt. Zwrócono szczególną uwagę na trudności metodyczne oraz podjęto próbę wyjaśnienia niektórych problemów pojawiających się podczas mapowania genów odpowiedzialnych za zachowanie się.

Słowa kluczowe: cechy osobowości, cechy instynktowne, metodyka poszukiwania genów, problemy metodyczne

Summary: The paper presents issues connected with the search for new genes responsible for personality traits in humans and instinctive traits in animals. The research focused on selecting appropriate investigation methods. An attempt was made to clarify some problems arising in the process of mapping genes responsible for behaviour.

Key words: personality traits, instinctive traits, strategies of mapping, methodology problems

INSTYKNT A OSOBOWOŚĆ

Podejmując badanie genetycznego podłoża zachowania ludzi lub zwierząt, nawet doświadczony eksperymentator staje przed szeregiem problemów. Już na początku

*Wykład wygłoszony podczas XI Szkoły Letniej: Postępy Biologii Molekularnej. Poznań, 23-27 sierpień 1999

pracy wątpliwość może budzić fakt, czy analizowana cecha jest cechą psychiczną czy instynktowną. Instynkt jest głęboko zakodowanym algorytmem rozwiązywania najbardziej podstawowych problemów. Należy zauważyć, że życie osobnika składa się z szeregu problemów (fizycznych, emocjonalnych, intelektualnych, koordynacyjnych, wolicjonalnych itp.), które organizm próbuje rozwiązać. Rozwiązanie (lub też nie rozwiązanie) większości z nich nie jest kluczowe dla procesu przeżycia. Te problemy, których rozwiązanie jest fundamentalne dla przeżycia jednostki lub gatunku, są rozwiązywane automatycznie dzięki zachowaniu instynktownemu. Jest ono wrodzone i nie zależy od wpływu środowiska. Rozróżnienie między cechą psychiczną a instynktowną nie jest jednoznaczne. Jako przykład niech posłuży agresja. Jest ona instynktowna. Jednak szereg zachowań, takich jak: irytacja czy nieprzychylność jednej osoby w stosunku do drugiej, które są przejawem cech osobowości, także ocierają się o zachowanie agresywne. Rozgraniczenie jest zatem dosyć trudne. Podobnie niełatwe jest rozróżnienie instynktownego popędu płciowego od takich cech psychicznych, jak: nadmierna pobudliwość seksualna lub seksizm itp. [4].

Problemem w badaniach genetycznego podłoża cech osobowości (o czym w dalszej części artykułu) lub cech instynktownych zwierząt jest także wybór obiektywnego testu. Załóżmy, że eksperymentator zamierza zmapować gen/y odpowiedzialny/e za płochliwość kury. Jaki zastosować obiektywny test klasyfikujący zwierzęta na płochliwe i nie płochliwe? Dla przykładu w prostym „teście ołówkowym” – eksperymentator zbliża rękę, w której trzyma ołówek, do klatki i obserwuje reakcję zwierzęcia. Test ten umożliwia określenie płochliwości bez wyjmowania kur z klatek. Płochliwość jest mierzona przez określenie stopnia wycofywania się lub ucieczki ptaka w klatce pod wpływem zbliżającego się człowieka lub pokazywania nieznanego mu przedmiotu (np. ołówek) od przodu klatki [15, 30, 34, 35, 59]. Test ten jest łatwy do przeprowadzenia i nie powoduje istotnego zakłócenia w życiu ptaka, co jest ważne w procesie produkcyjnym na fermie. Czy jednak taki test może być źródłem oceny nie pozostawiającej najmniejszych wątpliwości, czy osobnik został zakwalifikowany do właściwej grupy doświadczalnej?

Widać zatem, że podczas badań genetycznych podstaw zachowania się, czekają na badacza liczne pułapki, towarzysząc mu aż do momentu interpretacji wyników, kiedy to uwidaczniają się ze szczególną siłą.

BADANIE GENETYCZNEGO PODŁOŻA ZŁOŻONYCH FORM ZACHOWAŃ

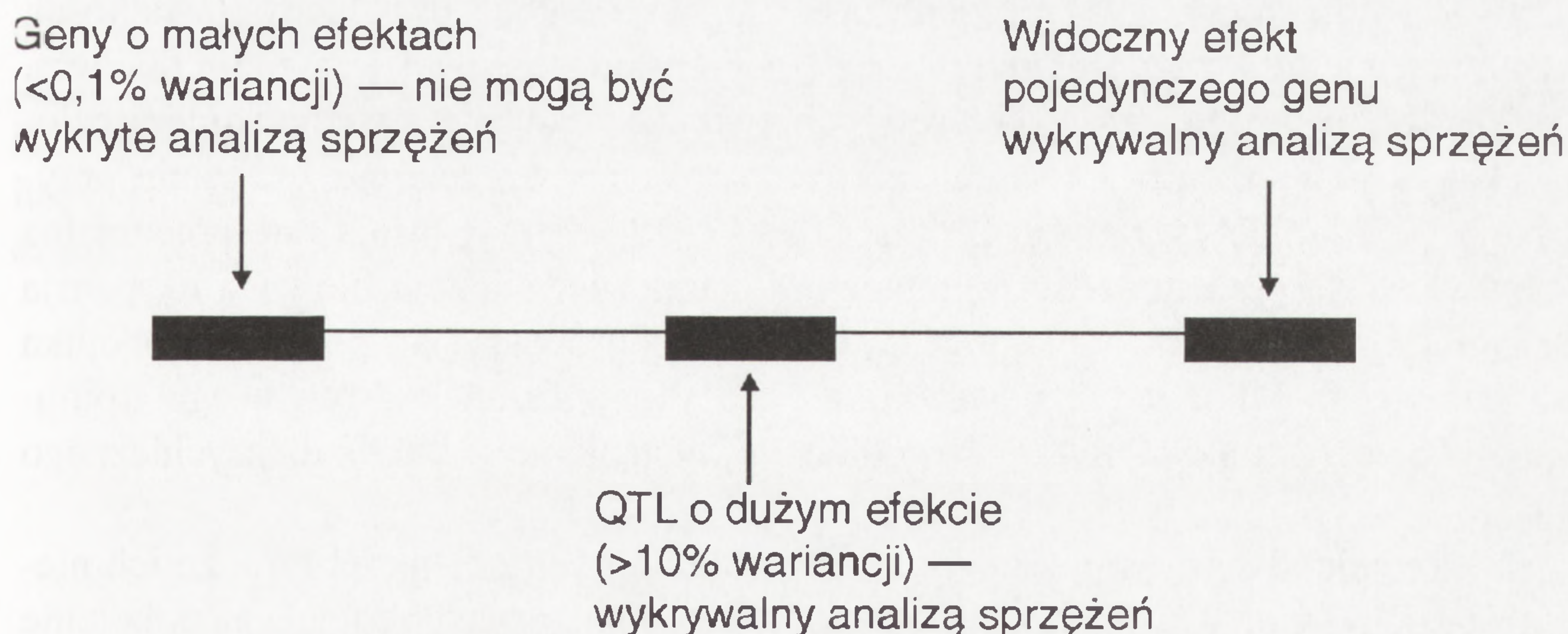
Przez mapowanie rozumie się określenie miejsca genu na chromosomie (mapowanie fizyczne) lub odległości (mierzonej w cM) pomiędzy określonymi genami

lub markerami (mapowanie genetyczne). W przypadku badania złożonych kompleksów zachowań człowieka najczęściej analizuje się geny kandydujące.

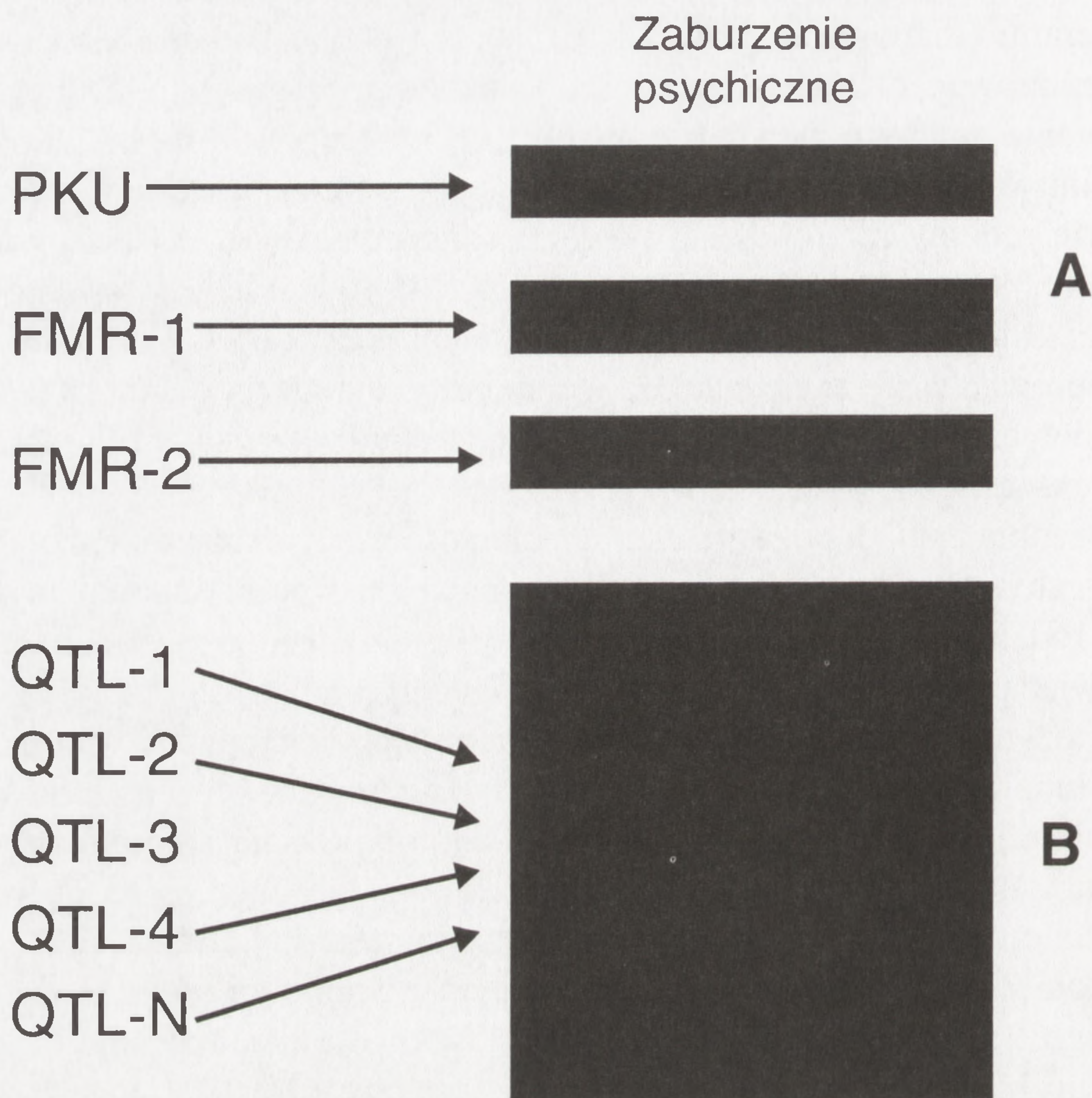
Mapowanie genów odpowiedzialnych za cechy zachowań nie różni się od mapowania innych cech. Pierwszym krokiem jest zebranie materiału rodzinnego. Przodkowie rodziny referencyjnej powinni charakteryzować się skrajnymi wartościami cech. W przypadku zwierząt, najczęściej są to z jednej strony osobnik rasy szlachetnej z drugiej pierwotnej. W celu ustalenia prawdopodobnej lokalizacji genów, przeprowadza się analizę zależności między segregacją polimorficznych markerów genetycznych i badaną cechą. W optymalnym doświadczeniu analizuje się jak największą liczbę cech i markerów.

Odpowiednia analiza pozwala ustalić odległość genetyczną pomiędzy markerem a hipotetycznym genem. Niestety analiza sprzężeń nawet na odpowiednio licznych materiale rodzinnym nie ma wysokiej mocy detekcji genu, jeśli analizowany gen nie odpowiada za większą część wariacji genetycznej (rys. 1).

Warto rozważyć, jakiemu typowi dziedziczenia podlegają geny warunkujące zachowanie ludzi i zwierząt. Cechy jakościowe uwarunkowane są często jednym genem. Przykładowo, jeśli jeden gen odpowiada za chorobę (cecha jakościowa), jego poszukiwania zawężają się do typu dziedziczenia – jeden gen jedna choroba (ang. *one gene one disorder*: OGOD) (rys. 2). Dziedziczenie OGOD zakłada, że jeden gen jest koniecznym i zarazem wystarczającym czynnikiem powstania zaburzenia [51]. Innego traktowania wymagają cechy ilościowe uwarunkowane dużą i bliżej nieznaną liczbą genów (ang. *quantitative trait locus*: QTL), z których żaden nie jest wystarczający do rozwoju cechy. Oba typy dziedziczenia (OGOD i QTL) charakteryzują się korzystnymi i ujemnymi cechami w procesie identyfikacji genów.



RYСУNEK 1. Analiza sprzężeń wykrywa geny o dużych i średnich efektach



RYSUNEK 2. Typ dziedziczenia OGOD (A) i typ dziedziczenia QTL (B)

W przypadku cech ilościowych możliwa jest identyfikacja genów o dużych efektach. Prawdopodobieństwo wykrycia genu zależy m.in. od badanej populacji, jej wielkości, struktury, efektu i częstości genu i lokalizacji chromosomowej względem markera.

Markerami drugiej grupy, które wydają się zasocjowane z zachowaniem człowieka, są powtórzenia sekwencji mikrosatelitarnych. Szczególne znaczenie przypisuje się trinukleotydom CAG oraz CCG [7, 17, 18, 54]. Mają one potencjalną możliwość do przechodzenia w mutacje dynamiczne. Niekontrolowana ekspansja sekwencji, zachodząca w ciągu kilku pokoleń, doprowadza do powstania odcinka zawierającego kilkaset lub nawet kilka tysięcy powtórzeń podstawowego trójnukleotydowego motywu [64]. Powoduje to wystąpienie zaburzenia psychicznego [41].

Niezwykłość tego typu sekwencji mikrosatelitarnych polega na tym, że ich niestabilność wzrasta wraz z liczbą powtórzeń. Postępującemu z pokolenia na pokolenie wydłużaniu się motywu towarzyszy wzrost tempa ekspansji [19, 28, 29, 31]. Proces ten sprawia, że mutacja dynamiczna nie jest pojedynczym epizodem, jak w przypadku innych mutacji, ale wieloetapowym zjawiskiem ze wzrastającym prawdopodobień-

stwem wystąpienia kolejnych etapów. W niektórych chorobach proces rozpoczyna się od stanu premutacji, kiedy to sekwencja mikrosatelitarna ma długość pośrednią między stanem normalnym a pełną mutacją. Nie wywołuje to objawów choroby, ale powoduje dużą niestabilność, która może objawić się w następnym pokoleniu pod postacią pełnej mutacji. Na przykład w zespole łamliwego chromosomu FRAXA normalny polimorfizm obejmuje od 6 do ok. 50 powtórzeń, premutacja od ok. 50 do ok. 230, stan powyżej 230 powtórzeń stanowi już pełną mutację objawiającą się chorobą. Interesujące jest, że to czy premutacja przejdzie w mutację w kolejnym pokoleniu, często zależy od tego, czy jest przekazana w linii ojcowskiej czy matecznej. Dokładne mechanizmy, które są przyczyną ekspansji, nie są jeszcze poznane. Sugeruje się m.in. wpływ struktur drugorzędowych (tworzonych przez te sekwencje) na proces replikacji, szczególnie dla nici opóźnionej podczas usuwania odcinków starterowych i łączenia fragmentów Okazaki. Przekroczenie pewnej określonej dla danej choroby liczby powtórzeń trójnukleotydowego motywu prowadzi do zaburzenia ekspresji lub uszkodzenia produktu genu, w którym powtórzenie występuje. Omawiane powtórzenia znajdują się albo w eksonach i ulegają ekspresji jako ciąg pojedynczego aminokwasu w białku (zwykle odcinki poliglutaminy), lub są zlokalizowane w obszarach nie ulegających translacji (5' lub 3' UTR, bardzo rzadko introny). Jedną z tez wyjaśniających niekorzystny wpływ powtórzeń zlokalizowanych w eksonach jest agregacja produktów białkowych zawierających jednorodne łańcuchy zbudowane z glutaminy, która sprawia, że białko traci swoją aktywność. Może to być także zwykłe upośledzenie funkcji białka lub całkowita jego inaktywacja.

Charakter mutacji dynamicznych sprawia, że choroby nimi wywołane nie dziedziczą się w sposób mendlowski. Obserwuje się tu zjawisko antycypacji, czyli pojawianie się choroby w coraz to młodszym wieku i z cięższym przebiegiem w kolejnych pokoleniach [44]. W większości są to choroby dominujące. Poznane dotychczas choroby to schorzenia neurodegeneracyjne. Zastanawiający jest fakt, dlaczego tego typu mutacje dają taki przebieg. Nie można wykluczyć, że istnieją inne geny, w których tego typu mutacje zachodzą, ale mają charakter recesywny lub ich wpływ jest trudny do zauważenia, a zatem ginie wśród innych domniemanych czynników.

BADANIA ZŁOŻONYCH KOMPLEKSÓW ZACHOWAŃ CZŁOWIEKA

Opisanie osobowości oczywiście nie jest łatwe. Problem wynika między innymi z różnic w temperamencie, który można rozumieć jako dynamiczną organizację układów psychobiologicznych, regulujących automatyczne reakcje na bodźce emocjonalne [12]. Osobnicze cechy uznaje się w pewnym stopniu za dziedziczne i

niezmienne w ciągu życia, niezależne od kultury, czy grupy etnicznej [12, 61]. Zdaniem niektórych autorów temperament charakteryzuje się stosunkowo prostą architekturą genetyczną [9]. Zauważmy, że życiowe doświadczenia powodują powstanie pomiędzy wszystkimi jego wymiarami wzajemnych zależności. Wówczas, nawet w przypadku pojawienia się słabych korelacji w sieci wielu dziedzicznych wymiarów powstaje złożona nieliniowa dynamika temperamentu, ponieważ każda osoba reaguje na przeżycia z różnorodnymi motywacjami, które czasem są ze sobą w konflikcie. Próbuje się te zależności zrozumieć i nauczyć projektować algorytm zachowań. Korelacje pomiędzy wymiarami ograniczają rozwój charakteru, tak że repertuar prawdopodobnych kierunków jego rozwoju jest zawężony w skomplikowany, ale, także naszym zdaniem, w przewidywalny sposób.

Przez wiele lat psychologowie nie mogli dojść do porozumienia, które z cech osobowości należy uznać za najważniejsze. Ostatecznie ustalono pięć wiodących „cech” („super czynników”) koniecznych do opisu ludzkiej osobowości [3]. Są nimi ekstrawertyzm (ang. *extraversion*), neurotyzm (ang. *neuroticism*), zgodność (ang. *agreeableness*), sumienność (ang. *conscientiousness*) i otwartość (ang. *openness*).

Podstawowym narzędziem w omawianych badaniach genetycznego uwarunkowania cech osobowości są kwestionariusze. Uważa się, że prawidłowo skonstruowana i wypełniona ankieta dostarcza pełnej i obiektywnej informacji z zakresu osobowości i zachowania się jednostki. Najczęściej stosowane są dwa typy kwestionariuszy (tab. 1). Pierwszy, trójwymiarowy kwestionariusz osobowości (ang. *tridimensional personality questionnaire* – TPQ) został zaproponowany przez Cloningera [10, 11]. Opiera się on na biologicznym modelu, w którym trzy niezależne wymiary temperamentu przypisuje się odmiennym genetycznie i neurochemicznie szlakom [10, 11]. Drugi rodzaj kwestionariusza osobowości – NEO-PI-R – jest oparty na hierarchicznym pięcioczynnikowym (Neurotyzm, Ekstrawertyzm, Otwartość, Zgodność, Sumienność) modelu struktury osobowości [14]. Każdy z czynników podzielono na sześć aspektów (w tabeli 1 przykładowo pokazano aspekty Ekstrawertyzmu i Sumienności). Struktura jego czynników została weryfikowana w rozmaitych populacjach i kulturach. Przyjmuje się, że korelacja pomiędzy samooceną a oceną obserwatora jest dodatnia [43]. Mimo to występują poważne problemy związane z uzyskaniem powtarzalności wyników przy zastosowaniu nawet tych samych ankiet i analogicznych obserwacji [21, 36, 52]. Najprawdopodobniej u podłoża tego problemu leży złożoność ludzkiej psychiki. Składa się ona z dwóch fundamentalnych struktur: wrodzonej, którą można nazwać rdzeniem i przyrównać do pestki oraz nabytej, którą określa się jako osobowość i pozwalamy sobie przyrównać ją do miąższu owocu. Osobowość człowieka powstaje w znacznym stopniu w drodze naśladowania i powtarzania zachowań ludzi, szczególnie tych, z którymi istnieje silny związek emocjonalny: rodzicami, nauczycielami lub uogólniając – autorytetami. W konsekwencji, w wyniku procesów asymilacji i przyswajania, na

TABELA 1. Podstawowe cechy osobowości mierzone w kwestionariuszach NEO-PI-R oraz TPQ

Czynniki analizowane w NEO-PI-R (wg Costy)	Czynniki analizowane w TPQ (wg Cloningera)
N Neurotyzm	NS Poszukiwanie Nowych Wrażeń ¹ (PNW)
E Ekstrawertyzm	NS ₁ Podniecenie Badawcze
O Otwartość	NS ₂ Impulsywność
A Zgodność	NS ₃ Ekstrawagancja
C Sumienność	NS ₄ Nieuporządkowanie
Aspekty Ekstrawertyzmu oraz Sumienności w NEO-PI-R	H Unikanie Szkody ^{2, 3}
E ₁ Serdeczność	R Uzależnienie od Nagród ⁴
E ₂ Towarzyskość	P Wytrwałość
E ₃ Asertywność	
E ₄ Aktywność	
E ₅ Poszukiwanie Podniet	
E ₆ Emocje Pozytywne	
C ₁ Kompetencja	
C ₂ Uporządkowanie	
C ₃ Obowiązkowość	
C ₄ Dążenie do celu	
C ₅ Samodyscyplina	
C ₆ Deliberowanie	

¹ asocjacja z genem receptora dopaminy D4DR [1, 20] oraz genem transporterem serotoniny SLC6A4 [57].

² sprzężenie z locus 8p21-23 oraz oddziaływanie epistatyczne z loci 18p, 20p i 21q [8].

³ asocjacja z genem transporterem serotoniny SLC6A4 [57].

⁴ interakcja z D4DR oraz z genem receptora serotoniny 2C (5-HT2C) [1].

wrodzonej strukturze tworzą się wzorce zachowań będące efektem naśladowania zachowań innych osób. Z czasem, naturalny rdzeń psychiczny ulega zamaskowaniu przez czynniki środowiskowe, a własne cechy osobowości mieszają się z cechami osobowości nabytymi od innych osób. U człowieka dorosłego wrodzone cechy psychiczne, prowadzące pierwotnie do automatycznych reakcji i naturalnych zachowań, zostają zatem zmodyfikowane przez wpływ środowiska. Prowadząc wywiad, ankieter dostrzega najczęściej nabyte elementy osobowości, a nie elementy wrodzone. Dodatkowym problemem, utrudniającym jednoznaczne i precyzyjne określenie cechy podczas ankietyzacji, jest mechanizm woli oraz aparat myślowy. Procesy w nich zachodzące mogą maskować lub zdominować naturalne i automatyczne przejawy wrodzonych zachowań.

Istnieje kilka kontrowersyjnych sposobów, które umożliwiają obserwację elementu wrodzonego. Jedną z możliwości jest prowokowanie wystąpienia odmiennego stanu świadomości przy pomocy alkoholu lub środkami odurzającymi [27, 45]. W tych, trudnych do zaakceptowania eksperymentach, następuje proces częściowego lub niekiedy całkowitego „rozpuszczenia osobowości”. Podobny efekt wywołują

sytuacje ekstremalne, w których człowiek ociera się o niebezpieczeństwo zagrożenia zdrowia lub życia. Popularnie mówi się wówczas o pokazaniu prawdziwej twarzy.

W latach sześćdziesiątych zwrócono uwagę, że synowie alkoholików zaadoptowani przez rodziny zastępcze częściej popadają w alkoholizm niż ich przybrane rodzeństwo. Po wieloletnich badaniach prowadzonych w kierunku poszukiwania genu odpowiedzialnego za alkoholizm, w 1991 r. nastąpiło głębokie poruszenie, wywołane pracą Blum i Noble [2]. Ogłosili oni wykrycie pojedynczego genu receptora dopaminy¹ D₂ podnoszącego ryzyko alkoholizmu 9-krotnie. Allel A₁ tego genu występował u 69% spośród 35 zmarłych alkoholików, podczas gdy w grupie kontrolnej u 20%. Badania te potwierdziła jedynie grupa Comingsa [13]. Sprawa wywołała publiczny dialog. W ostatnim czasie dwie niezależne grupy badaczy, prowadzone przez Ebsteina [20] oraz Benjamina [1], wykazały związek pomiędzy polimorfizmem wariantów genu receptora dopaminy D₄ (*D4DR*) na krótkim ramieniu chromosomu 11 a cechą określaną jako Poszukiwanie Nowych Wrażeń (PNW). Badania te potwierdziła pracownia kierowana przez Ono [47]. Osoby obdarzone długimi allelami eksonu III *D4DR* odznaczają się wyższym poziomem PNW niż ci, którzy mają tylko krótkie allele, są bardziej dociekliwi, żądni silnych przeżyć i łatwiej się podniecają. Nosiciele krótkich alleli są uznawani za sztywnych i uporządkowanych. Zaobserwowany polimorfizm odpowiada za około 10% zróżnicowania genetycznego w badanej cesze. Obecność długich alleli eksonu III *D4DR* jest dodatnio skorelowana z trzema spośród sześciu aspektów ekstrawertyzmu mierzonego kwestionariuszem NEO oraz ujemnie z jednym spośród sześciu aspektów innego czynnika fenotypowego określanym przez ten kwestionariusz, mianowicie sumienności. Pozostałe aspekty ekstrawertyzmu i sumienności okazały się słabo skorelowane lub nie wykazywały związku z *D4DR*, co sugerowałoby genetyczną heterogeniczność fenotypowych aspektów mierzonych kwestionariuszem NEO. Wszystkie aspekty związane z polimorfizmem *D4DR* badane tym kwestionariuszem okazały się wskaźnikami Poszukiwania Nowych Wrażeń. Potwierdzono to wykazując, że polimorfizm *D4DR* jest dodatnio związany z Poszukiwaniem Nowych Wrażeń jako cechą określaną przez kwestionariusz NEO, a nie jest związany z żadnym innym wymiarem temperamentu. Początkowo uważano, że dopamina jest głównym neuromodulatorem Poszukiwania Nowych Wrażeń ze względu na jej kluczową rolę w stymulowaniu euforii u ludzi i zachowania badawczego u zwierząt. Dalsze odkrycia ujawniły, że pacjenci, cierpiący na niedobór dopaminy w chorobie Parkinsona, odznaczają się niższym poziomem Poszukiwania Nowych Wrażeń niż pozostali, choć inne aspekty ich temperamentu nie wykazują odchylenia od normy.

¹Geny związane z układem dopaminergicznym kodują receptory dopaminergiczne D1, D2, D3, D4 i D5 oraz transporter dopaminy. Dopamina jest jednym z najważniejszych neurotransmiterów mózgu pośredniczącym w wywoływaniu uczucia przyjemności i podobnych wrażeń. Postulowano, że jest związana z zaburzeniami występującymi w schizofrenii, choć obecne wyniki badań nie potwierdzają jednoznacznie tego poglądu.

TABELA 2. Choroby dziedziczne związane z ekspansją powtórzeń

Powtórzenie	Zaburzenie	Gen	Autor
CGG	Zespół łamliwego chromosomu X (FRAXA, FRAXE)	<i>FMR1</i>	JONES I IN 1994; KNIGHT i in. 1993; VERKERK i in. 1991
CAG	Dystrofia miotoniczna (DM)	<i>DM1</i>	MAHADEVAN i in. 1992; BROOK i in. 1992, HARLEY i in. 1992A
CAG	Choroba Kennedy'ego (SBMA)	<i>AR</i>	LA SPADA i in. 1991
CAG	Choroba Huntingtona (HD)	<i>IT15</i>	Konsorcjum Badania Choroby Huntingtona 1993
CAG	Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 1 (SCA1)	<i>SCA1</i>	ORR i in. 1993
CAG	Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 2 (SCA2)	<i>SCA2</i>	IMBERT i in. 1996
CAG	Epilepsja miokloniczna z ruchami pląsawiczymi (DRPLA)	<i>B37</i>	KOIDE i in. 1994; NAGAFUCHI i in. 1994
CAG	Choroba Machado i Josepha (MJD lub SCA3)	<i>MJD1</i>	KAWAGUCHI i in. 1994
GAA	Ataksja Friedreicha	<i>STM7</i>	CAMPUZANO i in. 1996

Poszukiwanie Nowych Wrażeń okazało się skorelowane ze zwiększonym przepływem krwi przez ciało prążkowane, które jest bogate w dopaminę, oraz z wchłanianiem prekursora dopaminy w tym organie, zwłaszcza w lewym jądrze ogoniastym [22]. Regionalna i funkcjonalna specyfika różnych typów receptorów dopaminowych prawdopodobnie odgrywa kluczową rolę w rozumieniu neurobiologicznych podstaw Poszukiwania Nowych Wrażeń.

Plomin zwraca uwagę, że wszelkie zaburzenie poznawcze jest pojęciem problematycznym. Termin zaburzenie zdaniem Plomina jest rozumiany jakościowo: może występować lub nie. Nie jest definiowany w sposób ilościowy, który określałby stopień zaburzenia. Ponieważ cechy zdolności poznawczych mierzone są ilościowo, powstaje formalny dysonans pomiędzy jakościowo rozumianym zaburzeniem a ilościowo mierzoną cechą, przyjmującą różne wartości w pewnym przedziale. Niemniej, sukces w mapowaniu genów prawidłowych cech osobowości może uutorować drogę w kierunku poznania genów związanych z psychopatologią.

UWARUNKOWANIE ZŁOŻONYCH KOMPLEKSÓW INSTYNKTOWNYCH U ZWIERZĄT

Środowisko etologów jest podzielone na tych, którzy uznają, że w przypadku zwierząt (zwłaszcza wyższych) można mówić o procesach psychicznych, podobnie

jak to jest w przypadku człowieka, a zatem o procesach: myślowych, emocjonalnych, wolicjonalnych [26, 60] oraz na behawiorystów, przeciwników takiego podejścia. Własne obserwacje pozwalają zauważyć, że w przypadku niektórych gatunków zwierząt, takich jak psy, można mówić nawet o niezwykle subtelnych stanach psychicznych i emocjonalnych. Szereg zaburzeń w ich zachowaniu ma podłoże psychiczne: lęk przed odłączeniem, lęk izolacyjny, zespół izolacji, depresja odtrącenia, fobie, agresje nabyte, lęki napadowe, lęki okresowe, lęki stałe, depresja inwolucyjna, depresja reakcyjna, która pojawia się jako reakcja na gwałtowne wzruszenie [55]. Zwierzęta nie mają oczywiście osobowości¹ w przedstawionym niżej jej rozumieniu. Mimo to w ich psychice istnieją różnice zarówno międzyosobnicze, jak i międzygatunkowe [25].

We współczesnej hodowli zwierząt prowadzi się prace głównie w zakresie doskonalenia cech użytkowych. Nie mniej jednak dąży się także do modyfikacji cech instynktownych [16], a selekcja w tej mierze bywa skuteczna, mimo że wiedza o genach odpowiedzialnych za zachowanie się zwierząt jest jeszcze bardzo skromna. Liczne doświadczenia przeprowadzone przez Price [53] świadczą, że proces domestykacji podwyższa próg określonych zachowań.

Obserwacje złożonych zachowań zwierząt (np. drobiu) były prowadzone już stosunkowo dawno [62]. Znamienny przykład wpływu człowieka na zachowanie zwierząt dotyczy instynktu wysiadywania jaj. W warunkach naturalnych jest on niezbędny dla utrzymania gatunku. Zastosowanie sztucznych inkubatorów spowodowało jego osłabienie. Zespołowi kierowanemu przez Goodale w ciągu zaledwie pięciu lat pracy selekcyjnej udało się zredukować instynkt kwoczenia u kur rasy leghorn z 90% do 20% [24]. Były to pionierskie prace prowadzone w latach dwudziestych. Z czasem, u wspomnianej rasy kur oraz przepiórki japońskiej instynkt kwoczenia zanikł całkowicie [48]. Należy jednak dodać, że u innych gatunków, takich jak indyk, skuteczność selekcji w tym kierunku była niska. Przyjmuje się, że współczynnik odziedziczalności kwoczenia wynosi $h^2=0,11$ [56].

Przodkowie współczesnych gatunków zwierząt domowych charakteryzowali się monoestralnością, tzn. okres godowy wypadł u nich raz w roku. Tak było w przypadku dzika europejskiego śródładowego (*Sus scrofa ferus*), śródziemnomorskiego (*Sus mediterraneus*) czy azjatyckiego dzika pręgowanego (*Sus vittatus*). Świnia domowa, bydło, wykazują całoroczną aktywność płciową, tzn. są one poliestralne. Podobnie sprawa wygląda w przypadku owiec, które pochodzą od muflona europejskiego (*Ovis musimon*), stepowej owcy azjatyckiej zwanej też arkalem (*Ovis vignei*) oraz górskiej owcy azjatyckiej (*Ovis argali*) – gatunki te były monoestralne. U owcy, jako „zwierzęcia dnia krótkiego”, ruja przypadała późną jesienią. U wielu obecnie hodowanych ras owiec okres rui przypada dwa razy w roku, zaś u owiec w typie merynosa kilka razy w roku, stąd merynosa uznaje się za rasę poliestralną.

¹Etymologia słowa osobowość oznacza, że dotyczy ono osoby, a zatem człowieka.

Zatem prowadzona praca hodowlana spowodowała trwałą zmianę na płaszczyźnie instynktownej.

Najnowsze badania genu receptora wazopresyny (V_{1a}) sugerują, że jest on związany z zachowaniem społecznym u gryzoni [66]. Punktem wyjścia do opublikowanych w *Nature* badań były zaobserwowane różnice w zachowaniu oraz ekspresji genu receptora wazopresyny (V_{1a}) u nornika preriowego (NP) i nornika Montana (NM). Pierwszy z nich jest monogamistą, odchowującym swoje potomstwo, opiekuńczym ojcem. Z kolei nornik Montana jest poligamistą, samiec interesuje się samicą jedynie w celu kopulacji, zaś potomstwem nie interesuje się w ogóle. Ekspresja receptora wazopresyny w centralnym układzie nerwowym okazała się odmienna u obu gatunków. Zaobserwowano międzygatunkowe różnice w strukturze genu receptora wazopresyny. U monogamicznego nornika preriowego region 5' (-723:-1151nt) jest bogaty w sekwencje powtórzone di- i tetranukleotydowe. Z kolei u nornika Montana brak jest takich powtórzeń. Choć homologia sekwencji kodującej wynosi około 99%, to różnica w sekwencji promotorowej jest bardzo znacząca. Ponadto u monogamicznego nornika preriowego występowała dodatkowa kopia genu V_{1a} . Gen V_{1a} z genomu nornika preriowego wprowadzono do myszy (samce myszy są agresywne, poligamiczne i wykazują wzór ekspresji genu receptora V_{1a} niemal identyczny jak nornika Montana). Transgeniczne myszy reagowały na wazopresynę argininową tak jak norniki preriowe, czyli wzrostem zachowań społecznych. Samiec myszy wyrósł na wiernego męża i troskliwego ojca, podczas gdy wszystkie samce tego gatunku są agresywne. U nietransgenicznych myszy brak było takiego efektu. Wzór ekspresji u transgenicznych myszy był zbliżony do wzoru ekspresji u nornika preriowego. Zatem należy przyjąć, że to nie poziom ekspresji, a międzygatunkowa różnica ekspresji powoduje zmianę zachowań. Pewien niepokój może jednak budzić metodyka przedstawionych w omawianej pracy obserwacji zachowań zwierząt, które w trakcie pięciominutowego monitoringu poddawano anestezji, a samice dodatkowo wiązano.

W genetyce behawioralnej niemal poza dyskusją jest pogląd, że cechy psychiczne oraz instynktowne są uwarunkowane genetycznie. Podane wyżej przykłady wskazują na skuteczność selekcji szczególnie w odniesieniu do cech instynktownych, co z kolei wyraźnie sugeruje, że najprawdopodobniej są one uwarunkowane genetyczne [58]. Cechami, które warte byłyby mapowania u zwierząt, są m.in. płochliwość u koni, agresja oraz inteligencja u psów. Najbliższe lata zapewne przyniosą szereg nowych wyników badań, uzupełniając naszą wiedzę w tym zakresie. Taka ewentualność pozwala już teraz zastanawiać się nad możliwością daleko idących konsekwencji, zarówno społecznych jak i formalno-prawnych.

LITERATURA

- [1] BENJAMIN J, LI L, PATTERSON C, GREENBERG BD, MURPHY DL, HAMER DH. Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking. *Nat Genet* 1996; **12**: 81–84.
- [2] BLUM K, NOBLE EP, SHERIDAN PH, MONTGOMERY A, RITCHIE T, JAGADESSWARAN P, NOGAMI H, BRIGGS AH, COHN JB. Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *JAMA* 1990; **263**(15): 2055–2060.
- [3] BOUCHARD TJ. Genes, environment, and personality. *Science* 1994; **264**: 1700–1701.
- [4] BRITTON KR. Medroxyprogesteron in the treatment of aggressive hypersexual behavior in traumatic brain injury. *Brain Inj* 1998; **12**(8): 703–707.
- [5] BROOK JD, MCCURRACH ME, HARLEY HG, BUCKLER AJ, CHURCH D, ABURATANI H, HUNTER K, STANTON VP, THIRION JP, HUDSON T. Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992; **69**: 784–789.
- [6] CAMPUZANO V, MONTERMINI L, MOLTO MD, PIANESE L, COSSEE M. i in. Friedreich's ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996; **271**: 1423–1427.
- [7] CASKEY CT, PIZZUTI A, FU Y-H, FENWICK RG, NELSON DL. Triplet repeat mutations in human disease. *Science* 1992; **256**: 784–789.
- [8] CLONINGER CR, VAN EERDEWEGH P, GOATE A, EDENBERG HJ, BLANGERO J, HESSELBROCK V, REICH T., NURNBERG J JR, SCHUCKIT M, PORJESZ B, CROWE R, RICE JP, FOROUD T, PRZYBECK TR, ALMASY L, BUCHOLZ K, WU W, SHEARS S, CARR K, CROSE C, WILLIG C, ZHAO J, TISCHFIELD JA, LI TK, CONNEALLY PM i in. Anxiety proneness linked to epistatic loci in genome scan of human personality traits. *Am J Med Genet* 1998; **81**(4): 313–317.
- [9] CLONINGER CR, ADOLFSSON R, SVRAKIC NM. Mapping genes for human personality. *Nat Genet* 1996; **12**: 3–4.
- [10] CLONINGER CR, PRZYBECK TR, SVRAKIC NM. The tridimensional personality questionnaire: U.S. normative data. *Psychol Rep* 1991; **69**: 1047–1057.
- [11] CLONINGER CR. A systematic method for clinical description and classification of personality variants. A proposal. *Arch Gen Psych* 1987; **44**: 573–588.
- [12] CLONINGER CR. Temperament and personality. *Curr Opin Neurobiol* 1994; **4**: 266–273.
- [13] COMINGS DE, COMINGS BG, MUHLEMAN D, DIETZ G, SHAHBAHRAMI B, TAST D, KNELL E, KOCSIS P, MAUGARTEN R, KOVACS BW i in. The dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders. *JAMA* 1991; **266**(13): 1793–1800.
- [14] COSTA PT, MCCRAE RR. [w] Revised NEO Personality Inventory (NEO PI-R) and NEO Five Inventory NEO-FFI) professional manual (Psychological Assessment Resources, Odessa, FL, 1992).
- [15] CRAIG JV, CRAIG TP, DAYTON AD. Fearful behaviour by caged hens of two genetic stocks. *Appl Anim Ethology* 1983; **10**: 263–273.
- [16] CRAWFORD RD. Poultry Breeding and Genetics. Elsevier Sci. Publishers BV, 1990.
- [17] DARLOW JM, LEACH DR. Evidence for two preferred hairpin folding patterns in d(CGG).d(CCG) repeats tracts *in vivo*. *J Mol Biol* 1998; **275**: 17–23.
- [18] DAVIES K. The cost of instability. *Nature* 1992; **356**: 15.
- [19] DYKEN PR, HARPER PS. Congenital Myotonia Dystrophica. *Neurology* 1973; **23**: 465–473.
- [20] EBSTEIN RP, NOVICK O, UMANSKY R, PRIEL B, OSHER Y, BLAINE D, BENNETT ER, NEMANOV L, KATZ M, BELMAKER RH. Dopamine D4 receptor (*D4DR*) exon III polymorphism associated with human personality trait of Novelty Seeking. *Nat Genet* 1996; **12**: 78–80.

- [21] GARPENSTRAND H, EKBLÖM J, HALLMAN J, ORELAND L. Platelet monoamine oxidase activity in relation to alleles of dopamine D4 receptor and tyrosine hydroxylase genes. *Acta Psychiatr Scand* 1997; **96**(4): 295–300.
- [22] GEORGE M. The temperament and character inventory (TCI): A guide to its development and use. (eds. Cloninger CR. Et. Al.) 137–140. Center for Psychobiology of Personality, St. Luis 1994.
- [23] GOATE A, CHARTIER HMC, MULLAN M, BROWN J, CROWFORD F, FIDANI L, GIUFFRÀ L, HAYNES A, IRVING N, JAMES L. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991; **349**(6311): 704–706.
- [24] GOODALE HD, SANBORN R, WHITE D. Broodiness in the domestic fowl. *Mass Agric Exp Sta Bull* 1920; 199.
- [25] GOSLING SD. Personality dimensions in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). *J Comp Psychol* 1998; **112**(2): 107–118.
- [26] GRIFFIN DR. Myślenie zwierząt. *Świat Nauki* 1992; **1**: 105.
- [27] GROF. Beyond the brain: birth, and transcendence in psychotherapy. State University of New York, Albany, 1985: 92–137.
- [28] HARLEY HG, BROOK JD, RUNDLE SA, CROW S, REARDON W, BUCKLER AJ, HARPER PP, HOUSMAN DE, SHAW D.J. Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* 1992a; **355**: 545–546.
- [29] HARLEY HG, RUNDLE SA, REARDON W, MYRING J, CROW S, BROOK JD, HARPER PP, SHAW DJ. Unstable DNA sequence in myotonic dystrophy. *Lancet* 1992b; **339**: 1125–1128.
- [30] HEMSWORTH PH, BARNETT JL, JONES RB. Situational factors that influence the level of fear of humans by laying hens. *Appl Anim Behav Sci* 1993; **36**: 197–210.
- [31] HOWELER CJ, BUSCH HFM, GERAEDTS JP, NIERMEIJER MF, STAAL A. Anticipation in myotonic dystrophy: Fact or fiction? *Brain* 1989; **112**: 779–797.
- [32] IMBERT G, SAUDOU F, YVERT G, DEVYS D, TROTTIER Y, GARNIER JM, WEBER C. Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nature Genet* 1996; **14**: 285–291.
- [33] JONES C, SLIJEPCEVIC P, MARSH S, BAKER E, LANGDON WY, RICHARDS RI, TUNNACLIFFE A. Physical linkage of the fragile site FRA11B and a Jacobsen syndrome chromosome deletion breakpoint in 11q23.3. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 2123–2130.
- [34] JONES RB. Fear and adaptability in poultry: insight, implications and imperatives. *World's Poultry Sci J* 1996; **52**: 131–174.
- [35] JONES RB. Fearfulness of hens caged individual or in groups in different tiers of a battery and the effects of translocation between tiers. *Br Poultry Sci* 1985; **26**: 399–408.
- [36] JÖNSSON EG, NÖTHEN MM, GUSTAVSSON J.P., NEIDT H., BRENÉ S, TYLEC A, PROPPING P, SEDVALL GC. Lack of evidence for allelic association between personality traits and the dopamine D4 receptor gene polymorphism. *Am J Psychiatry* 1997; **154**(5): 697–699.
- [37] KAWAGUCHI Y, OKAMOTO T, TANIWAKI M, AIZAWA M, INOUE M, KATAYAMA S, KAWAKAMI H, NAKAMURA S, NISHIMURA M. CAG expansion in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet* 1994; **8**: 221–228.
- [38] KNIGHT SJ, FLANNERY AV, HIRST MC, CAMBELL L, CHRISTODOULOU Z, PHELPS SR, POINTON J, MIDDLETON-PRICE HR, BARNICOAT A, PEMBREY ME, HOLLAND J, OOSTRA BA, BOBROW M, DAVIES KE. Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell* 1993; **74**: 127–134.
- [39] KOIDE R, IKEUCHI T, ONODERA O, TANAKA H, IGARASHI S, ENDO K, TAKAHASHI H, KONDO R, ISHIKAWA A, HAYASHI T, SAITO M, TOMODA A, MIKE T, NAITO H,

- IKUTA F, TSUIJI S. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nature Genet* 1994; **6**: 9–13.
- [40] LA SPADA AR, WILSON EM, LUBAHN DB, HARDING AE, FISCHBECK KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991; **352**: 77–79.
- [41] LI S-H, MCINNIS MG, MARGOLIS RL, ANTONARAKIS SE, ROSS CA. Novel triplet repeat containing genes in human brain: cloning, expression, and length polymorphism. *Genomics* 1993; **16**: 572–579.
- [42] MAHADEVAN M, TSILFIDIS C., SABOURIN L, SHUTLER G, JANSEN G, NEVILLE C, NARANG M, BORCELO J, OHOY K. Myotonic dystrophy mutation: An unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 1992; **255**: 1253–1255.
- [43] MCCRAE RR, COSTA PTJ. [w] Personality in Adulthood (Guilford, New York, 1990).
- [44] MCINNIS MG. Anticipation: An old idea in new genes. *Am J Hum Genet* 1996; **59**: 973–979.
- [45] MCPEAKE JD, KENNEDY BP, GORDON SM. Altered state of consciousness therapy. A missing component in alcohol and drug rehabilitation treatment. *J Subst Abuse Treat* 1991; **8**(1): 75–82.
- [46] NAGAFUCHI S, YANAGISAWA H, SATO K, SHIRAYAMA T, OHSAKI E i in. Dentatorubral and pallidoluysian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nature Genet* 1994; **6**: 14–18.
- [47] ONO Y, MANKI H, YOSHIMURA K, MIZUSHIMA H, HIGUCHI S, YAGI G, KANBA S, ASAI M. Association between dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism and novelty seeking in Japanese subjects. *Am J Med Genet* 1997; **75**(5): 501–503.
- [48] ORCUTT SF, ORCUTT AB. Nesting and parental behavior in domestic common quail. *Auk* 1976; **93**: 135–141.
- [49] ORR HT, CHUNG MY, BANFI S, KWIATKOWSKI TJ, SERVADIO A, BREAUDET AL, MCCALL AL, DUVICK LA, RANUM LP, ZOGHBI HY. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet* 1993; **4**: 221–226.
- [50] OWEN MJ, MULLAN MJ. Molecular genetic studies of manic-depression and schizophrenia. *Trends Neurosci* 1990; **13**: 29–31.
- [51] PLOMIN R, OWEN MJ, MCGUFFIN P. The genetic basis of complex human behaviors. *Science* 1994; **264**: 1733–1739.
- [52] POGUE GEILE M, FERREL R, DEKA R, DEBSKI T, MANUCK S. Human novelty-seeking personality traits and dopamine D4 receptor polymorphism: a twin and genetic association study. *Am J Med Genet* 1998; **81**(1): 44–48.
- [53] PRICE EO. Behavioral aspects of animal domestication. *Quart Rev Biol* 1984; **59**: 1–32.
- [54] RICHARDS RI, SUTHERLAND GR. Dynamic mutation: A new class of mutations causing human disease. *Cell* 1992; **70**: 709–712.
- [55] ROUSSELET-BLANC P. Pies. 1993. Polska Oficyna Wydawnicza BGW, Warszawa.
- [56] SAEKI Y. Inheritance of broodiness in Japanese Nogoya fowl with special reference to sex-linkage and notice in breeding practice. *Poultry Sci* 1957; **36**: 378–383.
- [57] SANDER T, HARMS H, DUFEU P, KUHN S, HOEHE M, LESH KO, ROMMELSPACHER H, SCHMIDT LG. Serotonin transporter gene variants in alcohol-dependent subjects with dissocial personality disorder. *Biol Psychiatry* 1998; **43**(12): 908–912.
- [58] SARGILLO CA, GRATAN DR, MCCARTHY MM, SELMANOFF M. Hormonal and neurotransmitter regulation of GnRH gene expression and related reproductive behaviors. *Anim Genet* 1996; **26**(3): 241–277.
- [59] SEFTON AE. The interactions of cage size, cage level. Social density, fearfulness and production of single comb white leghorns. *Poultry Sci* 1976; **55**: 1922–1926.
- [60] SEYFARTH RM, CHENEY DL. Czy małpy myślą? *Świat Nauki* 1993; **2**: 52–59.
- [61] SIGVARDSSON S. Structure and stability of childhood personality: prediction of later social adjustment. *J Child Psychol Psychoat* 1987; **28**: 929–946.

- [62] SMITH P, DANIEL C. The chicken book. Little, Brown and Co., Toronto, 1975.
- [63] THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntingtons disease chromosomes. *Cell* 1993; **72**: 971–983.
- [64] TSILFIDIS C, MACKANZIE AE, METTLER G, BARCELO J, KORNELUK RG. Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy. *Nature* 1992; **1**: 192–195.
- [65] VERKERK AJ, PIERETTI M, SUTCLIFFE JS, FU YH, KUHL DP, PIZZUTI A, REINER O, RICHARDS S, VICTORIA MF, ZHANG FP i in. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; **65**(5): 905–914.
- [66] YOUNG LJ, NILSEN R, WAYMIRE KG, MACGREGOR GR, INSEL TR. Increased affiliative response to vasopressin in mice expressing the V_{1a} receptor from monogamous vole. *Nature* 1999; **400**: 766–768.

Adres autora: dr hab. Piotr Gronek, Os. Przyjaźni 13/219, 61-687 Poznań

KULTURY PYLNIKÓW JAKO JEDNA Z METOD INDUKOWANIA HAPLOIDÓW ŻYTA (*Secale cereale* L.)

ANTHER CULTURES AS A METHOD OF THE INDUCTION OF RYE HAPLOIDS (*Secale cereale* L.)

Sylwia MIKOŁAJCZYK, Zbigniew BRODA

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin,
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Streszczenie: Rośliny haploidalne mają wiele zastosowań w badaniach naukowych oraz pracach aplikacyjnych. Jedną z metod ich otrzymywania jest androgeniza (kultury pylników i izolowanych mikrospor). W pracy przedstawiono najważniejsze czynniki decydujące o przebiegu tego procesu. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują: genotyp, fizjologiczna kondycja roślin donorowych, stadium rozwojowe mikrospor, traktowanie wstępne kłosów i pylników, skład pożywki oraz warunki prowadzenia kultury. Bariery utrudniającymi wykorzystanie tej metody są: niski procent zregenerowanych roślin oraz wysoki udział osobników z defektami chorofilowymi.

Słowa kluczowe: żyto, androgeniza, kultury pylników, haploidy

Summary: Haploids plants are often used in scientific and application research. Androgenesis (anther culture and isolation microspores) is one of the methods of obtaining them. The study presents the most important factors which determine the course of the process. Special attention should be paid to: genotype, physiological condition of donor plants, the stage of microspores development, the initial treatment of spikes and anthers, the medium composition and the culture condition. Inhibitors to the application of this method are: low percentage of regenerated plants and high participation individuals with chlorophyll defects.

Key words: rye, androgenesis, anther culture, haploids

Wykaz stosowanych skrótów: 2,4-D – kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy, BAP – 6-benzyloaminopuryna, DH – podwojony haploid, IAA – kwas β -indoliloctowy, MS – pożywka Murashige i Skooga, N₆ – pożywka Chu, NAA – kwas α -naftylooctowy

WSTĘP

Żyto (*Secale cereale* L.) to roślina uprawna pochodząca z Azji Mniejszej. Charakteryzuje się małymi wymaganiami klimatycznymi i glebowymi. Uprawiane jest w krajach północno-wschodniej Europy, głównie w Niemczech, Polsce i Rosji. Obecnie uprawia się około 12 mln ha żyta ozimego. Ze względu na warunki klimatyczno-glebowe naszego kraju przypuszczalnie jeszcze przez bardzo długi okres żyto pozostanie jednym z głównych zbóż Polski.

Żyto jest gatunkiem obcopylnym, w wysokim stopniu heterozygotycznym. Mechanizmem zabezpieczającym ten sposób zapylania jest między innymi system gametofitycznej samoniezgodności. Wykorzystanie konwencjonalnych metod hodowli w przypadku żyta nie daje możliwości znacznego postępu hodowlanego. Obecnie coraz częściej hodowanymi odmianami żyta są odmiany mieszańcowe. Jednym z warunków takiego systemu hodowli jest posiadanie linii homozygotycznych, których otrzymanie metodami konwencjonalnymi (*in bred*) zajmuje kilka lat. Skrócenie tego okresu jest możliwe dzięki wykorzystaniu technik *in vitro* pozwalających na otrzymywanie haploidów i linii DH. Jednocześnie pozwala na zaoszczędzenie znacznych środków finansowych i nakładów pracy oraz skuteczną konkurencję z zagranicznymi firmami hodowlano-nasiennymi.

ANDROGENEZA

Androgeneza to sporofityczny rozwój gametofitu męskiego, dający początek haploidalnemu zarodkowi, a dalej haploidalnej roślinie. Haploidem nazywamy roślinę o gametycznej liczbie chromosomów (n), a pod pojęciem – linii DH należy rozumieć rośliny o podwojonej liczbie chromosomów (w sposób spontaniczny lub indukowany – głównie kolchicyną). Androgenezę w warunkach *in vitro* indukuje się w kulturach pylników lub kulturach izolowanych mikrospor [9].

Prowadzone intensywne badania nad androgenezą umożliwiły wyróżnienie najważniejszych czynników decydujących o otrzymaniu haploidów i linii DH. Wśród nich jako najważniejsze przyjmuje się: fizjologiczną kondycję roślin donorowych, stadium rozwojowe mikrospor i czas prowadzenia kultury, traktowanie wstępne kłosów i pylników, skład pożywki, warunki prowadzenia kultury oraz najważniejszy z nich – genotyp [3].

U zbóż do indukowania haploidów najczęściej stosuje się: androgenezę (kultury pylników, kultury izolowanych mikrospor) oraz eliminację chromosomów. Warunkiem wykorzystania danej metody jest jej wysoka efektywność i niskie koszty. Wśród gatunków, dla których opracowano te metody z bardzo zadowalającymi wynikami, należy wymienić: ryż (*Oryza sativa*), pszenicę (*Triticum aestivum*), ję-

czmień (*Hordeum vulgare*), kukurydzę (*Zea mays*). Niestety żyto (*Secale cereale*) jest rośliną, u której indukowanie haploidów w drodze androgenezy sprawia szereg trudności. Najczęściej spotykanym problemem jest niski odsetek regenerowanych roślin i wysoki udział roślin z defektami chlorofilowymi.

Warunki wzrostu roślin donorowych

Warunki wzrostu roślin donorowych są ważnymi czynnikami decydującymi o procesie androgenezy. Większy odsetek roślin haploidalnych powstaje, gdy rośliny będące źródłem pylników lub mikrospor rosną w warunkach całkowicie kontrolowanych. Kiełkowanie powinno odbywać się w temperaturze 20°C. Jarowizacja trwa dwanaście tygodni w temperaturze 4°C i przy 8-godzinnym oświetleniu. Po zakończonej jarowizacji przenosi się rośliny do szklarni, gdzie temperatura powinna wynosić 10°C w dzień i 8°C w nocy, aż do zakończenia fazy strzelania w źdźbło. W trakcie dalszego rozwoju temperaturę należy podnieść do 18°C w dzień i 14°C w nocy i utrzymać ją do czasu pobierania materiału roślinnego [2]. W pracy Flehinghaus-Roux i in. [4] podano zbliżone warunki wzrostu roślin donorowych, z tą różnicą, że jarowizację prowadzono w krótszym czasie i niższej temperaturze (10 tygodni, 2°C), a wzrost roślin w późniejszym okresie odbywał się w szklarni o temperaturze 20°C w dzień i 16°C w nocy przy 16-godzinnym oświetleniu.

Traktowanie wstępne kłosów

Drugim ważnym czynnikiem decydującym o powodzeniu kultur pylników i izolowanych mikrospor jest traktowanie wstępne kłosów, z których będą pobierane pylniki. Wyniki opisane w wielu publikacjach wskazują, że szok termiczny (podniesienie lub obniżenie temperatury) wpływa korzystnie na plon androgenicznych zarodków. Czas działania tego czynnika jest zależny od gatunku [1]. Dla żyta zaleca się obniżenie temperatury od 4°C do 6°C, na okres jednego tygodnia [2, 4, 13]. Thomas i in. [10] wskazują na korzystny wpływ obniżenia temperatury do 6°C przez 3 do 15 dni. Orlikowska [7] traktując kłosa temperaturą 4°C przez 1 do 2 dni nie zaobserwowała wpływu szoku termicznego na wzrost zdolności do androgenezy.

Stadium rozwojowe mikrospor

O powstawaniu haploidalnych roślin decyduje również stadium rozwojowe mikrospor. Zagadnienie to dotyczy zarówno kultur pylników, jak i izolowanych mikrospor. Najczęściej wyszczepia się pylniki zawierające mikrospory średnio- lub późnojednojądrowe [4]. Stadium rozwojowe określa się wykonując preparaty cytologiczne, na podstawie położenia jądra oraz wielkości wakuoli [7].

Pożywka i warunki inkubacji eksplantatów

Kolejnymi czynnikami decydującymi o powodzeniu kultur są pożywki oraz warunki inkubacji wyszczepionych eksplantatów. W kulturach pylników żyta (*Secale cereale* L.) stosuje się szereg najróżniejszych pożywek z modyfikacjami poszczególnych autorów. Wśród najczęściej stosowanych można wymienić: MS z modyfikacjami [2, 6, 8]; N₆ [12]; N₆ z modyfikacjami [5]; pożywka z ekstraktem ziemniaczanym [8, 13]; Nitsch and Nitsch [10]; Blaydes, White oraz Schenk i Hildebrandt [14]. Pożywki stosowane w kulturach pylników zawierają regulatory wzrostu i rozwoju, do najczęściej stosowanych należy zaliczyć 2,4-D, NAA, IAA, BAP, kinetynę, picloram.

W pierwszych pracach dotyczących androgenezy u żyta [14] zaobserwowano wyraźnie stymulujący wpływ pożywek zawierających wysokie stężenia auksyn na rozwój kalusa (powyżej 0,6 mg/l 2,4-D lub 1,0 mg/l NAA). Thomas i współpracownicy [10] wskazują na korzystny wpływ 2,4-D jako jedyne regulatora wzrostu. Z kolei Daniel [2] otrzymał wyższy odsetek zregenerowanych roślin na pożywce MS zawierającej picloram, IAA oraz BAP.

Poza tak oczywistymi czynnikami wpływającymi na przebieg regeneracji w warunkach *in vitro* jak regulatory wzrostu i rozwoju roślin pewne znaczenie wykazują także źródło węgla organicznego oraz środek zestalający pożywkę. Flehinghaus-Roux i in. [5] wykazali korzystny wpływ maltozy na regenerację roślin z pylników żyta oraz niekorzystne działanie agaru, który można zastąpić np. agarozą.

Wśród czynników decydujących o przebiegu androgenezy nie wolno pominąć zagadnień związanych z warunkami, w jakich ma odbywać się rozwój pylników i mikrospor. Autorzy dobierają różne kombinacje temperatury oraz oświetlenia, w związku z czym może się nasuwać spostrzeżenie, że nie mają one istotnego znaczenia. Wenzel i Thomas [14], Flehinghaus-Roux i in. [5] oraz Daniel [2] preferują temperaturę rzędu 24–28°C i zaciemnienie kultur. Z kolei Orlikowska [7] umieszczała kultury w temperaturze 24–28°C i oświetleniu ciągłym o natężeniu 500–1000 luks. Sharma i in. [8] połowę wyszczepionych eksplantatów umieszczali w pokoju hodowlanym o temperaturze 26°C przy sztucznym świetle o natężeniu 12 $\mu\text{E s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ i 16-godzinnym fotoperiodzie, a połowę w temperaturze 5°C na 64 godziny, po czym inkubowano je w tych samych warunkach. Milewska-Pawliczuk [6] stosowała podobną temperaturę jak Orlikowska [7] (25–28°C), ale wyższe natężenie oświetlenia (1000–1500 luks).

Genotyp

Genotyp rośliny donorowej decyduje o przebiegu i efektywności androgenezy [11]. Zdolność do generowania form haploidalnych jest uwarunkowana genetycznie. Powoduje to różne odsetki otrzymywanych roślin haploidalnych u różnych gatunków, a nawet odmian tego samego gatunku. Na dzień dzisiejszy androgenezę można

indukować u bardzo wielu gatunków roślin. Podstawowym warunkiem decydującym o wykorzystaniu tej techniki jest jej wysoka efektywność. Szereg prac wskazuje na trudności w zregenerowaniu zielonych roślin u gatunku *Secale cereale* [6, 7, 8]. W jednej z cytowanych prac otrzymano 68 roślin na 84 000 wyłożonych pylników [12]. Uniemożliwia to obecnie wykorzystanie haploidów oraz linii DH żyta w hodowli odmian heterozyjnych.

DROGI REGENERACJI

W kulturach pylników i izolowanych mikrospor można wyróżnić dwa podstawowe rodzaje regeneracji: powstawanie zarodków haploidalnych oraz tworzenie się kalusa. Dla hodowli najbardziej pożądana jest embriogeneza bezpośrednia, ponieważ regeneracja pośrednia niesie ze sobą takie zagrożenia jak zmienność gametoklonalna, zmiana stopnia ploidalności (często powstają miksoploidy). Flehinghaus-Roux i in. [5] umieszczali zielone kalusy oraz roślinki na pożywce regeneracyjnej (zmodyfikowana pożywka N₆), w temperaturze 27°C. Otrzymane rośliny rosły w próbkach zawierających tę samą pożywkę, ale w temperaturze 22°C. Jarowizację prowadzono w warunkach *in vitro*. Zjarowizowane rośliny, będące w dobrej kondycji, wysadzano do gleby.

Otrzymane rośliny Daniel [2] przenosił do gleby, gdy miały dwa, trzy liście. Umieszczał je w szklarni o temperaturze 20°C i wysokiej wilgotności, po 14 dniach rośliny poddawał jarowizacji przez 10 tygodni w temperaturze 4°C.

Poza niskim odsetkiem regenerujących roślin oraz typem regeneracji kolejnym znaczącym problemem w androgenezie zbóż jest powstawanie osobników albinotycznych. W pierwszych pracach dotyczących kultur pylników żyta Thomas i in. [10] oraz Wenzel i in. [12, 13], zaobserwowali bardzo wysoki udział roślin z defektami chlorofilowym, wahał się on w granicach 70–89%.

PODSUMOWANIE

Kultury pylników oraz izolowanych mikrospor żyta (*Secale cereale* L.) mogą znaleźć liczne zastosowanie w badaniach naukowych i pracach aplikacyjnych. Najważniejszym aspektem wykorzystania tej techniki jest otrzymywanie linii DH, co znacznie skraca cykl hodowlany i zwiększa efektywność selekcji pożądaných rekombinantów [9]. Otrzymanie roślin haploidalnych umożliwia obserwacje efektów działania genów recesywnych. Ze względu na homozygotyczność podwojone ha-

ploidy mogą stanowić materiał do krzyżowania z formami dzikimi w celu przenoszenia cennych cech, np. odporności.

Haploidy znajdują zastosowanie nie tylko w hodowli, ale również w badaniach genetycznych i cytologicznych. Głównie wykorzystuje się je do mapowania genomów, analizy genetycznej cech ilościowych, wnioskowania o występowaniu addytywnego współdziałania genów, ustalania stopnia homologii genomów, wykrywania aberracji chromosomowych oraz sporządzania idiogramów.

Obecnie podstawowymi barierami wykorzystania tej metody na skalę masową są: niski procent zregenerowanych roślin oraz wysoki udział albinosów.

LITERATURA

- [1] ADAMUS A. Proces androgenezy. [w] Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin; pod. red. B. Michalik. Drukrol, Kraków 1996: 53–59.
- [2] DANIEL G. Anther Culture in Rye: Improved Plant Regeneration Using Modified MS-Media. *Plant Breeding* 1993; **110**: 259–261.
- [3] DEIMLING S, FLEHINGHAUS-ROUX T. Haploidy in rye. [w] S.M. Jain Sopory S.K. & Veilleux R.E. (eds.). *In vitro* Haploid Production in Higher Plants. Kluwer Academic Publishers 1997: 4, 181–204.
- [4] FLEHINGHAUS T, DEIMLING S, GEIGER HH. Anther-culture ability in *Secale cereale* L. *Plant Breeding* 1995; **114**: 259–261.
- [5] FLEHINGHAUS-ROUX T, DEIMLING S, GEIGER HH. Methodical improvements in rye anther culture. *Plant Cell Reports* 1991; **10**: 397–400.
- [6] MILEWSKA-PAWLICZUK E. Induction of Androgenesis *in vitro* in Various Genetic Forms of *Secale cereale*. *Biologia Plantarum* 1987; **29(4)**: 295–298.
- [7] ORLIKOWSKA T. Induction of Androgenesis *in vitro* in *Secale cereale* and *Triticale*. *Genetica Polonica* 1977; **18, 1**: 51–58.
- [8] SHARMA GC, WEN CHUNG WANG, SAPRA VT. Effect of Genotype, Media and Temperature Pretreatment on Calus Initiation in *Triticale*, Wheat, and Rye Anther Cultures. *Cereal Research Communications* 1982; **10, 3-4**: 143–150.
- [9] SZAREJKO I. Techniki otrzymywania podwojonych haploidów i ich wykorzystanie w hodowli roślin. *Prace Ogródu Botanicznego PAN* 1994; **5/6**: 39–53.
- [10] THOMAS E, HOFFMANN F, WENZEL G. Haploid Plantlets from Microspores of Rye. *Z Pflanzenzüchtg* 1975; **75**: 106–113.
- [11] WENZEL G, FOROUGHI-WEHR B. Haploidenkultur. *Agrarspectrum* 1990; **17**: 85–98.
- [12] WENZEL G, HOFFMANN F, THOMAS E. Heterozygous Microspore-Derived Plants in Rye. *Theor Appl Genet* 1976; **48**: 205–208.
- [13] WENZEL G, HOFFMANN F, THOMAS E. Increased Induction and Chromosome Doubling of Androgenetic Haploid Rye. *Theor Appl Genet* 1977; **51**: 81–86.
- [14] WENZEL G, THOMAS E. Observations on the Growth in Culture of Anthers of *Secale cereale*. *Z Pflanzenzüchtg* 1974; **72**: 89–94.

Adres autora: ul. Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań

ZASTOSOWANIE CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ W BADANIACH MOLEKULARNYCH ROŚLIN

APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY IN PLANT MOLECULAR STUDIES

Łukasz WOLKO¹, Ryszard SŁOMSKI^{1,2}

¹Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza
im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań, ²Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Streszczenie: W ostatnich latach cytometria przepływowa mocno wpłynęła na polepszenie naszej wiedzy o strukturze i funkcji genomu roślinnego. Praca przedstawia zastosowania cytometrii przepływowej w analizie izolowanych jąder komórkowych i chromosomów. Szybkość, precyzja i wydajność metody sprawiła, że znalazła ona ogromną liczbę zastosowań obejmujących badania podstawowe, hodowlę i produkcję roślin. Wyniki uzyskiwane w badaniach sortowanych chromosomów wskazują, że technika ta może bardzo uprościć analizę genomów roślinnych na poziomie molekularnym.

Słowa kluczowe: chromosom, DNA, cytometria przepływowa, sortowanie chromosomów, markery molekularne, FISH, PRINS, biblioteka DNA

Summary: In recent years flow cytometry played important role in understanding of plant genome structure and function. This paper reviews the applications of flow cytometry for the analysis of isolated nuclei and chromosomes. Speed, precision and efficiency of this method found an enormous number of applications which cover basic research, breeding and plant production. The results obtained with sorted chromosomes indicate that the technique might greatly simplify the analysis of plant genomes at the molecular level.

Key words: chromosome, DNA, flow cytometry, chromosome sorting, molecular markers, FISH, PRINS, DNA library

1. WSTĘP

Pierwsze doniesienie dotyczące cytometrii przepływowej roślin ukazało się w 1984 roku i dotyczyło analizy i rozdziału chromosomów *Haplopappus gracilis*. [4]. Chociaż próby zastosowania cytometrii przepływowej w badaniach roślin są

wciąż opóźnione w stosunku do badań nad człowiekiem i zwierzętami, liczba potencjalnych zastosowań w tej dziedzinie wzrasta. Wraz z rozwojem technicznym i wprowadzeniem nowych barwników fluorescencyjnych stała się ona bardzo użytecznym narzędziem wykorzystywanym w wielu dziedzinach współczesnej biologii, zarówno badań podstawowych, jak i w hodowli roślin. Możliwość rozdzielenia zdefiniowanych frakcji komórek, organelli lub cząstek biologicznych powoduje ciągły wzrost zainteresowania tą techniką [8].

2. PODSTAWOWE ZAŁOŻENIA

Cytometr przepływowy jest urządzeniem analizującym optyczne parametry cząstek (rozproszenie światła, fluorescencję) podczas ich przepływowego ruchu w pobliżu detektora. Analiza odbywa się w strumieniu buforu o bardzo dużej szybkości. Badane cząsteczki biologiczne (komórki, jądra komórkowe, organelle, chromosomy itp.) są przed rozdziałem znakowane barwnikiem fluorescencyjnym specyficznym wiążącym się z DNA. Cząsteczki są wprowadzane w płynący z dużą szybkością strumień roztworu i przed detektorem rozbijane na mikrokropelki, w taki sposób, że w kropelkach znajdują się pojedyncze badane cząstki. Kiedy kropelki przechodzą przez promień lasera, zostaje wzbudzona fluorescencja barwnika związanego z DNA i rejestrowana przez detektor. Intensywność fluorescencji, zależnie od rodzaju użytego barwnika, jest proporcjonalna do ilości DNA lub stosunku par GC/AT w DNA badanych cząsteczek, a więc jest charakterystyczna dla danej grupy cząstek biologicznych. Gdy cząsteczka naświetlona przez laser wykazuje wartość fluorescencji właściwą dla interesującej nas grupy cząstek, zawierająca go kropelka zostaje obdarzona ładunkiem elektrycznym. Przejście strumienia kropelek między płytkami naładowanymi elektrostatycznie powoduje, że kropelki, zawierające pożądane cząsteczki, są odchylane i kierowane do kolektora. Kropelki pozbawione ładunku, nie zawierające poszukiwanej cząsteczki, są zbierane w naczyniu zbiorczym. Rozdział zwykle odbywa się z szybkością 10^2 – 10^3 cząstek na sekundę, dlatego wszystkie operacje związane z rozdziałem są skomputeryzowane. Analiza jakościowa i ilo-

TABELA 1. Barwniki fluorescencyjne najczęściej stosowane w cytometrii przepływowej

Fluorochrom	Oddziaływanie z DNA
Bromek etydyny	Interkalacja
Jodek propidyny	Interkalacja
Hoechst 33258	Regiony bogate w pary AT
DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol)	Regiony bogate w pary AT
Chromomycyna A3	Regiony bogate w pary GC
Mithramycyna	Regiony bogate w pary GC

ściowa może odbywać się jednocześnie na całej populacji cząsteczek biologicznych [8]. W ulepszonej wersji tej metody używa się dwóch barwników. Jeden z nich wiąże się z parami GC w DNA, a drugi z parami AT. Detekcja odbywa się, w tym przypadku, przy dwóch długościach fali lasera wzbudzających fluorescencję jednego bądź drugiego z barwników. Cząsteczki można identyfikować na podstawie pomiaru całkowitej fluorescencji oraz proporcji intensywności fluorescencji poszczególnych barwników, co zwiększa w znaczący sposób rozdzielczość metody [17].

3. BADANIE WIELKOŚCI I PLOIDALNOŚCI GENOMU

W wielu badaniach genetycznych bardzo ważnym problemem jest dokładne oszacowanie wielkości badanego genomu. Tego typu dane są wykorzystywane między innymi w badaniach filogenetycznych i do analizy korelacji pomiędzy wielkością genomu a cechami fizjologicznymi i użytkowymi. Przed przystąpieniem do mapowania nowego genomu również potrzebna jest wiedza o jego złożoności. Szacunek wielkości genomu podany w pg DNA lub w Mpz może być przeprowadzony przy użyciu cytometru przepływowego przez jednoczesny rozdział próby badanej i standardowej próby odniesienia [8,9]. Wielkość badanego genomu jest następnie obliczana przez odniesienie do standardu. Dokładność tej metody jest bardzo wysoka i pozwala na wykrycie różnic wielkości genomu mniejszych niż 0,02 pg DNA [7]. Duża dokładność cytometrii przepływowej w szacowaniu wielkości genomu wynika z faktu jednoczesnego rozdziału próby badanej i standardu, co eliminuje wpływ warunków doświadczenia na ostateczny wynik [7,9]. Metoda ta pozwala także na rozróżnienie jąder znajdujących się w fazie G_1 i G_2 cyklu komórkowego. Do obliczania wielkości genomu używa się tylko danych uzyskanych dla jąder w fazie G_1 .

W celu ustalenia ploidalności genomu porównuje się intensywność fluorescencji jąder z próbą odniesienia, jaką jest roślina o znanej ploidalności. W tym przypadku cytometria wykazuje dużą przewagę nad wcześniej stosowaną metodą oznaczania liczby chromosomów. Jest ona łatwiejsza w wykonaniu (przygotowanie prób jest mniej skomplikowane), szybsza (można analizować setki prób w ciągu jednego dnia) i wymaga zaledwie kilku mg tkanki roślinnej. Umożliwia ona także wykrywanie miksploidów. Metoda ta jest wykorzystywana w wielu dziedzinach badań podstawowych, a także w rutynowych pracach hodowlanych [9].

4. ANALIZA I SORTOWANIE CHROMOSOMÓW

Duże rozmiary i złożoność genomów roślin powoduje trudności w ich analizie i mapowaniu. Problemy te mogą być zredukowane przez oczyszczenie izolowanych

frakcji chromosomów przy użyciu cytometru przepływowego. Dotychczas z powodzeniem rozdzielano chromosomy takich roślin, jak: pomidor [1,2], pszenica [26], *Haplopappus gracilis* [4,5], *Petunia hybrida* [3], *Melandrium album* [24], *Vicia faba* [11], *Arabidopsis thaliana* [18], groch [15] i jęczmień [12].

Etapem poprzedzającym sortowanie chromosomów jest synchronizacja cyklu komórkowego w celu akumulacji chromosomów metafazalnych w tkance i ich izolacja. Głównym kryterium doboru tkanki wykorzystywanej do izolacji chromosomów jest występowanie w niej komórek cechujących się zsynchronizowanym zachodzeniem podziałów lub możliwością sztucznej indukcji takiego zjawiska. Początkowo wykorzystywano w tym celu zawiesiny komórkowe hodowane *in vitro* [4,25]. Niestety, wykorzystanie tego typu materiału jest ograniczone przez niestabilność genetyczną i trudności w uzyskaniu kultur komórkowych z niektórych roślin. Bardziej dogodnymi materiałami do izolacji chromosomów okazały się protoplasty pochodzące z mezofilu liściowego [1] oraz stożki wzrostu korzeni [6]. W tym ostatnim przypadku bardzo przydatne są hodowle korzeniowe indukowane *Agrobacterium rhizogenes* [15]. Kumulacja chromosomów metafazalnych w materiale roślinnym jest indukowana przez blokowanie tworzenia się mikrotubul wrzeciona kariokinetycznego (kolchicyna) [4,25] lub traktowanie inhibitorami syntezy DNA (hydroksymocznik, afidykolina) [6].

Izolacja chromosomów z tkanki roślinnej jest utrudniona z powodu występowania ścian komórkowych. Dlatego pierwszym etapem izolacji jest mechaniczne lub enzymatyczne ich rozbicie. Podczas i po izolacji chromosomy są stabilizowane przez dodatek formaldehydu do buforu ekstrakcyjnego.

Wiele gatunków roślin ma bardzo rozbudowane genomy (pszenica, pszenżyto, rzepak), składające się z kilkunastu do kilkudziesięciu chromosomów. Ich chromosomy często wykazują duże podobieństwo pod względem rozmiarów i budowy. Stwarza to problemy w detekcji i rozdzieleniu poszczególnych chromosomów podczas cytometrycznego frakcjonowania. Również wykorzystanie dwóch barwników fluorescencyjnych wiążących się specyficznym z parami GT lub AT nie zawsze pozwala na uzyskanie dostatecznej rozdzielczości. W takich przypadkach stosuje się znakowanie specyficznych sekwencji znajdujących się na chromosomach przy pomocy technik FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*) [19,20,21,23] lub PRINS (ang. *primed in situ DNA labeling*) [16], co pozwala na rozdział chromosomów o bardzo zbliżonej wielkości.

Fracje zdefiniowanych chromosomów są bardzo cennym materiałem badawczym wykorzystywanym do wielu rodzajów analiz molekularnych. Zastosowania te obejmują: lokalizację genów na chromosomach, precyzyjne określanie kariotypu przez barwienie chromosomów, konstruowanie bibliotek DNA pojedynczych chromosomów i izolację markerów molekularnych specyficznych dla określonego chromosomu. Przydatność sortowanych cytometrycznie chromosomów została już wykazana podczas mapowania genomu człowieka do konstrukcji bibliotek DNA specyficznych

dla chromosomów [22]. Biblioteki chromosomowe mogą być przygotowywane w wektorach kosmidowych, lambda, BAC (ang. *bacterial artificial chromosom*) lub YAC (ang. *yeast artificial chromosom*). Do tej pory skonstruowano bibliotekę z sortowanych chromosomów 4A *Triticum aestivum* [26]. Jednak do tworzenia tego typu bibliotek niezbędne jest DNA z 10^5 – 10^6 chromosomów jako materiału wyjściowego. Sortowanie takiej liczby chromosomów stwarza pewne trudności. Jest ono bardzo długotrwałe, a dłuższy proces rozdziału powoduje obniżenie czystości izolowanej frakcji. Jeśli tworzona biblioteka ma posłużyć do izolacji chromosomo-specyficznych markerów molekularnych (markery RFLP, loci mikrosatelitarne), to możliwe jest posłużenie się w jej konstrukcji metodą PCR. Dzięki temu, możliwe jest zaostwienie parametrów sortowania na cytometrze, dla uzyskania bardzo specyficznych frakcji chromosomowych kosztem wydajności. Przy pomocy techniki DOP-PCR (ang. *degenerate oligonucleotide-primed PCR*) wykorzystującej bardzo mało specyficzne startery, używając wyjściowo 250–1000 chromosomów, możliwe jest objęcie amplifikacją niemal całego obszaru chromosomu. Fragmenty uzyskane po amplifikacji, o długości od 50 do 2200 pz można klonować do wektorów plazmidowych. Uzyskana w taki sposób biblioteka chromosomu 2 *Lycopodium pennellii* była wykorzystana do poszukiwania markerów RFLP [2], a biblioteki utworzone z wszystkich chromosomów *Vicia faba* były użyte do oznaczania markerów mikrosatelitarnych [14].

Przeprowadzając reakcję PCR przy użyciu starterów specyficznych dla genu, na matrycy pojedynczych chromosomów, możliwe jest mapowanie fizyczne badanego genu. Prążek amplifikowanego DNA uzyskiwany jest tylko na matrycy chromosomów, na których znajduje się poszukiwany gen. U niektórych gatunków roślin stosunkowo często występują translokacje chromosomowe. Jeśli badany gen znajduje się na przemieszczonym fragmencie chromosomu, wykorzystanie takich chromosomów pozwala jeszcze zwiększyć precyzję mapowania przez porównanie wyników uzyskanych na normalnych chromosomach i chromosomach z translokacjami [13]. Przy użyciu większej ilości markerów PCR, zaczerpniętych z mapy sprzężeń danego gatunku można także zrekonstruować wyjściowy kariotyp linii z translokacjami między chromosomami i precyzyjnie określić rozmiary translokacji. Mapowanie fizyczne i rekonstrukcja kariotypów możliwa jest również przy użyciu technik FISH i PRINS na mieszanych frakcjach chromosomów [13]. Technika FISH nadaje się do mapowania dużych regionów (ok. 10 kpz), natomiast technika PRINS pozwala na fluorescencyjne uwidocznienie krótszych obszarów (ok. 1000 pz).

5. PODSUMOWANIE

Cytometria przepływowa staje się ważnym narzędziem w badaniach nad genomami roślinnymi. Jej potencjalne zastosowania mogą dotyczyć zarówno badań podstawowych, jak i prac hodowlanych i produkcji rolniczej. Metoda ta może mieć

potencjalnie duże znaczenie dla lepszego poznania przegrupowań zachodzących w genomach podczas krzyżowania oddalonego. Można oczekiwać, że liczba praktycznych zastosowań będzie wciąż wzrastać i cytometria przepływowa stanie się narzędziem powszechniej stosowanym w badaniach dotyczących izolacji genów, mapowania oraz struktury i funkcji genomów.

LITERATURA

- [1] ARUMUGANATHAN K, SLATTERY JP, TANKSLEY SD, ERLE ED. Preparation and flow cytometric analysis of metaphase chromosomes of tomato. *Theor Appl Genet* 1991; **82**: 101–111.
- [2] ARUMUGANATHAN K, MARTIN GB, TELENIUS H, TANKSLEY SD, ERLE ED. Chromosome 2-specific DNA clones from flow-sorted chromosomes of tomato. *Mol Gen Genet* 1994; **242**: 551–558.
- [3] CONIA J, BERGOUNIOUX C, BROWN S, PERENNES C., GADAL P. Caryotype en flux biparamétrique de *Petunia hybrida*. Tri du chromosome numéro I. *C R Acad Sci Paris* 1988; Ser. III **307**: 609–615.
- [4] DE LAAT AMM, BLAAS J. Flow-cytometric characterisation and sorting of plant chromosomes. *Theor Appl Genet* 1984; **67**: 463–467.
- [5] DE LAAT AMM, SCHEL JHN. The integrity of metaphase chromosomes of *Haplopappus gracilis* (Nutt.) Gray isolated by flow cytometry. *Plant Sci* 1986; **47**: 145–151.
- [6] DOLEZEL J, EIHALIKOVA J, LUCRETTI S. A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L. *Planta* 1992; **188**: 93–98.
- [7] DOLEZEL J, DOLEZELOVA M, NOVAK FJ. Flow cytometric estimation of the nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biol Plant* 1994; **36**: 351–357.
- [8] DOLEZEL J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *J Appl Genet* 1997; **38**: 258–302.
- [9] DOLEZEL J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement. WUV Universitätsverlag 1997: 80–90.
- [10] KUBALAKOVA M, MACAS J, DOLEZEL J. Mapping of repeated DNA sequences in plant chromosomes by PRINS and C-PRINS. *Theor Appl Genet* 1997; **94**: 758–763.
- [11] LUCRETTI S, DOLEZEL J, SHUBERT I, FUCHS J. Flow karyotyping and sorting of *Vicia faba* chromosomes. *Theor Appl Genet* 1993; **85**: 665–672.
- [12] LYSAK MA, CIHALIKOVA J, KUBALAKOVA M, SIMHOVA H, KUNZEL G, DOLEZEL J. Flow karyotyping and sorting of mitotic chromosomes of barley. *Chromosome Res* 1999; **7**: 431–444.
- [13] MACAS J, DOLEZEL J, LUCRETTI S, PIHC U, MEISTER A, FUCHS J, SCHUBERT I. Localisation of seed protein genes on flow-sorted field bean chromosomes. *Chromosome Res* 1993; **1**: 107–115.
- [14] MACAS J, GUALBERTI G, NOUZOVA P, LUCRETTI S, DOLEZEL J. Construction of chromosome-specific DNA libraries covering the whole genome of field bean (*Vicia faba* L.). *Chromosome Res* 1996; **4**: 531–539.
- [15] NEUMAN P, LYSAK M, DOLEZEL J, MACAS J. Isolation of chromosomes from *Pisum sativum* L. hairy root cultures and their analysis by flow cytometry. *Plant Science* 1998; **137**: 205–215.
- [16] PICH U, MEISTER A, MACAS J, DOLEZEL J, LUCRETTI S, SCHUBERT I. Primed *in situ* labelling facilitates flow sorting of similar sized chromosomes. *Plant J* 1995; **7**(6): 1039–1044.

- [17] PRIMOSE SB. Principles of genome analysis: A guide to mapping and sequencing DNA from different organisms. Blackwell Science Limited, Oxford 1998: 75–78.
- [18] SAMOYLOVA TI, MEISTER A, MISERA S. The flow karyotype of *Arabidopsis thaliana* interphase chromosomes. *Plant J* 1996; **10**(5): 949–954.
- [19] TRACK BG, VAN DEN ENGH J, LANDEGENT NJ. Detection of DNA sequences in nuclei in suspension by *in situ* hybridisation and dual beam flow cytometry. *Science* 1985 **230**: 1401–1403.
- [20] TRACK BG, VAN DEN ENGH D, MULLIKIN F, WALDMAN H, TRACK BG, VAN DEN ENGH J. Fluorescence *in situ* hybridisation to interphase cell nuclei in suspension allow flow cytometric analysis of chromosome content and microscopic analysis of nuclear organisation. *Hum Genet* 1988; **78**: 251–259.
- [21] VAN DEKKEN H, ARKESTEIJN GJA, VISSER JWM, BAUMAN JGJ. Flow cytometric quantification of human chromosome specific DNA sequences by single and bicolour fluorescent *in situ* hybridisation to lymphocyte interphase nuclei. *Cytometry* 1990; **11**: 153–164.
- [22] VAN DILLA MA, DEAVN LL. Construction of gene libraries for each human chromosome. *Cytometry* 1990; **11**: 208–218.
- [23] VENTER JC, SMITH HO, HOOD L. A new strategy for genome sequencing. *Nature* 1996; **381**: 364–366.
- [24] VEUSKENS J, MARIE D, HINNISDAELS S, BROWN SC. Flow cytometry and sorting of plant chromosomes. *Flow Cytometry and Cell Sorting* (Radbruch A., ed.) Heidelberg; Springer Verlag 1992: 177–188.
- [25] WANG AS, PHILIPS RL. Synchronisation of suspension culture cells. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant*. 1984; Vol. 1. 175–181. Academic Press, Inc., New York
- [26] WANG ML, LEITCH AR, SCHWARZACHER T, HESLOP-HARRISON JS, MOORE G. Construction of a chromosome-enriched HpaI library from flow-sorted wheat chromosomes. *Nucl Acids Res* 1992; **20**: 1897–1901.

Adres autora: ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań

KOD GENETYCZNY

Pierwszy nukleotyd	Drugi				Trzeci
	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr Stop Stop	Cys Cys Stop Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

AMINOKWASY

Aminokwas	Skrót trójliterowy	Skrót jednoliterowy
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Aspargina	Asn	N
Cysteina	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Glicyna	Gly	G
Fenylalanina	Phe	F
Histydyna	His	H
Izoleucyna	Ile	I
Kwas asparginowy	Asp	D
Kwas glutaminowy	Glu	E
Leucyna	Leu	L
Lizyna	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Seryna	Ser	S
Treonina	Thr	T
Tryptofan	Trp	W
Tyrozyna	Tyr	Y
Walina	Val	V

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

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 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 270) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i *e-mail*, 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 1 str.) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

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

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę. 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. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora.

Redakcja prosi także o dołączenie do maszynopisu tytułu artykułu i podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,		Treść pracy nie była uprzednio publikowana nie została	
tabel i rycin.	tak	wysłana do innej redakcji	tak nie
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.	tak	Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy	
Jest zgoda osób, których informacje niepubli-		pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	tak nie
kowane są zamieszczone w tekście artykułu	tak	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.			podpisy wszystkich autorów

Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń 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.

Streszczenie ma mieć następującą strukturę:

j. polski		j. angielski
Podstawy zagadnienia:	jedno zdanie	Background:
Podtytuły:	do każdego podtytułu 3–5 zdań	Subtitles:
Wnioski:	2 zdania	Conclusions:
Słowa kluczowe:	do 8 słów	Key words:

Takie streszczenia standardowe mogą być ważne, gdyż obecnie czyta się je komputerowo. Treść streszczenia zachęca bądź nie zachęca do przeczytania całego artykułu.

Prosimy również Autorów o podawanie adresów e-mail, o ile je mają.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 2000 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.

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2000

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2000 pod adresem:
FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99,
01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl

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 2000:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 68 zł,
a dla odbiorców indywidualnych 25 zł.

Subscription orders for *POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI* for 2000 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,
tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;

Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa, No 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

NOWAK J., JANUSZKIEWICZ-LEWANDOWSKA D.: Przyszłość terapii genowej w schorzeniach neurologicznych Future of gene therapy in neurological disorders	215
KURPISZ M., HORST A.: Klonowanie ssaków – stan obecny i perspektywy Mammalian cloning: now and future	229
GRONEK P., SŁOMSKI R.: Poszukiwanie genów odpowiedzialnych za cechy psychiczne człowieka oraz cechy instynktowne zwierząt Searching for genes responsible for personality traits in humans and instinctive traits in animals	239
MIKOŁAJCZYK S., BRODA Z.: Kultury pylników jako jedna z metod indukowania haploidów żyta (<i>Secale cereale</i> L.) Anther cultures as a method of the induction of rye haploids (<i>Secale cereale</i> L.)	255
WOLKO Ł., SŁOMSKI R.: Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach molekularnych roślin Application of flow cytometry in plant molecular studies	261
Kod genetyczny i skróty aminokwasów	269
Informacje dla autorów	270
Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK	271
Warunki prenumeraty kwartalnika PBK	271

TREŚĆ – CONTENTS

SŁOMSKI R.: Przedmowa	1
NAPIERAŁA D., KACZMAREK M., SŁOMSKI R.: Struktura, ekspresja i mutacje genu DMD, największego genu człowieka Structure, expression and mutations of DMD gene, the largest human gene	3
PŁAWSKI A., PASZKOWSKI J., SŁOMSKI R.: Gen APC APC gene	21
RYBCZYŃSKA M., PAWLAK A. L.: Budowa i funkcje białka ATM Structure and function of protein ATM	39
KALAK R., HORST-SIKORSKA W., SŁOMSKI R.: Podłoże genetyczne osteoporozy – aktualny stan badań Genetic basis of osteoporosis – current state of research	53
SIEMIENIAKO B., KWIATKOWSKA J., KACZMAREK M., SŁOMSKI R.: Zastosowanie badań hybrydyzacyjnych w diagnostyce molekularnej Application of hybridization analysis in molecular diagnostics	73
SZALATA M., SŁOMSKI R.: Zakończenia chromosomów: telemery, telemeraza i białka współdziałające The chromosome ends: telomeres, telomerase and telomere binding proteins	95
KUSZ K., KOTECKI M., JARUZELSKAJ.: Molekularne badania zaburzeń rozwoju płciowego: klucz do zrozumienia genetycznego mechanizmu determinacji płci Molecular analysis of sex development abnormalities: the key to understand genetic mechanism of sex determination	119
KORCZ A., KOTECKI M., WOJDA A., JARUZELSKA J.: Diagnostyka molekularna chromosomu Y u mężczyzn z zaburzeniami spermatogenezy korzystających z zapłodnienia <i>in vitro</i> Molecular analysis of Y chromosome in men with defects of spermatogenesis undergoing <i>in vitro</i> fertilization	129
NOWAK J., LEWANDOWSKI K., JANUSZKIEWICZ D.: RPLA telemerazy w rozwoju procesu nowotworowego The role of telomerase in the development of cancer	143
ŚWITOŃSKI M., CHOLEWIŃSKI G.: Rozwój markerowych map genomów psa i konia Development of markers' genome map of dog and horse	151
ZAWADA M., LIWEŃ I.: Analiza genetyczna metodami klasycznej i molekularnej cytogenetyki The genetic analysis by classical and molecular cytogenetics	165
KUJAWSKI M., SZYFTER K.: Cytogenetyczne badania nowotworów człowieka – płaskonabłonkowy rak krtani Cytogenetic analysis of human neoplasms squamous cell carcinoma of the larynx	181
SZYFTER K., JAŁOSZYŃSKI P., KUJAWSKI M., JASKUŁA-SZTUL R., JARMUŻ M., BANASZEWSKI J., BIEGALSKI W., DĄBROWSKI P., GAJECKA M., GOLUSINSKI W., KITA S., PABISZCZAK M.: Zagadnienia metodyczne w analizie molekularnej raka krtani Methodological aspects of molecular analysis in laryngeal cancer	193
<i>cd. spisu treści na odwrocie</i>	

Indeks 369705