

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

TOM 15-NR 3
1988 (233-412)

Postępy Biologii Komórki

PWN WARSZAWA – WROCŁAW

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,
Maciej KAWALEC – sekretarz

Rada Redakcyjna

Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KORQHODA,
Leszek KUŹNICKI, Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca,
Aleksandra PRZEŁĘCKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

Państwowe Wydawnictwo Naukowe – Oddział Wrocławski

Nakład 543+97 egz. Ark. wyd. 14,75. Ark. druk. 11,25. Papier druk. sat. kl. III. 80 g. 70 × 100 cm. Oddano do składania 17 III 1988 r.
Podpisano do druku w lipcu 1988 r. Druk ukończono w sierpniu 1988 r. Zam. 3185/85. Cena 160 zł

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

**KARBOKSYLAZA/OKSYGENAZA RYBULOZO-1,5-BISFOSFORANU —
KLUCZOWY ENZYM FOTOSYNTETY I FOTOODDYCHANIA *****RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE — THE KEY
ENZYME IN PHOTOSYNTHESIS AND PHOTORESPIRATION**

Stanisław MALESZEWSKI

Zakład Fotosyntezy i Technik Izotopowych, Instytut Botaniki,
Uniwersytet Warszawski

Streszczenie. Przedstawiono biosyntezę, budowę, aktywację i działanie kluczowego enzymu fotosyntetycznego karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu. Przewidywano zasady jego regulacji oraz funkcje w fotosyntezie i fotooddychaniu.

Summary. Biosynthesis, structure, activation and action of key photosynthetic enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase have been reviewed. The regulation and the role of this enzyme in photosynthesis and photorespiration have been discussed.

Stosowane skróty

ATP	— adenozylo-5-trifosforan
3-ketoCABP	— 2-karboksy-3-keto-arabinitolo-1,5-bisfosforan
CAP	— 2-karboksy-arabinitolo-1-fosforan
L	— duża podjednostka karboksylazy/oksygenazy RuBP
NADP	— fosforan dinukleotydu nikotynamido-adeninowego
NADPH	— forma zredukowana NADP

* Referat wygłoszony podczas Sympozjum nt. Mechanizmy oddziaływania światła na procesy metaboliczne, zorganizowanego w Krakowie 26-28 maja 1987 r. przez Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego UJ, Instytut Biologii WSP w Krakowie oraz Sekcję Fotobiologii PTBioch.

Praca wykonana w ramach CPBP 05.02.

PGA	— kwas 3-fosfoglicerynowy
rośliny C ₃	— rośliny, u których akceptorem CO ₂ w fotosyntezie jest tylko RuBP
rubisco	— karboksylaza/oksygenaza RuBP
RuBP	— rybulozo-1,5-bisfosforan
S	— mała podjednostka karboksylazy/oksygenazy RuBP

1. WPROWADZENIE

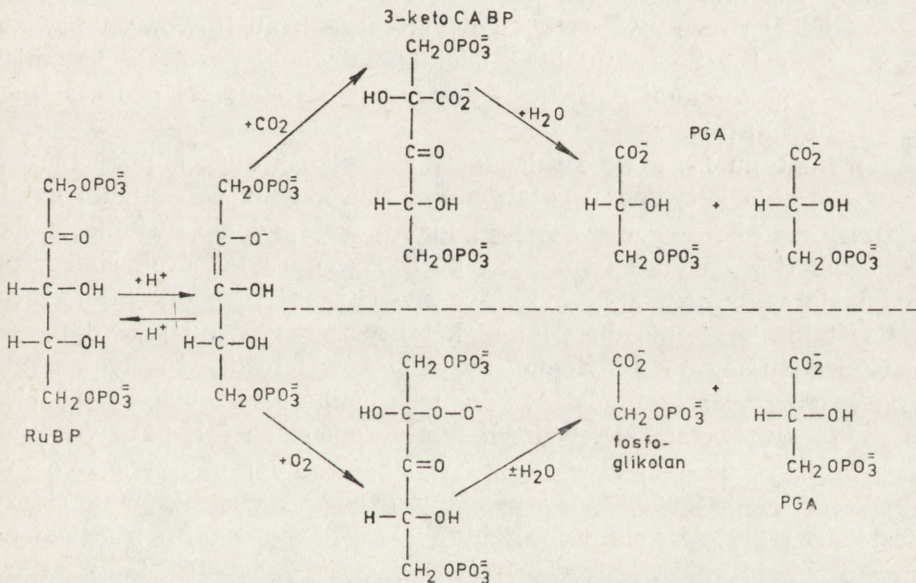
Szybkość fotosyntezy netto u roślin C₃ może zwiększyć się niemal dwukrotnie po obniżeniu stężenia O₂ w środowisku do 1 - 2⁰%. Powodem tego jest duże ograniczenie hamującego działania O₂ na fotosyntezę, zjawiska nazywanego efektem Warburga [113]. Możliwość uzyskania tak znacznego wzrostu szybkości fotosyntezy była silnym bodźcem do podejmowania badań nad tym zjawiskiem. Badania te doprowadziły do wyjaśnienia jego biochemicznego mechanizmu. Niewystarczająco rozumiemy jeszcze jednak fizjologiczną rolę działania tlenu w fotosyntezie, natomiast całkowicie zawiodły nadzieje na osiągnięcie praktycznych korzyści przez ewentualne wyeliminowanie tego zjawiska metodami chemicznymi lub genetycznymi u roślin uprawnych.

Intensywne badania nad wpływem tlenu na fotosyntezę zapoczątkowało stwierdzenie, że tlen zwiększa wytwarzanie CO₂ w fotosyntezujących tkankach [26]. W latach sześćdziesiątych udowodniono, że następuje to w procesie odmiennym od oddychania w ciemności, dla którego przyjęto nazwę fotooddychanie [35]. Jedną z właściwości fotooddychania, różniącą ten proces od oddychania w ciemności (mitochondrialnego), jest prostoliniowa zależność od O₂ w pełnym zakresie stężeń O₂. Równocześnie wykazano, że substratem fotooddychania jest kwas glikolowy [121] i ustalono schemat przemian tego związku [108], przebiegających w chloroplastach, peroksysomach i mitochondriach, związanych z wytwarzaniem CO₂ na świetle w fotosyntetyzujących komórkach. Przemiany te są obecnie nazywane cyklem kwasu glikolowego lub fotooddechowym oksydacyjnym cyklem przemian węgla. Jednym z ważniejszych osiągnięć było stwierdzenie, że bezpośredni prekursor kwasu glikolowego — kwas fosfoglikolowy — jest wytwarzany w chloroplastach przy udziale O₂ w reakcji kompetycyjnej w stosunku do fotosyntetycznego wiązania CO₂, katalizowanej przez karboksylazę/oksygenazę RuBP [17, 85]. Odkrycie to wzmogło zainteresowanie tym dwufunkcyjnym enzymem. Intensywnie badano jego biosyntezę, budowę, aktywację i regulację enzymu oraz mechanizmu katalizowanej reakcji. Opracowano syntetyczne modele zależności obu aktywności enzymu oraz fotosyntezy

i fotooddychania od najważniejszych czynników środowiskowych [31]. Informacje o wynikach wcześniejszych badań nad tym enzymem znajdują się w artykułach Maleszewskiego [72], Kaniugi [59], Bytniewskiej [22] oraz Maleszewskiego i Kamińskiej [74].

2. KARBOKSYLAZA/OKSYGENAZA RuBP

Karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu (EC.4.1.1.39) katalizuje przyłączenie CO_2 do rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBP) z wytworzeniem 2 cz. kwasu 3-fosfoglicerynowego (PGA). Przy udziale O_2 przebiega natomiast oksygenacja RuBP, której produktami są PGA i fosfoglikolan (ryc. 1). Enzym ten, określany skrótowo „rubisco”, ini-



Ryc. 1. Reakcje katalizowane przez karboksylazę/oksygenazę RuBP [88]

cjuje dwa pozornie przeciwstawne procesy: asymilację CO_2 i fotosyntezy oraz fotooddechowy oksydacyjny cykl przemian węgla (fotooddychanie) [74]. Rubisco jest obecna u wszystkich fotoautotrofów. U roślin wyższych występuje w stromie chloroplastów w znacznej ilości (do $250 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), stanowiąc zwykle więcej niż 50% rozpuszczalnych białek dojrzałych liści. Prawdopodobnie jest więc białkiem występującym w przyrodzie w największej ilości

[30, 40]. Stężenie enzymu w stromie chloroplastów osiąga wartość 0,4 - 0,5 mM, a stężenie jego centrów aktywnych (8 centrów w cząsteczce) wynosi odpowiednio 4 mM [50].

2.1. BUDOWA I BIOSYNTeza

Rubisco wyodrębniona z glonów i roślin wyższych ma masę cząsteczkową $500\ 000 \pm 50\ 000$. Składa się z 8 dużych podjednostek (L) o m.c. $55\ 000 \pm 4000$ i 8 małych podjednostek (S) o m.c. $15\ 000 \pm 3000$. Typ enzymu L_8S_8 jest prawdopodobnie charakterystyczny dla wszystkich eukariotycznych fotoautotrofów [117]. Donoszono, że u bakterii struktura enzymu może być zróżnicowana: L_2 (u *Rhodospirillum rubrum*), L_4 , L_6 , L_6S_6 , L_8 , L_8S_8 [81]. Z *Rhodopseudomonas sphaeroides* wyizolowano 2 formy enzymu: L_8S_8 oraz L_6 i sugerowano, że forma enzymu może zależeć od warunków wzrostu tego mikroorganizmu [37]. Występowanie struktur L_2 i L_8S_8 jest dobrze udokumentowane, pozostałe natomiast mogą być produktami częściowej destrukcji następującej podczas izolowania enzymu [81].

Enzym typu L_2 , a więc składający się tylko z dużych podjednostek, wykazuje obie aktywności katalityczne. Dowodzi to, że centrum katalityczne jest zlokalizowane w dużej podjednostce. Jednakże usunięcie podjednostek S z enzymu typu L_8S_8 , pochodzącego z komórek sinicy, powodowało zanik jego aktywności, co sugeruje, że podjednostki te mogą mieć istotne znaczenie dla funkcji katalitycznej enzymu [5, 40].

Gen kodujący dużą podjednostkę u glonów i roślin wyższych występuje w chloroplastowym DNA, a synteza białka L przebiega z udziałem 70 S rybosomów, zlokalizowanych w chloroplastach [51, 81]. W szpinaku [65] i grochu [92] stwierdzono występowanie prekursora L o m.c. wyższej o około 2000, który poddany działaniu ekstraktów z chloroplastów przekształcał się w formę dojrzałą. Znaczenie tej potranslacyjnej transformacji nie jest jeszcze wyjaśnione.

Mała podjednostka jest zakodowana w DNA jądrowym. Tym samym mRNA prekursora S jest transkrybowany w jądrze, a proces translacji przebiega w cytoplazmie z udziałem 80 S rybosomów. Powstaje polipeptyd o m.c. większej o 4000 - 6000 od m.c. dojrzałej S w wyniku wydłużenia końca N jej łańcucha. Funkcja dodatkowego polipeptydu ma niewątpliwie związek z wymagającym nakładu energii w postaci ATP [39, 103] potranslacyjnym transportem S przez otoczkę chloroplastów. Jest on odszczepiany w czasie transportu przez enzym zlokalizowany w stromie chloroplastów, po czym S łączy się z endogenną L, tworząc ostateczną formę holoenzymu L_8S_8 [51].

Nic nie wskazuje, żeby istniało powiązanie między procesami syntezy obu podjednostek rubisco, przebiegającymi w różnych kompartmentach komórki. Nie stwierdzono, żeby obecność S w stromie chloroplastów wpływała na transkrypcję chloroplastowego DNA, a synteza S nie wymaga obecności funkcjonalnych chloroplastów [29, 33, 117]. Nie dotyczy to oczywiście organizmów prokariotycznych, u których geny kodujące L i S stanowią fragmenty tej samej cząsteczki DNA [2].

Ekspresja obu genów, zarówno chloroplastowego, kodującego L, jak i jądrowego, kodującego S, jest za pośrednictwem układu fitochromowego uzależniona od światła. Mechanizm stymulacji przez światło biosyntezy rubisco nie jest w pełni wyjaśniony. Dane doświadczalne dowodzą, że światło wpływa bezpośrednio zarówno na etap transkrypcji, jak i translacji [40, 48, 95].

Na podstawie wyników badań prowadzonych metodami mikroskopii elektronowej i krystalografii rentgenowskiej opracowano modele przestrzennych relacji między podjednostkami w krystalicznej rubisco. Model przyjęty dla enzymu z tytoniu zakłada ułożenie globularnych L i S w dwu warstwach wokół centralnego kanału [28]. Dla enzymu z chemoautotraficznej bakterii wodorowej *Alcaligenes eutrophus* zaproponowano model różniący się od opisanego już tu głównie nie globularnym charakterem L [18]. Stwierdzone różnice mogą być jednak przynajmniej częściowo spowodowane odmiennymi warunkami krystalizacji enzymu [81].

Pierwszorzędowa struktura (skład i sekwencja aminokwasów) dużych podjednostek rubisco jest ewolucyjnie w wysokim stopniu konserwatywna. Enzym ten u systematycznie odległych gatunków jest bowiem bardzo podobny. Wyizolowano geny kodujące te podjednostki z kukurydzy [79], szpinaku [122], tytoniu [3], *Chlamydomonas* [27], *Rhodospirillum rubrum* [45] oraz z innych fotoautotrofów i po sklonowaniu oznaczono sekwencję nukleotydów. Na tej podstawie, jak też stosując metody chemii analitycznej, określono sekwencję aminokwasów w białku L. Stwierdzono wysoką homologię składu aminokwasowego polipeptydów L pochodzących z różnych organizmów. Duża podjednostka rubisco składa się z niespełna 500 reszt aminokwasowych, np. 475 u szpinaku i 466 u *Rhodospirillum rubrum* [45]. Szczególnie konserwatywne okazały się pewne fragmenty cząsteczki: od reszty 169 do 220 i od 321 do 340, stanowiące prawdopodobnie najbliższe sąsiedztwo centrum aktywacyjnego i centrum katalitycznego enzymu. Rejony te są identyczne lub wykazują zwiększony stopień homologii nawet wówczas, gdy tak jak w przypadku *R. rubrum* podobieństwo całego enzymu do typu występującego u roślin wyższych jest wyjątkowo małe. Zwrócono też uwagę na rejon reszt 162 - 192, w którym występują wyłącznie aminokwasy obojętne

lub zasadowe. Obecność takiego typu aminokwasów w tej części polipeptydu warunkuje jego aktywność katalityczną [27, 81].

Badania enzymu z wielu organizmów pro- i eukariotycznych wskazują, że skład i sekwencja aminokwasów małej podjednostki są w mniejszym stopniu podobne niż w przypadku dużej podjednostki. Stwierdzono tu bowiem średnio zaledwie 70% identycznych reszt aminokwasowych. W polipeptydzie S wykryto jednak również kilka odcinków ewolucyjnie bardziej konserwatywnych, które są prawdopodobnie ważne dla funkcji tych podjednostek [81, 107].

Aminokwasy tworzące zarówno centrum aktywacyjne, jak i centrum katalityczne rubisco stanowią fragmenty łańcucha dużej podjednostki. Należy również uznać za udowodnione, że miejsce wiązania RuBP jest tam także zlokalizowane [44, 46, 81]. Funkcja małej podjednostki jest natomiast jeszcze w dużym stopniu zagadkowa, a wyniki badań dotyczących tego problemu są sprzeczne. Niewątpliwie podjednostki S nie są bezwzględnie konieczne do aktywacji enzymu, ani też do przejawiania się jego aktywności katalitycznych. Stwierdzono jednak, że stosunek aktywności karboksylacyjnej do oksigenacyjnej może znacznie się różnić, jeśli porówna się enzym typu L_2 (z *R. rubrum*) z enzymem typu L_8S_8 . Enzym zawierający S ma około 10-krotnie większe powinowactwo do CO_2 niż enzym składający się tylko z L [24, 55, 57, 119, 120]. Mogłoby to świadczyć, że podjednostki S wpływają na powinowactwo rubisco do CO_2 . Jednakże donoszono również o wyodrębnieniu z różnego materiału enzymu typu L_8S_8 , który miał podobnie niskie powinowactwo do CO_2 jak enzym o budowie L_2 z *R. rubrum* [4, 12]. Porównując kinetykę aktywacji obu form enzymu występujących u *Rhodospseudomonas sphaeroides* (L_6 i L_8S_8), uzyskano wyniki, które mogą prowadzić do wniosku, że obecność S przyspiesza proces aktywacji enzymu [38, 81].

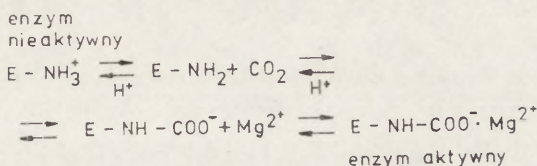
W badaniach rubisco, wyodrębnionej z morskiej sinicy *Synechococcus*, polegających na usuwaniu S z enzymu i następnie jego rekonstrukcji stwierdzono, że aktywność enzymu jest proporcjonalna do zawartości S. Przy całkowitym braku S podczas aktywacji osiągnięta maksymalna aktywność była o około 60% niższa niż aktywność kompletnego enzymu. Nie wykazano natomiast, żeby od obecności S zależała początkowa szybkość jego aktywacji [5, 6]. W podobnych badaniach nie potwierdzono jednak, żeby od małych podjednostek zależały kinetyczne właściwości rubisco. Po rekonstrukcji holoenzymu, w którym własne S zostały zastąpione obcymi, pochodzącymi z enzymu o wyjątkowo dużym powinowactwie do CO_2 , nie stwierdzono zwiększonego powinowactwa do CO_2 uzyskanego hybrydu enzymatycznego [7, 49].

Podsumowując wyniki dotychczasowych badań nad funkcją małych podjednostek rubisco należy zgodzić się z poglądem, że zwiększają one

stopień aktywacji enzymu. Prawdopodobnie w nie wyjaśniony jeszcze sposób podjednostki te stabilizują konformację zaktywowanej rubisco [49, 81].

2.2. AKTYWACJA

W celu otrzymania pełnej katalitycznej aktywności do białka karboksylazy/oksygenazy RuBP musi przyłączyć się cząsteczka CO_2 (nie pełniąca funkcji substratu) i 2-wartościowy metaliczny kation, najlepiej Mg^{2+} . W procesie aktywacji CO_2 tworzy karbaminian z ϵ -aminową grupą lizyny 201 w polipeptydzie L. Następnie Mg^{2+} przyłącza się wiązaniem koordynacyjnym do karbaminianu (ryc. 2). Powstały 3-składniko-



Ryc. 2. Aktywacja karboksylazy/oksygenazy RuBP przez CO_2 , Mg^{2+} oraz H^+ [49, 88]

wy kompleks stanowi dopiero w pełni aktywną formę enzymu. Proces aktywacji jest odwracalny i przebiega do osiągnięcia stanu dynamicznej równowagi między nieaktywną i zaktywowaną postacią enzymu. Końcowe położenie stanu równowagi (stopień aktywacji enzymu) zależy od wielu czynników, takich jak $[\text{H}^+]$, $[\text{CO}_2]$, $[\text{Mg}^{2+}]$ i innych, np. organicznych fosforanów [14, 40, 49, 70, 81].

Aktywację rubisco *in vitro* przeprowadza się z łatwością inkubując wyizolowany enzym w środowisku zawierającym CO_2 i Mg^{2+} w odpowiednich stężeniach. Dokonuje się tego tuż przed zainicjowaniem przez dodanie RuBP reakcji katalizowanych przez enzym.

W badaniach nad aktywacją rubisco zwracano uwagę na trudne do wytłumaczenia odmienne wymagania tego procesu w komórce i w sztucznym środowisku. Osiągnięcie pełnej aktywności enzymu *in vitro*, odpowiadającej normalnej szybkości fotosyntezy, jest możliwe jedynie po zastosowaniu нефизjologicznych, bardzo wysokich stężeń CO_2 i Mg^{2+} . Wykluczone jest, żeby *in vivo* warunki te były spełniane, co wskazuje, że w komórce pełna aktywność enzymu jest osiągnięta przy znacznie niższych stężeniach tych efektorów. Stwierdzana niezbędność światła do aktywacji rubisco zarówno w izolowanych chloroplastach [15, 71, 94, 116], jak i w całych liściach [77, 86, 87, 94, 106] jest tłumaczona wzrostem pH i stężenia Mg^{2+} w miejscu działania enzymu (w stromie chloro-

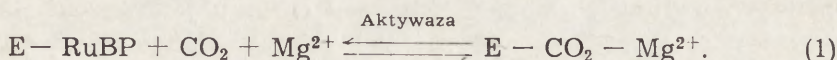
plastów) podczas oświetlania [50, 89, 90]. Stopień aktywacji rubisco in vivo jest rzeczywiście zawsze funkcją intensywności światła [77, 87]. Jednakże natężenie światła, niezbędne do wysycenia procesu aktywacji, jest znacznie wyższe od światła wysycającego alkalizację stromy chloroplastów i transport Mg^{2+} [47]. Ponadto rubisco wyizolowana z liści uprzednio oświetlanych światłem wysycającym aktywację jest prawie całkowicie zaktywowana nawet gdy stężenie CO_2 było wielokrotnie niższe od niezbędnego do aktywacji enzymu wyizolowanego [56, 81]. W liściach eksponowanych na światło słabsze od wysycającego aktywację enzym występuje głównie w postaci nieaktywnej i jest wówczas niewrażliwy na zmiany stężenia CO_2 [86, 96]. Przytoczone obserwacje zgodnie wskazywały, że warunki świetlnej aktywacji rubisco in vivo wyraźnie odbiegają od tych, jakie muszą być spełnione in vitro. Nasuwał się wniosek, że w układzie sztucznym brak jest jakiegoś czynnika działającego w komórce.

Wyodrębniono mutantą *Arabidopsis*, oznaczonego jako mutant rca, w którym rubisco nie ulegała aktywacji świetlnej. Enzym wyizolowany z mutantą rca i z rośliny dzikiego typu miał jednak identyczną charakterystykę kinetyczną i izoelektryczną, a więc uszkodzenie w aparacie genetycznym mutantą rca nie miało wpływu na samą rubisco [106]. Dalszym, bardzo ważnym osiągnięciem było odkrycie frakcji rozpuszczalnego, chloroplastowego białka, które uczestniczy w procesie świetlnej aktywacji rubisco, a którego brak jest u mutantą rca. Wykazano w ten sposób, że świetlna aktywacja rubisco nie jest procesem samorzutnym, lecz że jest reakcją enzymatyczną. Mutacje jądrowe, będące przyczyną fenotypu rca *Arabidopsis*, wpływają na ekspresję dwu polipeptydów stromy chloroplastów. Uzyskano dowody, że polipeptydy te stanowią podjednostki białka stromy chloroplastów, enzymu katalizującego aktywację rubisco [93, 94].

Odkrywczy aktywazy rubisco sugerują, że pośredniczy ona w świetlnej regulacji aktywności karboksylazy/oksygenazy RuBP, przy czym mechanizm regulacji przez światło aktywności aktywazy rubisco musi być inny niż w przypadku innych enzymów fotosyntetycznych. Sztuczne akceptory przejmujące elektrony z aparatu fotosyntetycznego (metylowiologen, piocyjanina), które hamują świetlną aktywację wielu enzymów fotosyntetycznych, przebiegającą przy udziale układu ferredoksyna/tiredoksyna, stymulują bowiem świetlną aktywację rubisco zarówno w komórkach, jak i w rekonstruowanych układach. Jest to zgodne z poglądem, że bezpośrednim czynnikiem określającym aktywność rubisco jest indukowana przez światło zmiana pH stromy chloroplastów, a nie wytwarzanie równoważników redukcyjnych. Sztuczne akceptory elektronów nie wpływały na aktywację rubisco w liściach mutantą rca. Po-

twierdza to założenie, że wpływ światła na rubisco odbywa się za pośrednictwem nowo odkrytej aktywazy [93, 94].

Autorzy prac donoszących o istnieniu aktywazy rubisco proponują hipotetyczny mechanizm działania odkrytego przez siebie enzymu. Biorąc pod uwagę to, że niezależnie od warunków świetlnych i koncentracji CO₂ stężenie RuBP w chloroplastach jest najczęściej większe niż stężenie centrów aktywnych rubisco, zakładają, że enzym ten w ciemności występuje głównie w postaci nieaktywnego kompleksu E — RuBP [83, 86, 87]. Kompleks ten uniemożliwia lub istotnie zmniejsza spontaniczną aktywację enzymu przez CO₂ i Mg²⁺. Funkcja aktywazy polegałaby na katalizowaniu przekształcenia tego kompleksu w aktywny enzym składający się z trzech komponentów zgodnie z następującym równaniem:



Należy podkreślić, że aktywacja rubisco nie jest procesem statycznym, lecz dynamicznym [16]. Osiągnięty w określonych warunkach stopień aktywacji nie jest trwały, lecz zmienia się równocześnie ze zmianami środowiska, w którym enzym funkcjonuje.

2.3. CENTRUM AKTYWNE I PROCES KATALIZY

W wyniku aktywacji rubisco uzyskuje zdolność katalizowania zarówno karboksylacji, jak i oksigenacji RuBP. Reakcje te przebiegają w tym samym centrum aktywnym. Rozwój obu aktywności, np. w młodocianych lub etiolowanych liściach, jest zawsze ściśle związany, a pod wpływem różnych czynników (z wyjątkiem CO₂ i O₂) ulegają one w tym samym stopniu stymulacji lub inhibicji [14, 21, 36, 55]. Ostatnio udało się zlokalizować rejon centrum aktywnego w polipeptydzie L. Stwierdzono, że ważne dla aktywności rubisco reszty lizyny zajmują pozycje u *R. rubrum* 166 i 329, a u szpinaku 175 i 334 [43, 46].

Katalizowanie przez enzym obu reakcji w tym samym centrum aktywnym musi oznaczać, że początkowe etapy tych reakcji są wspólne. Pierwszym etapem w obu reakcjach jest wiązanie RuBP do zaktywowanego enzymu i wytworzenie enodiolowego produktu pierwotnego (ryc. 1). Enodiolowa forma RuBP powstaje przez odłączenie protonu od grupy atomów przy C₃, katalizowane przez zasadowy fragment rubisco. Konsekwencją jest wytworzenie nukleofilowego centrum przy C₂, które reaguje następnie z CO₂ lub O₂. W reakcji karboksylacji, w wyniku przyłączenia CO₂, a nie HCO₃, powstaje 6-węglowy produkt pośredni 2-karboksy-3-keto-arabinitolo-1,5-bisfosforan (3-ketoCABP). Hydroliza tego związku z przerwaniem wiązania między C₂ i C₃ daje 2 częst-

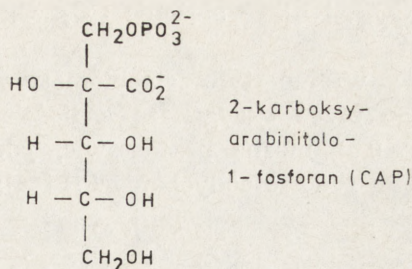
ki PGA. Mechanizm reakcji oksygenacji RuBP nie jest dostatecznie wyjaśniony. Następuje tu również rozszczepienie łańcucha enodiolowej formy RuBP między C₂ i C₃, lecz z wytworzeniem PGA i fosfoglikolanu. W reakcji tej tylko 1 atom biorącej w niej udział molekuly O₂ jest włączany do grupy karboksylowej fosfoglikolanu [51, 69, 81].

2.4. AKTYWATORY I INHIBITORY

Przed odkryciem aktywazy rubisco zaskakujące było stwierdzenie, że w warunkach, jakie istnieją w komórce ($[CO_2] \sim 10 \mu M$, $[Mg^{2+}] \sim 5 - 10 \text{ mM}$, $pH \sim 8$) karboksylaza/oksygenaza, RuBP nie powinna występować w aktywnej formie. Wszystko natomiast wskazywało, że w normalnych warunkach stopień aktywacji enzymu jest wysoki [15, 71, 91]. Poszukując czynników odpowiedzialnych za odmienne właściwości rubisco *in vivo* niż *in vitro* zbadano wpływ na ten enzym wielu metabolitów chloroplastowych. Wykazano, że związki te w stężeniach fizjologicznych mogą być słabymi stymulatorami enzymu [40]. Są dowody na to, że fosforany organiczne wiążą się w centrum katalitycznym zamiast RuBP i w taki sposób stabilizują zaktywowaną rubisco. Większość efektorów pozytywnych może być także inhibitorami kompetycyjnymi w stosunku do RuBP. Charakter działania zależy bowiem od ich stężenia, a także innych warunków. Ogólnie można stwierdzić, że dany związek ma charakter inhibitora, jeśli wiąże się z zaktywowaną formą enzymu silniej niż RuBP lub trwalej wiąże się z niezaktywowaną niż z zaktywowaną formą enzymu. W pierwszym przypadku jest inhibitorem katalizy, a w drugim inhibitorem aktywacji [40, 69].

Warto zwrócić uwagę na to, że inhibitorami rubisco mogą być nie tylko produkty katalizowanych przez ten enzym reakcji, tj. PGA i fosfoglikolan [40], lecz również i substraty, w tym także RuBP, który jest inhibitorem aktywacji enzymu [54].

Ostatnio dokonano ważnego odkrycia dotyczącego mechanizmu dobowych fluktuacji aktywności rubisco: aktywacji na świetle i inaktywacji w ciemności. Są one skorelowane z napromieniowaniem, jednakże nie można ich tłumaczyć wyłącznie zależnymi od warunków świetlnych zmianami stężeń Mg^{2+} i H^+ w stromie chloroplastów. Wykazano, że inaktywacja rubisco w ciemności jest dobrze skorelowana ze wzrostem zawartości w chloroplastach organicznego estru fosforanowego [97, 98, 112]. Ester ten udało się wyizolować z ziemniaka oraz z fasoli i zidentyfikować jako 2-karboksy-arabinitolo-1-fosforan (CAP). Odkryty endogeny inhibitor (ryc. 3) jest analogiem pierwotnego produktu karboksylacji RuBP — 2-karboksy-3-keto-arabinitolo-1,5-bisfosforanu (ryc. 1). CAP ma wiele właściwości charakterystycznych dla silnego inhibitora



Ryc. 3. Struktura naturalnego inhibitora karboksylazy/oksygenazy RuBP [41]

o łatwo odwracalnym działaniu. Wiąże się on wybiórczo z zaktywowaną formą rubisco i w ten sposób stabilizuje ją przez okres obniżonego natężenia światła i w ciemności. Na świetle szybko uwalnia się zaktywowany enzym, co zapewnia gotowość aparatu fotosyntetycznego do natychmiastowego działania. Obserwowane szybkości pojawiania się w ciemności i zaniku na świetle inhibitora potwierdzają taką hipotezę [41]. Metabolizm CAP nie jest poznany. Wydaje się, że związek ten musi być głównym produktem przemian przebiegających w początkowym okresie ciemności, gdyż dla skutecznego działania musi osiągać stężenie odpowiadające koncentracji miejsc aktywnych rubisco.

2.5. WŁAŚCIWOŚCI KINETYCZNE

Podczas fotosyntezy przebiegającej w naturalnym środowisku światło jest czynnikiem zmieniającym się w najszerszym zakresie. Na drugim miejscu można dopiero wymienić stężenie CO_2 w stromie chloroplastów. Konsekwencją zmian tych czynników jest istotna modyfikacja wewnętrznych warunków przebiegu fotosyntezy. Na świetle słabszym od wysycającego głównym czynnikiem ograniczającym fotosyntezę jest regeneracja RuBP, natomiast w warunkach światła wysycającego jest to karboksylacyjna aktywność rubisco, określona stężeniami CO_2 i O_2 w miejscu działania tego enzymu [31].

Stosunek obu aktywności karboksylazy/oksygenazy RuBP może być wyrażony jako funkcja kinetycznych parametrów enzymu oraz stężeń CO_2 i O_2 w miejscu jego funkcjonowania [31, 58, 64, 80, 84]. Zależności te wyraża wzór

$$\frac{v_c}{v_o} = \frac{V_o K_o [\text{CO}_2]}{V_o K_c [\text{O}_2]}, \quad (2)$$

gdzie v_c , v_o — szybkość karboksylacji, oksygenacji; V_c , V_o — szybkość maksymalna karboksylacji, oksygenacji; K_c , K_o — powinowactwo ru-

bisco do CO_2 , O_2 ; $[\text{CO}_2]$, $[\text{O}_2]$ — stężenie CO_2 , O_2 w miejscu działania rubisco.

Uwzględniając we wzorze tym stechiometryczną relację między ilością O_2 pobieranego przez oksygenazę a ilością CO_2 wytwarzanego w fotoodychaniu ($t = 0,5$), można przedstawić, jak następuje stosunek fotosyntezy rzeczywistej P do fotoodychania PR [84]:

$$\frac{P}{PR} = \frac{v_c}{v_o t} = \frac{V_c K_o}{V_o K_c} \frac{[\text{CO}_2]}{[\text{O}_2]} \frac{1}{t}. \quad (3)$$

Rozwiązując równanie (3) dla $P = PR$, otrzymuje się wzór wyrażający zależność między kinetycznymi parametrami rubisco a kompensacyjnym CO_2 fotosyntezy Γ [31, 84]:

$$\Gamma = \frac{V_o K_c}{V_c K_o} [\text{O}_2] t. \quad (4)$$

Wzór (4) zakłada liniową zależność między stężeniem kompensacyjnym CO_2 fotosyntezy i stężeniem tlenu, co było wielokrotnie doświadczalnie potwierdzone [84].

Wartość stosunku $V_c K_o / V_o K_c$, nazywanego współczynnikiem powinowactwa substratowego, zachowuje dużą stałość w obrębie różnych grup fotoautotrofów. Wyjątek stanowią jedynie fotosyntetyzujące bakterie, co jest prawdopodobnie związane z odmienną i zróżnicowaną budową bakteryjnej rubisco [55, 57, 84].

Rubisco z roślin należących do odmiennych grup ekofizjologicznych może istotnie różnić się powinowactwem do CO_2 [119, 120]. Enzym z roślin z cyklem Hatcha i Slacka (C_4) i z roślin wodnych wykazuje niższe powinowactwo niż enzym z roślin C_3 i roślin kwasowych (CAM). Zróżnicowanie to jest prawdopodobnie związane z występowaniem u dwu pierwszych grup roślin mechanizmu zwiększającego stężenie CO_2 w miejscu działania enzymu [114].

Powinowactwem do CO_2 różnią się też istotnie dwie odmienne pod względem budowy formy rubisco z *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Forma o budowie L_8S_8 , podobna do występującej u fotoautotrofów eukariotycznych, ma większe powinowactwo niż forma o budowie L_6 , podobna do enzymu typu L_2 , występującego u *Rhodospirillum rubrum* [115].

Nie znaleziono żadnego czynnika poza uwzględnionymi we wzorze (2), który modyfikowałby wartość stosunku v_c/v_o . Wartość tego stosunku nie zależy też od stężenia RuBP, jako trzeciego substratu rubisco [55, 57, 58]. Ostatnio doniesiono, że stosunek ten może się zmienić po zastąpieniu Mg^{2+} , aktywującego enzym, innym metalicznym kationem. Jeśli użyje się np. Mn^{2+} , to stosunek aktywności karboksylacyjnej do oksygenacyjnej maleje [88]. Kontrowersyjny jest wpływ temperatury.

Wcześniej stwierdzano silniejszy wpływ podwyższania temperatury na fotooddychanie niż na fotosyntezę, co tłumaczono odwrotną zależnością od wysokości temperatury powinowactwa rubisco do CO_2 [13, 64, 82, 84, 99]. Jednakże wraz ze wzrostem temperatury obniża się stosunek stężeń CO_2/O_2 w fazie płynnej [42, 62, 63]. Nasuwa to przypuszczenie, że przynajmniej część efektu podwyższania temperatury może bezpośrednio nie zależeć od enzymu, lecz może być spowodowana zmniejszeniem się dostępności CO_2 dla karboksylacji RuBP [84, 67].

Dużo uwagi poświęcono ostatnio udziałowi oddychania ciemniowego (mitochondrialnego) w wytwarzaniu CO_2 na świetle w fotosyntezujących tkankach. Można przyjąć, że natężenie tego procesu na świetle jest o 50 - 70% mniejsze niż w ciemności. Jednakże wiele czynników, takich jak temperatura czy zawartość asymilatów w liściu, wpływa na nie związane z fotooddychaniem wytwarzanie CO_2 na świetle w odmienny sposób niż na fotooddychanie. Oprócz czynników wpływających na dostępność CO_2 , może to powodować obserwowane często rozbieżności między rzeczywistą wymianą CO_2 w liściach na świetle a jej teoretyczną wartością obliczoną na podstawie kinetycznych parametrów rubisco [8, 9, 10, 11, 19, 75].

3. ODTWARZANIE RuBP

W zrównoważonej fotosyntezie, przebiegającej w warunkach sprzyjających znacznej przewadze reakcji karboksylacji nad reakcją oksigenacji, RuBP, jako wspólny substrat, jest odtwarzany z aktualnie asymilowanego węgla. W doświadczeniach prowadzonych z użyciem $^{14}\text{CO}_2$ pule produktów przemian RuBP zostają bardzo szybko wysyczone znacznikiem, a radioaktywność właściwa atomów węgla glikolanu oraz wytwarzanego w fotooddychaniu CO_2 osiąga poziom radioaktywności właściwej asymilowanego $^{14}\text{CO}_2$ [1, 34, 60, 61, 118]. Przy stosunku stężeń CO_2/O_2 niższym niż w powietrzu (bardziej sprzyjającym oksigenacji RuBP) radioaktywność właściwa atomów węgla glikolanu, produktu oksigenacji RuBP, utrzymuje się natomiast na obniżonym poziomie nawet po długim czasie ekspozycji liści w atmosferze $^{14}\text{CO}_2$ [60, 61, 118]. Dowodzi to, że przy stosunku v_c/v_o mniejszym od odpowiadającego atmosferycznym stężeniom CO_2 i O_2 w odtwarzaniu RuBP biorą udział asymilaty wcześniej nagromadzone w liściu. Możliwość taka była bezpośrednio wykazana również w doświadczeniach z izolowanymi chloroplastami [102]. Tak więc komórki fotosyntetyzujące są zdolne nie tylko do endogennego wytwarzania CO_2 w fotooddychaniu, lecz również do wykorzystywania w tym procesie nagromadzonych w komórkach materiałów zapasowych.

4. STYMULACJA FOTOSYNTETY PRZEZ TLLEN

Przy podwyższonym stężeniu CO_2 do 0,09 - 0,15% oksygenacja RuBP jest silnie zahamowana. W takich warunkach oraz przy dużym natężeniu światła i stosunkowo niskiej temperaturze po zmianie stężenia O_2 z 0,5 - 2,0% na 21% stwierdza się brak efektu Warburga lub nawet wzrost szybkości asymilacji CO_2 . Stymulację fotosyntezy przez tlen wykazano w doświadczeniach z całymi liśćmi oraz z izolowanymi chloroplastami. Nie ustalono jeszcze, czy jest to tylko krótkotrwały efekt przejściowy, czy może występować także w zrównoważonym procesie fotosyntezy [20, 23, 25, 32, 52, 53, 66, 68, 76, 78, 80, 100, 101, 109 - 111].

Akceptowana jest hipoteza tłumacząca stymulację fotosyntezy przez tlen zwiększonym odtwarzaniem RuBP [110]. Zakłada ona, że przy obniżonym stężeniu O_2 proces fotosyntezy wysycony energią świetlną i dwutlenkiem węgla ogranicza szybkość regeneracji NADP w reakcji redukcji PGA. Konsekwencją wysokiego poziomu NADPH jest hamowanie wytwarzania ATP w fosforylacji niecyklicznej i na tej drodze zmniejszanie odtwarzania RuBP. Przy normalnym zaś stężeniu O_2 możliwa jest synteza dodatkowych ilości ATP w fosforylacji pseudocyklicznej lub w fosforylacji cyklicznej, co zwiększa odtwarzanie RuBP i szybkość fotosyntezy. Hipoteza ta nie jest jednak udowodniona eksperymentalnie. Nie można też wykluczyć, że stymulacja fotosyntezy przez O_2 następuje na innej drodze, np. przez zwiększanie pul metabolitów pośrednich tego procesu lub wzmaganie odpływu asymilatów z chloroplastów.

5. FIZJOLOGICZNE FUNKCJE FOTOODDYCHANIA

Aparat fotosyntetyczny ukształtował się ewolucyjnie w warunkach różniących się od obecnych m.in. wyższą zawartością CO_2 w środowisku. Oksygenacja RuBP i fotooddychanie mogą być więc uważane za konsekwencje niskiego stosunku stężeń CO_2/O_2 we współczesnej atmosferze. Procesy te powodują pewne niekorzystne efekty: utratę części zasymilowanego węgla, zmniejszenie wydajności kwantowej i szybkości fotosyntezy [73]. Uzyskane eksperymentalnie mutanty pozbawione niektórych enzymów szlaku klasu glikolowego i przez to fotooddychania okazały się jednak niezdolne do vegetacji w atmosferze zawierającej 21% O_2 [104, 105]. W związku z tym coraz szerszym uznaniem cieszy się pogląd, że funkcjonowanie fotosyntetycznego szlaku oksydacyjnego jest niezbędne do normalnego rozwoju rośliny w warunkach naturalnych. Stanowi on bowiem ważny element regulacji i ochrony aparatu

fotosyntetycznego w zmiennych warunkach środowiskowych.

Metabolizm glikolanu, który może powstawać z wytworzonych wcześniej asymilatów, stanowi wewnętrzne źródło CO₂. Przy silnie ograniczonej dyfuzji CO₂ z zewnętrznej atmosfery, np. na skutek zamknięcia się aparatów szparkowych przy deficycie wodnym, umożliwia ono ograniczone funkcjonowanie fotosyntezy i wytwarzanie wszystkich produktów tego procesu [74].

Fotooddechowy oksydacyjny cykl przemian węgla może mieć znaczenie jako dodatkowy mechanizm odpływu nadmiaru pochłoniętej energii, zabezpieczający centra aktywne fotoukładów przez świetlną inaktywacją. Podczas oświetlania liści w stężeniu CO₂ kompensacyjnym reasymilacja wytwarzanego w fotooddychaniu CO₂ zużywa bowiem aż około połowy NADPH i ATP niezbędnych dla normalnej fotosyntezy [74].

Działanie O₂ w fotosyntezie jest związane z przemieszczaniem się związków węgla między chloroplastami a cytoplazmą i innymi przedziałami komórkowymi. Jedną z funkcji szlaku kwasu glikolowego może być więc odprowadzanie asymilowanego węgla z chloroplastów do miejsc syntezy sacharozy [74].

W pewnych warunkach glikolan może mieć znaczenie jako przenośnik elektronów, natomiast reakcja przekształcania glicyny w serynę w szlaku kwasu glikolowego, przebiegająca w mitochondriach, może dostarczać równoważników redukcyjnych do redukcji azotanów w liściach i stanowić element regulacji cyklu kwasów trikarboksylowych [74].

Funkcjonowanie fotooddechowego oksydacyjnego cyklu przemian węgla obniża niewątpliwie ogólną wydajność przekształcania energii świetlnej w fotosyntezie. Biorąc jednak pod uwagę to, że rośliny wykorzystują tylko bardzo małą część docierającego do nich promieniowania świetlnego [73], należy przypuszczać, że nie ma to negatywnego znaczenia dla ich przeżycia i reprodukcji.

LITERATURA

- [1] AGRAWAL P. K., FOCK H., The specific radioactivity of glycolic acid in relation to the specific activity of carbon dioxide evolved in light in photosynthesizing sunflower leaves, *Planta*, **138**: 257 - 261, 1978.
- [2] AKAZAWA T., TAKABE T., KOBAYASHI H., Molecular evolution of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO), *Trends in Biochem. Sci.*, **9**: 380 - 383, 1984.
- [3] AMIRI I., SALNIKOW J., VATER J., Amino-acid sequence of the large subunit of D-ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase from *Nicotiana tabacum*, *Biochem. Biophys. Acta*, **784**: 116 - 123, 1984.

- [4] ANDREWS T. J., ABEL K. M., Kinetics and subunit interactions of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase from cyanobacterium *Synechococcus* sp., *J. Biol. Chem.*, **256**: 8445 - 8451, 1981.
- [5] ANDREWS T. J., BALLMENT B., The function of the small subunits of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *J. Biol. Chem.*, **258**: 7514 - 7518, 1983.
- [6] — Active-site carbamate formation and reaction-intermediate-analog binding by ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase in the absence of its small subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 3660 - 3664, 1984.
- [7] ANDREWS T. J., LORIMER G. H., Catalytic properties of a hybrid between cyanobacterial large subunits and higher plant small subunits of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, *J. Biol. Chem.*, **260**: 4632 - 4636, 1985.
- [8] AZCÓN-BIETO J., Effect of oxygen on the contribution of respiration to the CO₂ compensation point in wheat and bean leaves, *Plant Physiol.*, **81**: 379 - 382, 1986.
- [9] AZCÓN-BIETO J., FARQUHAR G. D., CABALLERO A., Effects of temperature, oxygen concentration, leaf age and seasonal variations on the CO₂ compensation points of *Lolium perenne* L. Comparison with mathematical model including non-photorespiratory CO₂ production in the light, *Planta*, **152**: 497 - 504, 1981.
- [10] AZCÓN-BIETO J., LAMBERS H., DAY D. A., Effect of photosynthesis and carbohydrate status on respiratory rates and the involvement of the alternative pathway in leaf respiration, *Plant Physiol.*, **72**: 598 - 603, 1983.
- [11] AZCÓN-BIETO J., OSMOND C. B., Relationship between photosynthesis and respiration. The effect of carbohydrate status on the rate of CO₂ production by respiration in darkened and illuminated wheat leaves. *Plant Physiol.*, **71**: 574 - 581, 1983.
- [12] BADGER M. R., Kinetic properties of RuP₂ carboxylase from *Anabaena variabilis*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**: 247 - 254, 1980.
- [13] BADGER M. R., COLLATZ J., Studies on the kinetic mechanism of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase and oxygenase reaction with particular reference to the effect of temperature on kinetic parameters, *Carnegie Inst. Washington Yearb.*, **76**: 355 - 361, 1977.
- [14] BADGER M. R., LORIMER G. H., Interaction of sugar phosphates with the catalytic site of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase, *Biochemistry*, **20**: 2219 - 2225, 1981.
- [15] BAHR J. T., JENSEN R. G., Activation of ribulose biphosphate carboxylase in intact chloroplasts by CO₂ and light, *Arch. Biochem. Biophys.*, **185**: 39 - 48, 1978.
- [16] BELKNAP W. R., PORTIS A. R. Jr., Exchange properties of the activator CO₂ of spinach ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase, *Plant Physiol.*, **80**: 707 - 710, 1986.
- [17] BOWES G., OGREN W. L., HAGEMAN R. H., Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**: 716 - 722, 1971.
- [18] BOWIEN B., MAYER F., SPIESS E., PAHLER A., ENGLISH U., SAENGER W., On the structure of ribulose carboxylase from *Alcaligenes eutrophus*, *Eur. J. Biochem.*, **106**: 405 - 410, 1980.
- [19] BROOKS A., FARQUHAR G. D., Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of

- respiration in the light. Estimates from gas-exchange measurements on spinach, *Planta*, **165**: 397 - 406, 1985.
- [20] BROWN R. H., BONTON J. H., EVANS P. T., Oxygen stimulation of apparent photosynthesis in *Flaveria linearis*, *Plant Physiol.*, **81**: 212 - 215, 1986.
- [21] BROWN H. M., REJDA J. M., CHOLLET R., Inhibition of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase activities by hydroxylamine, *Biochim. Biophys. Acta*, **614**: 545 - 552, 1980.
- [22] BYTNIIEWSKA K., Karboksyłaza/oksygenaza rybulozodwufosforanu, *Post. Biochem.*, **24**: 333 - 346, 1978.
- [23] CANVIN D. T., Photorespiration and the effect of oxygen on photosynthesis, [In] *Photosynthetic carbon metabolism* (Siegelman H. W., Hind G., eds.), Plenum Press, New York 1978, 61 - 76.
- [24] CHRISTELLER J. T., LAING W. A., A kinetic study of ribulose biphosphate carboxylase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, *Biochem. J.*, **173**: 467 - 473, 1978.
- [25] CORNIC G., LOUASON G., The effects of O₂ on net photosynthesis at low temperature 5 °C, *Plant Cell Environ.*, **3**: 149 - 157, 1980.
- [26] DECKER J. P., A rapid postillumination deceleration of respiration in green leaves, *Plant Physiol.*, **30**: 82 - 84, 1955.
- [27] DRON M., RAHIRE M., ROCHAIX J. D., Sequence of the chloroplast DNA region of *Chlamydomonas reinhardtii* containing the gene of the large subunit of ribulose bisphosphate carboxylase and parts of its flanking genes, *J. Mol. Biol.*, **162**: 775 - 793, 1982.
- [28] EISENBERG D., BACKER T. S., SUH S. W., SMITH W. W., Structural studies of ribulose 1,5-bisphosphate, [In] *Photosynthetic carbon assimilation* (Siegelman H. W., Hind G., eds.), Plenum, New York 1978, 271 - 281.
- [29] ELLIS R. J., Protein synthesis by isolated chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **463**: 185 - 215, 1977.
- [30] — The most abundant protein in the world, *Trends Biochem. Sci.*, **4**: 241 - 244, 1979.
- [31] FARQUHAR G. D., von CAEMMERER S., Modeling of photosynthetic response to environmental conditions, [In] *Physiological plant ecology II* (Lange O. L., Nobel P. S., Osmond C. B., Ziegler H. eds.), pp. 549 - 537, Springer-Verlag, Berlin, New York 1982.
- [32] FEDINA J. S., VAKLINOVA S. G., Influence of oxygen on the assimilation of ¹⁴CO₂ in isolated chloroplasts, *Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, **26**: 1681 - 1684, 1973.
- [33] FEIERABEND J., WILDNER G. F., Formation of the small subunit in the absence of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in 70 S ribosome-deficient rye leaves, *Arch. Biochem. Biophys.*, **186**: 283 - 291, 1978.
- [34] FOCK H., KLUG K., KRAMPITZ M. J., Die spezifische Radioaktivität der Glykosäure und der photorespiratorischen CO₂-Entwicklung von *Helianthus* — und Bohnenblättern nach ¹⁴CO₂-Aufnahme bei verschiedenen CO₂-Konzentrationen, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **91**: 539 - 549, 1978.
- [35] FORRESTER M. L., KROTKOV G., NELSON C. D., Effect of oxygen on photosynthesis, photorespiration and respiration in detached leaves. I. Soybean, *Plant Physiol.*, **41**: 422 - 427, 1966.
- [36] FRAIJ B., HARTMAN F. C., 2-Bromoacetylaminopentitol 1,5-bisphosphate as an affinity label for ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum*, *J. Biol. Chem.* **257**: 3501 - 3505, 1982.

- [37] GIBSON J. L., TABITA F. R., Different molecular forms of D-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *J. Biol. Chem.*, **252**: 943 - 949, 1977.
- [38] — Activation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from *Rhodospseudomonas sphaeroides*: probable role of small subunit, *J. Bacteriol.*, **140**: 1023 - 1027, 1979.
- [39] GROSSMAN A., BARTLETT S., CHUA N. H., Energy-dependent uptake of cytoplasmically synthesized polypeptides by chloroplasts, *Nature (Lond.)*, **285**: 625 - 628, 1980.
- [40] GUTTERIDGE S., KEYS A. J., The significance of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in determining the effects of the environment on photosynthesis and photorespiration, [In] *Photosynthetic mechanisms and environment* (Barber J., Baker N. R., eds.), Elsevier Science Publishers, 1985, pp. 259 - 285.
- [41] GUTTERIDGE S., PARRY M. A. J., BURTON S., KEYS A. J., MUDD A., FEENEY J., SERVAITES J. C., PIERCE J., A nocturnal inhibitor of carboxylation in leaves, *Nature*, **324**: 274 - 276, 1986.
- [42] HALL N. P., KEYS A. J., Temperature dependence of the enzymic carboxylation and oxygenation of ribulose 1,5-bisphosphate in relation to effects of temperature on photosynthesis, *Plant Physiol.*, **72**: 945 - 948, 1983.
- [43] HARTMAN F. C., MILANEZ S., LEE E. H., Ionization constants of two active-site lysyl ϵ -amino groups of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase, *J. Biol. Chem.*, **260**: 13068 - 13075, 1985.
- [44] HARTMAN F. C., NORTON E. L., STRINGER C. D., SCHLOSS J. V., Attempts to apply affinity labeling techniques to ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase, [In] *Photosynthetic carbon assimilation* (Siegelman H. W., Hind G., eds.), Plenum, New York 1978, 245 - 269.
- [45] HARTMAN F. C., STRINGER C. D., LEE E. H., Complete primary structure of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **232**: 280 - 295, 1984.
- [46] HARTMAN F. C., STRINGER C. D., MILANEZ S., LEE E. H., The active site of Rubisco, *Phil. Trans. R. Lond. B.*, **313**: 379 - 395, 1986.
- [47] HEBER U., TAKAHAMA U., NEIMANIS S., SHIMIZU-TAKAHAMA M., Transport as the basis of the Kok effect. Levels of some photosynthetic intermediates and activation of light regulated enzymes during photosynthesis of chloroplasts and green leaf protoplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **679**: 289 - 299, 1982.
- [48] INAMINE G., NASH B., WEISSBACH H., BROTH N., Light regulation of synthesis of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in peas. Evidence for translational control, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 5690 - 5694, 1985.
- [49] INCHAROENSAKDI A., TAKABE T., AKAZAWA T., Role of small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the activation process, *Arch. Biochem. Biophys.*, **248**: 62 - 70, 1986.
- [50] JENSEN R. G., BAHR J. T., Ribulose 1,5-bisphosphate — carboxylase — oxygenase, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**: 379 - 400, 1977.
- [51] JOHAL S., CHOLLET R., Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: enzymic, physicochemical and nutritional properties, *What's New in Plant Physiol.*, **11**: 45 - 48, 1980.
- [52] JOLLIFFE P. A., Environmental regulation of the oxygen effect on apparent photosynthesis in wheat, *Can. J. Bot.*, **51**: 841 - 853, 1973.

- [53] JOLLIFFE P., TREGUNA E. B., Effect of temperature, CO₂ concentration and light intensity on oxygen inhibition of photosynthesis in wheat leaves, *Plant Physiol.*, **43**: 902 - 906, 1968.
- [54] JORDAN D. B., CHOLLET R., Inhibition of ribulose bisphosphate carboxylase by substrate ribulose 1,5-bisphosphate, *J. Biol. Chem.*, **258**: 13752 - 13755, 1983.
- [55] JORDAN D. B., OGREN W. L., Species variation in the specificity of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase, *Nature*, **291**: 513 - 515, 1981.
- [56] — A sensitive assay procedure for simultaneous determination of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and oxygenase activities, *Plant Physiol.*, **67**: 237 - 245, 1981.
- [57] — Species variation in kinetic properties of RuBP carboxylase/oxygenase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **227**: 425 - 433, 1983.
- [58] — The CO₂/O₂ specificity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, *Planta*, **161**: 308 - 313, 1984.
- [59] KANIUGA Z., Regulacja włączania CO₂ w procesie fotosyntezy, *Post. Biochem.*, **22**: 247 - 305, 1976.
- [60] KAMIŃSKA Z., MALESZEWSKI S., The effect of O₂ and CO₂ concentration on photosynthesis and glycolate accumulation in bean leaves treated with α -hydroxy-2-pyridinemethane-sulfonic acid (α -HPMS), the glycolate oxidase inhibitor, *Photosynthesis Research*, **1**: 45 - 51, 1980.
- [61] KAMIŃSKA Z., MALESZEWSKI S., Glycolic acid pathway in photosynthetic carbon metabolism of bean leaves at various oxygen concentration, *Z. Pflanzenphysiol.*, **108**: 201 - 206, 1982.
- [62] KU S. B., EDWARDS G. E., Oxygen inhibition of photosynthesis. I. Temperature dependence and relation to O₂/CO₂ solubility ratio, *Plant Physiol.*, **59**: 986 - 990, 1977.
- [63] — Oxygen inhibition of photosynthesis. II. Kinetic characteristics as affected by temperature, *Plant Physiol.*, **59**: 991 - 999, 1977.
- [64] LAING W. A., OGREN W. L., HAGEMAN R. H., Regulation of soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂ and ribulose-1,5-diphosphate carboxylase, *Plant Physiol.*, **54**: 678 - 685, 1974.
- [65] LANGRIDGE P., Synthesis of the large subunit of spinach ribulose bisphosphate carboxylase may involve a precursor polipeptide, *FEBS Lett.*, **123**: 85 - 89, 1981.
- [66] LEEGOOD R. C., FURBANK R. T., Stimulation of photosynthesis by 2% oxygen at low temperatures is restored by phosphate, *Planta*, **168**: 84 - 93, 1986.
- [67] LEHNHERR B., MÄCHLER F., NÖSBERGER J., Influence of temperature on the ratio of ribulose bisphosphate carboxylase to oxygenase activities and on the ratio of photosynthesis to photorespiration of leaves. *J. Exp. Bot.*, **36**: 1117 - 1125, 1985.
- [68] LLOYD W. D. H., CANVIN D. T., Photosynthesis and photorespiration in sunflower selections, *Can J. Bot.*, **55**: 3006 - 3012, 1977.
- [69] LORIMER G. H., The carboxylation and oxygenation of ribulose 1,5-bisphosphate: The primary events in photosynthesis and photorespiration, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **32**: 349 - 383, 1981.
- [70] LORIMER G. H., BADGER M. R., ANDREWS T. J., The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria kinetics, a suggested mechanism and physiological implications, *Biochemistry*, **15**: 529 - 536, 1976.

- [71] LORIMER G. H., BADGER M. R., HELDT H. W., The activation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, [In] Photosynthetic carbon assimilation (Siegelman H. W., Hind G., eds.), Plenum, New York 1983, 283 - 306.
- [72] MALESZEWSKI S., Tlen jako element regulacji fotosyntezy, Post. Biochem., **20**: 379 - 402, 1974.
- [73] MALESZEWSKI S., BYSTRZEJEWSKA G., Czynniki biofizyczne i biochemiczne warunkujące produktywność fotosyntetyczną roślin, Post. Biol. Komórki, **8**: 211 - 225, 1981.
- [74] MALESZEWSKI S., KAMIŃSKA Z., Działanie tlenu w fotosyntetycznym metabolizmie węgla, Post. Biochem., **30**: 317 - 334, 1984.
- [75] MÄCHLER F., LEHNHERR B., SCHNYDER H., NÖSBERGER J., A CO₂ concentrating system in leaves of higher C₃-plants predicted by a model based on RuBP carboxylase/oxygenase kinetics and ¹⁴CO₂/¹²CO₂ exchange, J. Exp. Bot., **36**: 1542 - 1550, 1985.
- [76] MÄCHLER F., NÖSBERGER J., The adaptation to temperature of photorespiration and of the photosynthetic carbon metabolism of altitudinal ecotypes of *Trifolium repens* L., Oecologia, **35**: 267 - 276, 1978.
- [77] — Regulation of ribulose bisphosphate carboxylase activity in intact wheat leaves by light, CO₂ and temperature, J. Exp. Bot., **31**: 1485 - 1491, 1980.
- [78] MÄCHLER F., SCHNYDER H., NÖSBERGER J., Influence of inorganic phosphate on photosynthesis of wheat chloroplasts. I. Photosynthesis and assimilate export at 5 °C and 25 °C, J. Exp. Bot., **153**: 481 - 487, 1984.
- [79] MCINTOSH L., POULSEN C., BOGARD L., Chloroplast gene sequence for the large subunit of ribulose bisphosphate carboxylase, Nature, **288**: 556 - 560, 1980.
- [80] MC VETTY P. B. E., CANVIN T. T., Inhibition of photosynthesis by low oxygen concentration, Can. J. Bot., **59**: 721 - 725, 1981.
- [81] MIZIORKO H. M., LORIMER G. H., Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, Ann. Rev. Biochem., **52**: 507 - 513, 1983.
- [82] MONSON R. K., STIDHAM M. A., WILLIAMS G. W., EDWARDS G. E., URIBE E. G., Temperature dependence of photosynthesis in *Agropyron smithii* Rydb., I. Factor affecting net CO₂ uptake in intact leaves and contribution from ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in vivo and in vitro, Plant Physiol., **69**: 921 - 928, 1982.
- [83] MOTT K. A., JENSEN R. G., O'LEARY J. W., BERRY J. A., Photosynthesis and ribulose 1,5-bisphosphate concentrations in intact leaves of *Xanthium strumarium* L., Plant Physiol., **76**: 968 - 971, 1984.
- [84] OGREN W. L., Photorespiration: Pathways, regulation, and modification, Ann. Rev. Plant Physiol., **35**, 415 - 442, 1984.
- [85] OGREN W. L., BOWES G., Ribulose diphosphate carboxylase regulates soybean photorespiration, Nature New Biol., **230**: 159 - 160, 1971.
- [86] PERCHOROWICZ J. T., JENSEN R. G., Photosynthesis and activation of ribulose bisphosphate carboxylase in wheat seedlings. Regulation by CO₂ and O₂, Plant Physiol., **71**, 955 - 960, 1983.
- [87] PERCHOROWICZ J. T., RAYNES D. A., JENSEN R. G., Light limitation of photosynthesis and activation of ribulose bisphosphate carboxylase in wheat seedlings, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**: 2985 - 2989, 1981.
- [88] PIERCE J., Determinants of substrate specificity and the role of metal in the reactions of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase, Plant Physiol., **81**: 943 - 945, 1986.

- [89] PORTIS A. R. Jr., CHON C. J., MOSBACH A., HELDT H. W., Fructose- and sedoheptulose bisphosphatase. The sites of possible control of CO₂ fixation by light-dependent changes of stromal Mg²⁺ concentration, *Biochim. Biophys. Acta*, **461**: 313 - 325, 1977.
- [90] PURCZELD P., CHON C. J., PORTIS A. R. Jr., HELD H. W., HEBER U., The mechanism of the control of carbon fixation by the pH in the chloroplast stroma. Studies with nitrate-mediated proton transfer across the envelope, *Biochim. Biophys. Acta*, **501**: 488 - 498, 1978.
- [91] ROBINSON S. P., MC NEIL P. H., WALKER D. A., Ribulose biphosphate carboxylase-lack of dark inactivation of the enzyme in experiments with protoplasts, *FEBS Lett.*, **97**: 296 - 300, 1979.
- [92] ROY H., BLOOM M., MILOS P., MONROE M., Studies on the assembly of large subunits of ribulose biphosphate carboxylase in isolated pea chloroplasts, *J. Cell. Biol.*, **94**: 20 - 27, 1982.
- [93] SALVUCCI E. M., PORTIS A. R. Jr., OGREN W. L., A soluble chloroplast protein catalyzes ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activation in vivo, *Photosynthesis Research*, **7**: 193 - 201, 1985.
- [94] SALVUCCI M. E., PORTIS A. R. Jr., OGREN W. L., Light and CO₂ response of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation in *Arabidopsis* leaves, *Plant Physiol.*, **80**: 655 - 659, 1986.
- [95] SASAKI Y., SAKIHAMA T., SHINOZAKI K., Phytochrome-mediated regulation of two mRNAs encoded by nuclei and chloroplasts of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, *Eur. J. Biochem.*, **133**: 617 - 620, 1983.
- [96] SCHNYDER H. F., MACHLER F., NOSBERGER J., Influence of temperature and CO₂ concentration on photosynthesis and light activation of ribulose-bisphosphate carboxylase oxygenase in intact leaves of white clover, *J. Exp. Bot.* **35**: 147 - 156, 1984.
- [97] SEEMAN J. R., BERRY J. A., FREAS S. M., KRUMP M. A., Regulation of ribulose biphosphate carboxylase activity in vivo by a light modulated inhibitor of catalysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 8024 - 8028, 1985.
- [98] SERVAITES J. C., Binding of a phosphorylated inhibitor to ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase during the night, *Plant Physiol.*, **78**: 839 - 843, 1985.
- [99] SERVAITES J. C., OGREN W. L., Oxygen inhibition of photosynthesis and stimulation of photorespiration in soybean leaf cells, *Plant Physiol.*, **61**, 62 - 67, 1978.
- [100] SHARKEY T. D., O₂-insensitive photosynthesis in C₃ plants. Its occurrence and possible explanation, *Plant Physiol.*, **78**: 71 - 75, 1985.
- [101] SHARKEY T. D., SEEMAN J. R., BERRY J. A., Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to changing partial pressure of O₂ and light in *Phaseolus vulgaris*, *Plant Physiol.*, **81**: 788 - 791, 1986.
- [102] SICHER R. C., JENSEN R. G., Photosynthesis and ribulose 1,5-bisphosphate levels in intact chloroplasts, *Plant Physiol.*, **64**: 880 - 883, 1979.
- [103] SOLL J., BUCHANAN B. B., Phosphorylation of chloroplast ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit by envelope-bound protein kinase in situ, *J. Biol. Chem.*, **258**: 6686 - 6689, 1983.
- [104] SOMERVILLE C. R., OREN W. L., Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glyoxylate aminotransferase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 2684 - 2687, 1980.
- [105] — Photorespiration-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* lacking mito-

- chondrial serine transhydroxymethylase activity, *Plant Physiol.*, **67**: 666 - 671, 1981.
- [106] SOMERVILLE C. R., PORTIS A. R., OGREN W. L., A mutant of *Arabidopsis thaliana* which lacks activation of RuBP carboxylase in vivo, *Plant Physiol.*, **70**: 381 - 387, 1982.
- [107] TAKABE T., AKAZAWA T., Molecular evolution of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, *Plant Cell Physiol.*, **16**: 1049 - 1060, 1975.
- [108] TOLBERT N. E., Photorespiration, [In] *The biochemistry of plants* (Stumpf P., Conn E., eds.), Academic, New York 1980, 488 - 525.
- [109] VIIL J., LAISK A., OJA V., PÄRNIK T., Stimulatory effect of oxygen on photosynthesis, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **204**: 1269 - 1271, 1972.
- [110] — Enhancement of photosynthesis caused by oxygen under saturating irradiance and high CO₂ concentration, *Photosynthetica*, **11**: 251 - 259, 1977.
- [111] VIIL J., PÄRNIK T., Influence of oxygen upon photosynthetic carbon metabolism at high CO₂ concentration and saturating irradiance, *Photosynthetica*, **8**: 208 - 215, 1974.
- [112] VU C. V., ALLEN L. H., BOWES G., Dark/light modulation of ribulose bisphosphate carboxylase activity in plants from different photosynthetic categories, *Plant Physiol.*, **76**: 843 - 845, 1984.
- [113] WARBURG O., Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäure-zersetzung in lebenden Zellen, *Biochem. Z.*, **103**: 188 - 217, 1920.
- [114] WALKER D. A., F.R.S., LEEGOOD R. C., SIVAK M. N., Ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase: its role in photosynthesis, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **313**: 305 - 324, 1986.
- [115] WEAVER K. E., TABITA F. R., Isolation and characterization of *Rhodospudomonas sphaeroides* mutants defective in regulation of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase, *J. Bacteriol.*, **156**: 507 - 515, 1983.
- [116] WEIS E., The temperature-sensitivity of dark-inactivation and light-activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in spinach chloroplasts, *FEBS Lett.*, **129**: 197 - 200, 1981.
- [117] WILDNER G. F., Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: aspects and prospects, *Physiol. Plant.*, **52**: 385 - 389, 1981.
- [118] YAMAUCHI M., YAMADA Y., Glycolate synthesis in tomato leaf discs: involvement of storage material in photorespiration, *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **30**: 135 - 147, 1985.
- [119] YEOH H. H., BADGER M. R., WATSON L., Variation in K_m(CO₂) of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase among grasses, *Plant Physiol.*, **66**: 1110 - 1112, 1980.
- [120] — Variations in kinetic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylases among plants, *Plant Physiol.*, **67**: 1151 - 1155, 1981.
- [121] ZELITCH J., Photosynthesis, photorespiration, and plant productivity, Academic, New York 1971.
- [122] ZURAWSKI G., PERROT B., BOTTOMLEY W., WHITFIELD P. R., The structure of the gene for the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA, *Nucleic Acid Res.*, **9**: 3251 - 3270, 1981.

Otrzymano: 10 października 1987.

Przyjęto: 5 stycznia 1988.

Adres autora: Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa

WIELOETAPOWY ROZWÓJ PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI
SZPIKOWEJ. I. WŁAŚCIWOŚCI NIEKTÓRYCH
PROTOONKOGENÓW UCZESTNICZĄCYCH W PATOGENEZIE
PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ

MULTISTEP EVOLUTION OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA.
I. CHARACTERISTICS OF SOME PROTO-ONCOGENES INVOLVED IN THE
PATHOGENESIS OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Zofia, Monika RUPNIEWSKA

Klinika Hematologii Instytutu Chorób Wewnętrznych AM w Lublinie

Streszczenie. Omówiono rolę badań cytogenetycznych w poznaniu biologii nowotworów oraz przedstawiono właściwości trzech protoonkogenów komórkowych „abl”, „sis” i N-„ras”, które jak się wydaje uczestniczą w patogenezie przewlekłej białaczki szpikowej.

Summary. The role of cytogenetic studies in evaluating various aspects of tumor biology was demonstrated. Characteristics of three proto-oncogenes „abl”, „sis” and N-„ras”, which seem to be involved in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia, was presented.

Wykaz stosowanych skrótów

- Ab-MuLV — szybko transformujący reowirus białaczki Abelsona myszy (skrót od ang. Abelson murine leukemia virus)
- ALL — ostra białaczka limfoblastyczna (skrót od ang. acute lymphoblastic leukemia)
- ATP — kwas adenozyno-5-trójfosforowy lub adenozynotrójfosforan
- „bcr” — mały rejon długości 5,8 kb, położony w długich ramionach chromosomu 22, w którym występują złamania

- punktowe w przewlekłej białaczce szpikowej Ph dodatniej (skrót od ang. break-point cluster region)
- białka G — białka wiążące GTP/GDP
- CML — przewlekła białaczka szpikowa (skrót od ang. chronic myelogenous leukemia)
- c-„onc” — komórkowy protoonkogen (skrót od ang. cellular oncogen)
- v-„onc” — onkogen szybkotransformujących retrowirusów (skrót od ang. viral oncogen)
- c-„abl” — komórkowy protoonkogen homologiczny z v-„abl” retrowirusa białaczki Abelsona myszy oraz z v-„abl” retrowirusa Hardy-Zuckerman kotów — szczep 2
- c-„erbB” — komórkowy protoonkogen homologiczny z v-„erbB” retrowirusa erytroblastozy ptaków
- c-„fms” — komórkowy protoonkogen homologiczny z v-„fms” retrowirusa mięsaka McDonougha kotów
- c-„fos” — komórkowy protoonkogen homologiczny z v-„fos” dwu szczepów retrowirusów mięsaka kości myszy: szczep FBJ-MSV i szczep FBR-MSV
- c-„myc” — komórkowy protoonkogen homologiczny z v-„myc” 4 szczepów retrowirusów mielocytomatozy ptaków: szczep MC 29, CM II, OK 10, MH 2
- c-Ha-„ras” — komórkowy protoonkogen homologiczny z v-Ha-„ras” retrowirusa mięsaka Harvey’a myszy oraz z v-„bas” retrowirusa mięsaka myszy BALB/c
- c-Ki-„ras” — komórkowy protoonkogen homologiczny z v-Ki-„ras” retrowirusa mięsaka Kirstena myszy
- N-„ras” — gen transformujący wykryty w DNA komórek nerwiaka zarodkowego (skrót od ang. neuroblastoma „ras”)
- c-„sis” — komórkowy protoonkogen homologiczny z v-„sis” retrowirusa mięsaka mały wlnistej oraz v-„sis” retrowirusa mięsaka kotów — szczep Parodi-Irgensa
- DNA — kwas deoksyrybonukleinowy
- EGF — czynnik wzrostu naskórka (skrót od ang. epidermal growth factor)
- fazy G cyklu komórkowego — fazy luki (przerwy) w syntezie DNA (skrót od ang. gap)
- faza S cyklu komórkowego — faza syntezy DNA
- GDP — kwas guanozyno-5-dwufosforowy lub guanozynodwufosforan
- GTP — kwas guanozyno-5-trójfosforowy lub guanozynotrójfosforan

- GTP-aza — hydrolaza GTP
- GM-CSF — czynnik wzrostu pobudzający wytwarzanie kolonii granulocytów-makrofagów (skrót od ang. granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
- IL-2 — interleukina-2 czynnik wzrostu limfocytów T, a być może także limfocytów B
- IL-3 — interleukina-3 wielopotencjalny czynnik wzrostu, regulujący wzrost i różnicowanie wielopotencjalnej komórki macierzystej i ukierunkowanych komórek potomnych
- kb — kilobazy (skrót od ang. kilobase-pair)
- kd — kilodaltony
- komórki NIH 3T3 — linia komórkowa wyprowadzona w National Institute of Health z prawidłowych fibroblastów myszy BALB/c
- linia HL-60 — linia komórkowa wyprowadzona z komórek krwi obwodowej pacjenta z ostrą białaczką promielocytową, jest uważana za linię promielocytów, którą jednak można pobudzić do różnicowania w granulocyty i makrofagi
- M-CSF — czynnik wzrostu pobudzający wytwarzanie kolonii monocytów makrofagów (skrót od ang. macrophage-colony stimulating factor)
- p — krótkie ramiona chromosomów
- p 14 c-„sis” — białko o ciężarze cząsteczkowym 14 kd, kodowane przez c-„sis”, homologiczne z łańcuchem B płytkowego czynnika wzrostu
- p 21 c-„ras” — białko o ciężarze cząsteczkowym 21 kd, kodowane przez rodzinę genów „ras”
- p 145 c-„abl” — białko o ciężarze cząsteczkowym 145 kd, kodowane przez c-„abl”
- p 160 v-„abl” — białko o ciężarze cząsteczkowym 160 kd, kodowane przez onkogen „abl” Ab-MuLV
- p 210 „bcr”-„abl” — białko o ciężarze cząsteczkowym 210 kd kodowane przez hybrydowy gen „bcr”-„abl” w CML
- PDGF — płytkowy czynnik wzrostu (skrót od ang. platelet-derived growth factor)
- PDP — płytkowa polimeraza DNA (skrót od ang. platelet DNA polymerase), wykazująca wiele podobieństw z odwrotną transkryptazą
- Ph — chromosom filadelfijski (skrót od ang. Philadelphia chromosome)
- q — długie ramiona chromosomów
- RNA — kwas rybonukleinowy

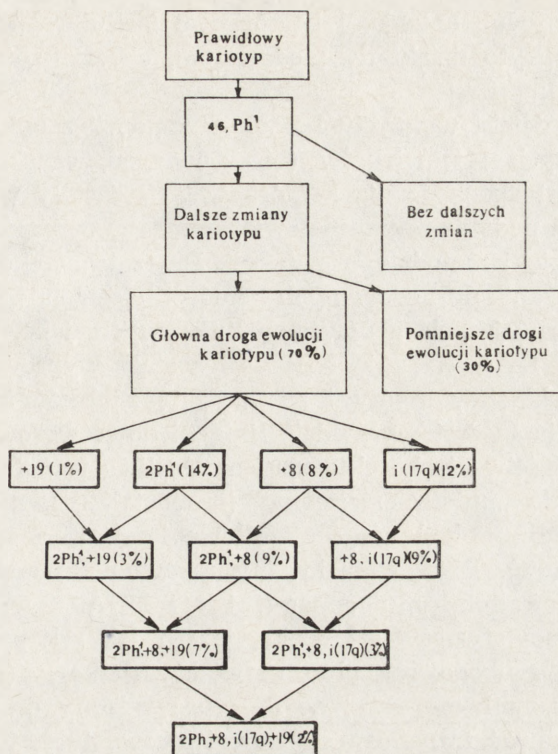
mRNA	— informacyjny RNA (skrót od ang. messenger RNA)
SSV	— szybko transformujący retrowirus mięsaka małpy wędzistej (skrót od ang. simian sarcoma virus)

WPROWADZENIE

Badania cytogenetyczne umożliwiły ustalenie kilku istotnych danych z biologii nowotworów:

1. Wykryto, że wszystkie komórki danego nowotworu mają takie same lub zbliżone zmiany kariotypowe, czego konsekwencją stało się ustalenie monoklonalności nowotworów. Większość nowotworów pochodzi zatem z pojedynczej komórki progenitorowej, noszącej specyficzną zmianę genetyczną (często rozpoznawalną jako nieprawidłowości chromosomowe). Przypuszczalnie ta nabyta zmiana genetyczna dostarcza komórce wybiórczych korzyści ułatwiających wzrost, co umożliwia jej potomstwu ekspansję klonalną.

2. Wykazano, że na ogół nieprawidłowości kariotypowe są znacznie rozleglejsze w zaawansowanych nowotworach. Takim przykładem są zmiany kariotypowe w przełomie blastycznym w przebiegu przewlekłej białaczki szpikowej (chronic myelogenous leukemia, w skrócie CML). CML jest klonalną, złośliwą proliferacją hemopoetycznej komórki macierzystej [120]. W 90 - 95% przypadków występuje delecyjny chromosom 22 nazwany chromosomem Ph (Philadelphia chromosome, w skrócie Ph) [105]. Chromosom Ph powstaje wskutek obustronnej wymiany materiału genetycznego między chromosomami 9 i 22 [118]. Wymiana zwykle dotyczy tych samych prążków 9q34.1 i 22q11.21 i jest określana jako t(9;22) (q34.1; q11.21). W przełomie blastycznym CML, który charakteryzuje utrata zdolności białaczkowych blastów do dalszego różnicowania, u ok. 75% pacjentów rozwijają się dodatkowe nieprawidłowości chromosomowe nałożone na kariotyp z pierwotną translokacją Ph [51]. Zwykle dochodzi do zwiększenia modalnej liczby chromosomów w granicach 47 - 52 z nieprzypadkowymi nieprawidłowościami, które dotyczą chromosomów: 8 (trisomia chromosomu 8), 17 (izochromosom 17), 19 (trisomia chromosomu 19) i 22 (dodatkowy chromosom Ph') [94]. Heim i Mitelman [95] taką ewolucję kariotypu komórek białaczkowych, w której stwierdza się jedną lub więcej z takich nieprawidłowości nazywają główną drogą ewolucyjną (ryc. 1). Z innych nieprawidłowości kariotypowych, występujących dosyć często w przełomie blastycznym, należy wymienić trisomię chromosomu 17 i ubytek chromosomu 7 [129]. Te i inne obserwacje pozwoliły na rozwinięcie hipotezy, że w miarę upływu czasu nowotwory stają się coraz bardziej złośliwe, ponieważ



Ryc. 1. Model ewolucji karyotypu w przewlekłej białaczce szpikowej Ph¹ dodatniej (wg [64])

wyselekcjonowują się subpopulacje komórek o dodatkowych zmianach w strukturze genetycznej [77, 104]. Komórki nowotworowe cechuje w porównaniu z komórkami prawidłowymi zwiększona niestabilność genetyczna, z czym wiąże się łatwość powstawania wariantów genetycznych. Większość tych wariantów ginie, ale kilka z nich o szczególnych właściwościach wybiórczego wzrostu rozwija się i staje dominującą subpopulacją komórek nowotworowych. Tę nową subpopulację wyróżnia agresywny wzrost, co wiąże się z progresją choroby nowotworowej. Ciągłe powstawanie nowych subpopulacji komórek nowotworowych jest przyczyną tak typowej dla nowotworów heterogenności komórkowej.

3. Dzięki badaniom molekularnym wykryto, że nieprzypadkowe nieprawidłowości chromosomowe wiążą się z miejscami, w których leżą szczególne geny, tzw. protoonkogeny odgrywające istotną rolę w onkogenezie.

Protoonkogeny lub onkogeny komórkowe (cellular oncogen, w skrócie c-„onc”) wykryto dzięki dwu odrębnym, chociaż zbieżnym kierunkom badawczym:

Po pierwsze dzięki wykryciu homologii c-„onc” z onkogenami szybko transformujących retrowirusów (viral oncogen, w skrócie v-„onc”). v-„onc” są zresztą pochodzenia komórkowego i zostały włączone w genom retrowirusa podczas zakażenia zwierzęcia.

Po drugie dzięki metodzie transfekcji. Przez transfekcję rozumie się proces wprowadzania do hodowanych komórek egzogenego DNA. W badaniach transformujących genów nowotworowych jako biorcy zwykle służą komórki NIH 3T3. Linia NIH 3T3 została wyprowadzona z prawidłowych fibroblastów myszy i ma wysoką zdolność integracji DNA dawcy [29]. Linia ta jest wprawdzie linią nienowotworową, ale cechuje ją szczególna właściwość charakteryzująca złośliwą transformację, a mianowicie jest linią „nieśmiertelnioną” (immortalized), mającą zdolność ciągłej proliferacji w hodowli (prawidłowe komórki mają ograniczoną zdolność podziałów). DNA wyizolowany zarówno z komórek stransformowanych chemicznymi mutagenami, jak i DNA z wielu naturalnie występujących nowotworów człowieka, takich jak rak pęcherza moczowego, rak jelita grubego, rak płuc, nerwiak zarodkowy (neuroblastoma) i różne nowotwory hemopoetyczne — wprowadzony do komórek NIH 3T3 może indukować transformację nowotworową [81, 91, 96, 108, 124], za którą są odpowiedzialne sekwencje DNA zawierające c-„onc”.

Co to są protoonkogeny? W prawidłowych komórkach w różnych okresach wzrostu i różnicowania występuje ekspresja różnych c-„onc”. Jak się wydaje, c-„onc” powstały u wczesnych ewolucyjnie tkankowców, a nawet w organizmach niższych niż tkankowce, jako wewnątrzkomórkowe regulatory wzrostu komórki [106]. W złożonych zaś organizmach kręgowców te wewnątrzkomórkowe czynniki wzrostu, zapewniające autonomię poszczególnym komórkom, były szkodliwe, zaburzały bowiem harmonijną współpracę między różnymi komórkami i tkankami. U wyższych kręgowców te wewnątrzkomórkowe czynniki wzrostu zostały więc wyparte przez liczne pozakomórkowe czynniki wzrostu o charakterze endokrynnym i parakrynowym. Nadal jednak zachowały się ściśle powiązania między c-„onc” a pozakomórkowymi czynnikami wzrostu. Powiązania te są:

albo bezpośrednio, ponieważ niektóre c-„onc” kodują czynniki wzrostu,

albo pośrednio, ponieważ inne c-„onc” kodują receptory dla czynników wzrostu, lub uczestniczą w innych mechanizmach regulujących wzrost prawidłowych komórek.

Protoonkogeny mogą odgrywać kluczową rolę w transformacji no-

wotworowej dzięki punktowym mutacjom [142], przegrupowaniom (rearrangements) [31] lub zwielokrotnieniu genu (gene amplification) [20, 27]. Wszystkie te nieprawidłowości protoonkogenów będą powodowały bądź zmianę jakościową kodowanych przez nie produktów, bądź zmianę ekspresji (ilościową) tych produktów.

Wiemy, że rozwój naturalnych nowotworów jest procesem wieloetapowym, podczas którego występuje kooperacja wielu genów. Jednym z pierwszych przykładów wskazujących na taką kooperację w warunkach „in vitro” były doświadczenia Landa i wsp. [83]. Autorzy ci do hodowli zarodkowych fibroblastów szczura wprowadzali kombinację dwu protoonkogenów „myc” i „ras”. Pierwszy z nich jest genem „unieśmiertelniającym” fibroblasty, które zaczynają bezustannie replikować DNA i dzielić się. „myc” nie wpływa jednak na fenotyp fibroblastów i dla pełnej transformacji konieczna jest aktywacja co najmniej jeszcze jednego onkogenu „ras”. Wykazano także, że w niektórych liniach komórki nowotworowej człowieka, jak np. linia HL-60 wyprowadzona z komórek krwi obwodowej pacjenta z ostrą białaczką promielocytową, występuje kooperacja „myc” i N-„ras” [27]. Istnienie aktywnego N-„ras” oprócz amplifikacji „myc” stwierdzono ponadto w pierwotnych komórkach białaczkowych pacjenta, od którego wyprowadzono linię HL-60 [34]. Nie jest jednak wykluczone, że do powstania komórki nowotworowej konieczne jest jeszcze dodatkowe działanie odmienne od aktywności onkogenów „myc” i „ras”. Najbardziej zachęcające wydaje się istnienie wielu genów włączonych w proces onkogenezy, przy czym uaktywnienie każdego z nich odpowiadałoby kolejnemu etapowi onkogenezy [84].

W patogenezie CML krytyczne znaczenie ma translokacja protoonkogenu c-„abl”. Sugeruje się również, że w procesie tym odgrywają także rolę inne protoonkogeny, takie jak c-„sis” i N-„ras”. Geny te zostaną szczegółowo omówione.

c-„abl”

Lokalizacja c-„abl” w chromosomie — 9q34 [56, 63]. c-„abl” występuje nie tylko w komórkach kręgowców [57], ale jest pieczołowicie przechowywany w procesie ewolucji, tak że wykryto go w gatunku ewolucyjnie tak odległym od kręgowców jak muszka owocowa (*Drosophila melanogaster*) [66].

Produkt kodowany przez c-„abl” — białko o ciężarze cząsteczkowym 145 kd (p 145) [78]. Białko kodowane przez c-„abl” wykazuje aktywność kinazy tyrozynowej [80], która katalizuje przenoszenie jonu fosforano-

wego z komórkowego nośnika energii, jakim jest adenozynotrójfosforan (ATP), na rodniki tyrozyny niektórych białek. Członkowie rodziny kinaz tyrozynowych decydują o fenotypie komórkowym. Niektórzy z nich odgrywają rolę w czynności receptorów dla czynników wzrostu, inni działają we wnętrzu komórki [15]. Tak np. komórkowy protoonkogen *c-„erbB”* koduje obszar kinazy tyrozynowej w wewnątrzkomórkowej części receptora czynnika wzrostu naskórka (epidermal growth factor, w skrócie EGF) [42], a *c-„fms”* koduje analogiczny obszar w receptorze dla czynnika wzrostu pobudzającego wytwarzanie kolonii monocytów-makrofagów (macrophage-colony stimulating factor, w skrócie M-CSF, albo colony stimulating factor-1, w skrócie CSF-1) [116, 123]. Po związaniu odpowiedniego czynnika wzrostu z zewnątrzkomórkową częścią receptora zostaje uaktywniony wewnątrzkomórkowy obszar fosfokinazy tyrozynowej i następuje fosforylacja rodników tyrozyny w docelowym białku, z czym wiąże się jego modyfikacja. Jak się przypuszcza, proces fosforylacji tyrozyny wyzwala kaskadę zmian biochemicznych, stanowiącą część mechanizmu za pomocą którego mitogeny sygnał nadawany przez czynnik wzrostu zostaje przekazany do jądra komórkowego i zapoczątkowuje podział komórki. Ta nowo poznana odwracalna fosforylacja białek wydaje się stanowić główny mechanizm kontrolujący przekazywanie bodźców hormonalnych, a także bodźców indukowanych przez czynniki wzrostu i neurotransmitery. Sygnał wywołany ujawnieniem się aktywności kinazy tyrozynowej we wnętrzu komórki jest, po przetworzeniu, przekazywany dalej przez kinazę białkową C [89, 133], pod której wpływem ulegają fosforylacji rodniki seryny i treoniny. Kinaza białkowa C wydaje się uczestniczyć głównie w przekazywaniu sygnałów indukowanych przez płytkowy czynnik wzrostu (platelet derived growth factor, w skrócie PDGF) [61] oraz interleukiny-2 i 3 (IL-2 i IL-3) [47-49]. W większości przypadków nie znamy jednak docelowego białka, na które działa kinaza tyrozynowa. Może to być zarówno białko błony komórkowej, jak i wewnątrzkomórkowy enzym, czy białko szkieletowe komórki lub białko związane z jądrem komórki. Tak więc w następstwie intensywnej fosforylacji rodników tyrozyny docelowego białka zmieniają się zdolności proliferacyjne komórki. Aktywność kinazy tyrozynowej charakteryzuje także wiele białek kodowanych przez *v-„onc”* transformujących retrowirusów [14, 68].

Lokalizacja produktu *c-„abl”* w komórce — białko błony komórkowej [68].

Homologia produktu *c-„abl”* z białkiem kodowanym przez onkogeny transformujących retrowirusów:

v-„abl” wirusa białaczki Abelsona myszy (Abelson murine leukemia virus, w skrócie Ab-MuLV) [140];

v-,abl" wirusa mięsaka Hardy-Zuckerman kotów — szczep 2 (Hardy-Zuckerman 2 feline sarcoma virus, w skrócie HZ-2-FeSV) [9].

Dosyć często dwa odmienne retrowirusy onkogenne dla różnych gatunków zwierząt (w tym wypadku dla myszy i kotów) mają ten sam v-,onc".

Niedawno odkryty szczep 4 retrowirusa HZ-2-FeSV — HZ-4-FeSV zawiera onkogen v-,kit" [10], który koduje białko p 80 przypominające strukturalnie receptor dla PDGF [149].

Ab-MuLV został wyizolowany z myszy BALB/c, które były zakażone wirusem białaczki Moloney'a myszy (Moloney murine leukemia virus, w skrócie Mo-MuLV) i u których stosowano sterydy. Ab-MuLV jest rekombinantem wykazującym na obu końcach genomu dość ścisłą homologię sekwencji z rodzicielskim Mo-MuLV, ale we wnętrzu jego genomu znajduje się dodatkowa sekwencja pochodząca z komórkowego proto-onkogeny c-,abl" [1, 57]. Sekwencja z końca aminowego (N-terminus), transformującego białka Ab-MuLV, jest kodowana przez wirusowy gen „gag” (gen kodujący białka wnętrza wirionu), zaś sekwencje części środkowej i końca karboksylowego (C-terminus) koduje „abl” [143]. Transformujące białko wykazuje wysokiego stopnia aktywność kinazy tyrozynowej, zwłaszcza w porównaniu z aktywnością białka kodowanego przez komórkowy c-,abl". Ta wysoka aktywność kinazy tyrozynowej prawdopodobnie zależy od modyfikacji końca aminowego białka Ab-MuLV. Białko kodowane przez v-,abl" ma zdolność transformacji szerokiego spektrum komórek hemopoetycznych myszy, takich jak: limfocyty B, komórki plazmocytozowe, makrofagi i promielocyty, a także komórki NIH 3T3 [79].

Prawdopodobna rola produktu kodowanego przez c-,abl": Jak już powiedziano, v-,abl" Ab-MuLV transformuje komórki w hodowli, m. in. komórki tuczne, pochodzące z płodowej wątroby, lub komórki linii szpikowej myszy — FDC-P1 [28, 109], niezależniając je, poprzez mechanizm pozaautokrynowy, od zewnątrzpochodnych czynników wzrostu, takich jak IL-3, lub czynnik wzrostu pobudzający wytwarzanie kolonii granulocytów-makrofagów (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, w skrócie GM-CSF). W związku z pozaautokrynowym mechanizmem działania transformującego białka kodowanego przez v-,abl" rozważane są dwie możliwości: produkt v-,abl" modyfikuje aktywność receptora dla IL-3 lub receptora dla GM-CSF albo działa jako surogat tych receptorów poprzez aktywność kinazy tyrozynowej lub poprzez wpływ na któryś z późniejszych etapów łańcucha regulującego wzrost komórki prawidłowo aktywowanej przez IL-3 lub GM-CSF [110].

Jest więc prawdopodobne, że komórkowy c-,abl" koduje receptor dla IL-3 lub dla GM-CSF.

Shtivelman i wsp. [127] sugerują równocześnie, że białko kodowane przez c-„abl” nie pełni funkcji receptora dla pozakomórkowych czynników wzrostu, zwłaszcza że jego aktywność kinazy tyrozynowej różni się od aktywności kinaz tyrozynowych, które występują w cytoplazmatycznej części receptora dla EGF lub receptora dla M-CSF. Autorzy przypuszczają, że substrat docelowy dla białka kodowanego przez c-„abl” występuje zarówno w cytoplazmie, jak i w błonie komórkowej.

IL-3 myszy lub wielopotencjalny czynnik wzrostu (multi-colony stimulating factor, w skrócie multi-CSF) może pobudzać:

albo powstawanie szerokiego spektrum różnych typów kolonii (erytrocytów, megakariocytów, neutrofilii, eozynofili, makrofagów, komórek tucznych);

albo powstawanie kolonii zawierających różne typy komórek.

IL-3 myszy kontroluje zatem wzrost i różnicowanie zarówno wielopotencjalnej komórki macierzystej, jak i komórek potomnych, już ukierunkowanych w poszczególne linie różnicowania [43, 62, 70]. Wydaje się, że IL-3 stymuluje nawet wzrost komórki macierzystej [58, 113] tak młodej jak komórka tworząca kolonie śledzionowe (colony forming units-spleen, w skrócie CFU-S), odkrytej przez Tilla i wsp. [136], która jest zdolna do repopulacji zarówno komórek linii szpikowej, jak i limfoidalnej u subletalnie napromienionych myszy [2, 39, 74, 86].

Do niedawna nie można było wykazać istnienia ludzkiego genu, będącego odpowiednikiem genu dla IL-3 myszy lub analogicznego białka. W związku z odkryciem, że ludzki GM-CSF ma wielopotencjalną aktywność pobudzającą wytwarzanie różnych kolonii [40, 45, 128], wysunięto przypuszczenie, że ludzki gen dla IL-3 został utracony podczas ewolucji [26, 45, 76], a jego czynności są zsumowane w GM-CSF.

Ostatnio jednak z ludzkiej linii komórkowej 5637, wyprowadzonej z raka pęcherza moczowego, wyizolowano i scharakteryzowano wielopotencjalny CSF [93, 98, 100, 111, 130, 144], a Yang i wsp. [148] zidentyfikowali ludzki gen dla IL-3 wykazujący homologię sekwencji z IL-3 myszy. Istnieje także ok. 20% homologii sekwencji między IL-3 a GM-CSF (cyt. wg [138]). Ludzki gen dla IL-3 leży w chromosomie 5 (cyt. wg [138]). Ponadto w długich ramionach chromosomu 5 w stosunkowo niewielkiej odległości od siebie leżą:

gen „gm-csf” 5q23 → q32, który koduje GM-CSF;

protoonkogen homologiczny z genem v-„kit” — HZ-4-FeSV 5q31 → q32, który koduje receptor dla PDGF;

protoonkogen c-„fms” 5q33, który koduje receptor dla M-CSF. Geny te leżą w miejscach punktowych złamań, jakie występują w delecjach długich ramion chromosomu 5 [119], spotykanych w tzw. wtórnych

ostrzych białaczkach nieлимfatycznych, wywołanych mutagenami, oraz w niektórych klonalnych hemopatiach zaliczanych do grupy zespołów mielodysplastycznych.

c-„sis”

Lokalizacja c-„sis” w chromosomie — 22q13 [33, 134].

Produkt kodowany przez c-„sis” — białko o ciężarze cząsteczkowym 14 kd (p 14), wykazujące, podobnie jak produkt c-„abl”, aktywność kinazy tyrozynowej [30] i odpowiadające łańcuchowi B PDGF [37, 145]. (Ludzki PDGF jest heterodimerem złożonym z dwu łańcuchów A i B [73].)

Lokalizacja produktu c-„sis” w komórce — białko sekrecyjne [68], jakkolwiek sekrecja PDGF przez komórkę koreluje z ekspresją łańcucha A [12].

Homologia produktu c-„sis” z białkiem kodowanym przez onkogeny transformujących retrowirusów:

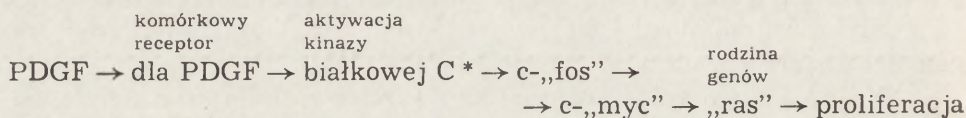
v-„sis” wirusa mięsaka mały wełnistej (simian sarcoma virus, w skrócie SSV) [41, 141];

v-„sis” wirusa mięsaka kotów — szczep Parodi-Irgensa (Parodi-Irgens feline sarcoma virus, w skrócie PI-FeSV) [11].

SSV był pierwszym transformującym retrowirusem uzyskanym od zwierząt naczelnych. Małpa wełnista, z której tkanek wyizolowano SSV, chorowała na rozsiane włókniakomięsaki (fibrosarcoma) w skórze i w krezce. Stwierdzono ok. 96% homologii między łańcuchem B PDGF człowieka a transformującym białkiem — p 28 „sis” SSV, co pozwala przypuszczać, że onkogenne działanie SSV zachodzi poprzez molekuly PDGF-podobne [41, 141]. SSV wstrzyknięty domięśniowo szerokonosym małpom amerykańskim wywołuje u nich podobny nowotwór, jeśli natomiast zostanie wstrzyknięty dokanałowo, to powoduje rozwój gwiaździstaka (astrocytoma). Oba te nowotwory wychodzą z komórek tkanki łącznej, które w hodowli ujawniają ekspresję receptorów dla PDGF. Fibroblasty transformowane przez SSV nie tylko syntetyzują, ale również wydzielają molekuly PDGF-podobne, które działają jako autokrynowe stymulatory wzrostu [67]. Wydaje się jednak, że większość produktu kodowanego przez SSV nie jest wydzielana do środowiska zewnętrznego, ale pozostaje związana z błoną komórkową [85], stymulując endogennie specyficzne receptory. Równocześnie prawidłowy, egzogenny PDGF może indukować w hodowli pewne cechy wzrostu komórek, przypominające proliferację komórek transformowanych przez SSV, a ponadto indukuje

wiele, a być może nawet wszystkie cechy fenotypowe komórek stransformowanych [5, 6, 17, 71]. W ustalonych liniach komórkowych PDGF może wywoływać ostateczną transformację morfologiczną [122].

Działanie PDGF na poziomie molekularnym — PDGF zwiększa transkrypcję dwu genów komórkowych: c-„fos” [25, 60] i c-„myc” [75]. c-„fos” koduje białko związane ze zrębem jądra komórkowego [32], a zwłaszcza z miejscem w chromatynie jądrowej szczególnie wrażliwym na działanie dezoksyrybonukleazy I, co sugeruje regulacyjną rolę tego genu w ekspresji innych genów [114, 121]. c-„myc” koduje białko zlokalizowane w okolicy przyjądrowej, odgrywające rolę w przemianie RNA [115]. Stiles [131] oba geny zalicza do „genów kompetencji wzrostu” (growth competence genes), warunkujących wystąpienie i przebieg cyklu komórkowego. Ponadto wykazano, że transkrypcja c-„myc” wiąże się z niezależeniem komórki od regulacyjnego wpływu osoczowych czynników wzrostu, a więc i PDGF [21, 75]. Nie wiemy jednak, czy ekspresja c-„fos” przyczynia się do podobnej utraty wrażliwości komórki na PDGF, zwłaszcza że aktywacja c-„fos” wyprzedza aktywację c-„myc” [97]. Na zmodyfikowanym schemacie z pracy Adamson [4] przedstawiono aktywację genów komórkowych pod wpływem PDGF, prowadzącą do syntezy DNA i proliferacji:



Stiles (cyt. wg [46, 99]) wykazał ponadto, że PDGF w komórkach NIH 3T3 zwiększa transkrypcję nie tylko c-„fos” i c-„myc”, ale także genów kodujących interferon beta (gen pokrewny c-„fos”) i syntetazę 2'5'-oligoadenylową. Transkrypcja tych dwu ostatnich genów występuje w późniejszym okresie niż c-„fos” i c-„myc”. Zwiększenie przez PDGF transkrypcji genów kodujących interferon beta jest niezwykle interesujące w świetle niedawnych doniesień [87], które mówią o przeciwnym działaniu na cykl komórkowy interferonów alfa i beta, a PDGF. Mianowicie interferony hamują przejście komórek z fazy G₀ cyklu komórkowego w fazę G₁ i S, podczas gdy PDGF działa mitogenicznie.

Wpływ PDGF na komórki:

PDGF działa jako czynnik mitogeniczny na komórki tkanki łącznej mające specyficzne receptory. Do komórek tych należą: fibroblasty skó-

* Kinaza białkowa C poprzez fosforylację rodników seryny i treoniny białek komórkowych uczestniczy w transdukcji sygnałów wywołanych związaniem PDGF ze swoistym receptorem [61]. Jak się wydaje, kinaza ta transdukuje jeszcze wcześniejszy sygnał wywołany wystąpieniem aktywności kinazy tyrozynowej po związaniu PDGF przez receptor [89, 133].

ry i ścięgien, mięśnie gładkie ściany naczyńniowej, komórki gleju i chondrocyty [18].

W hodowli fibroblastów i komórek mięśni gładkich PDGF stymuluje wytwarzanie i uwalnianie substancji podobnych do somatomedyny C [23, 24]. Równocześnie somatomedyna C może nasilać odpowiedź mitogenną komórek na PDGF.

W hodowli linii komórki T ze zmniejszoną zawartością surowicy w środowisku hodowlanym PDGF przywraca komórkom T zdolność do odpowiedzi proliferacyjnej na specyficzny antygen [3].

Istnieją dane, że wytwarzanie molekuł PDGF-podobnych wywiera działanie pośrednie na klonalny wzrost linii erytroleukemicznych, takich jak OCIM 2 i HEL [117]. Obie te linie wytwarzają molekuły PDGF-podobne, działające mitogennie na fibroblasty, które z kolei prawdopodobnie wydzielają mediatory erytropoezy [35].

Wytwarzanie PDGF lub molekuł PDGF-podobnych przez linie komórkowe wyprowadzone z ludzkich nowotworów:

Po pierwsze, molekuły PDGF-podobne są wytwarzane przez wiele linii komórkowych wyprowadzonych z naturalnie występujących nowotworów, których komórki reagują na PDGF. Do linii tych należą:

— linia U-343 MGa glejaka człowieka [72],

— linia U-2 OS mięska kości człowieka [59]; komórki tej linii wykazują ekspresję zarówno informacyjnego RNA (messenger RNA, w skrócie mRNA), c-„sis” (translacja łańcucha B PDGF) [13, 59], jak i mRNA łańcucha A [12].

Po drugie, w moczu chorych z różnymi nowotworami występuje podwyższony poziom białek antygenowo podobnych do PDGF [102].

Po trzecie, ekspresja c-„sis” i/lub wytwarzanie PDGF występują nie tylko w komórkach nowotworowych, odpowiadających na ten czynnik wzrostu, ale także w komórkach nowotworowych, które nie odpowiadają na PDGF, takich jak:

— linia Neuro-2 A nerwiaka zarodkowego myszy [139],

— linia T-24 wyprowadzona z raka pęcherza moczowego człowieka,

— linia Hep G-2 wyprowadzona z dobrze zróżnicowanego raka wątroby (hepatoma) [19, 101],

— linia komórkowa HUT-102 wyprowadzona ze skórno-chłoniaka T-komórkowego człowieka [146],

— linie wyprowadzone z komórek erytroleukemii, jak OCIM 2, K 562, HEL, OCIM 1 [117].

Włóknienie szpiku jest stanem, w którym prawidłowa struktura tkanki szpikowej zostaje zastąpiona przez fibroblasty, a następnie przez wytwarzany przez nie kolagen. Włóknienie szpiku obserwowano w różnych chorobach mieloproliferacyjnych, takich jak: przewlekła białaczka szpi-

kowa, w nowotworach nie pochodzących z komórek hemopoetycznych, a także w przewlekłych stanach zapalnych szpiku, jak np. w gruźlicy oraz w następstwie działania czynników toksycznych [54]. Za możliwą rolę PDGF we włóknieniu szpiku przemawia zwiększenie ilości oraz aktywacja megakariocytów i komórek zrębu szpikowego, jak makrofagi, a także komórki endotelialne, z prawdopodobnym uwalnianiem PDGF we wszystkich stanach przebiegających z odczynowym włóknieniem szpiku [54, 117]. Nieefektywna megakariopoeza połączona z proliferacją i rozpadem megakariocytów w szpiku może również prowadzić do nadmiernego uwalniania PDGF [117].

N-„ras”

N-„ras” jest jednym z trzech genów rodziny „ras”, do której poza nim należą: c-Ha-„ras” homologiczny z v-Ha-„ras” wirusa mięsaka Harvey’a myszy (Harvey murine sarcoma virus, w skrócie Ha-MSV) i c-Ki-„ras”, homologiczny z v-Ki-„ras” wirusa mięsaka Kirstena myszy (Kirsten murine sarcoma virus, w skrócie Ki-MSV) [22]. N-„ras” (neuroblastoma „ras”) został odkryty jako biologicznie aktywny, transformujący gen w linii komórkowej wyprowadzonej z nerwiaka zarodkowego człowieka [126], natomiast nigdy nie znaleziono go w retrowirusach.

Rozmiary tych trzech genów są bardzo różne i tak najmniejszy c-Ha-„ras” ma mniej niż 6 kilozasad (kilobase-pair, w skrócie kb) długości, największy c-Ki-„ras” ponad 40 kb, N-„ras” zaś ok. 10 kb [88]. Geny te leżą w różnych chromosomach.

Lokalizacja N-„ras” w chromosomie — 1 p 12 [36, 150].

Geny z rodziny „ras” cechuje duża konserwatywność ewolucyjna, wykryto je u niższych eukariontów, takich jak drożdże piwne (*Saccharomyces cervisiae*) [38, 107, 112] i *Drosophila* [96].

Produkt kodowany przez rodzinę genów „ras” — białka o ciężarze cząsteczkowym 21 kd (p 21) [44]. p 21 „ras” uczestniczą w wewnątrzkomórkowym (pozareceptorowym) układzie informacyjnym (intracellular messenger system). p 21 „ras” są zlokalizowane w obrębie błony komórkowej i wykazują dwojakiego rodzaju aktywność:

silnie wiążą guanozynotrójfosforan (GTP) [125],

mają aktywność hydrolazy GTP (GTP-azy) rozkładającej GTP do nieaktywnej formy guanozynodwufosforanu (GDP) i nieorganicznego fosforanu [53, 125, 135].

Ta druga aktywność neutralizuje pierwszą, dzięki czemu wewnątrzkomórkowy sygnał nie działa w sposób ciągły.

Istnieją analogie między białkami kodowanymi zarówno przez ko-

mórkowe, jak i wirusowe geny „ras” a rodziną białek G (białka wiążące GTP/GDP, skąd pochodzi ich nazwa). Białka G stanowią pośrednie ogniwo łączące receptory rozpoznające różne sygnały pozakomórkowe, jak np. sygnały hormonalne, sygnały wysyłane przez czynniki wzrostu i neurotransmitery z cyklazą adenylową [55, 69], a także z innymi enzymami efektorowymi. Każde z białek G wiąże i hydrolizuje GTP w odpowiedzi na stymulację przez specyficzny sygnał, przy czym w każdym wypadku zwiążanie GTP ma zasadnicze znaczenie dla transdukcji sygnału do enzymu efektorowego.

Rozróżnia się trzy typy czynnościowe białek G:

białka G_s przekazujące sygnały hormonalne i wysyłane przez neurotransmitery, które stymulują cyklazę adenylową [55];

białka G_i przekazujące sygnały hamujące aktywność cyklazy adenylowej [55], a także w niektórych komórkach hamujące metabolizm fosforanu inozytolu i mobilizację wewnątrzkomórkowego wapnia [8];

transduktyna — białko siatkówki, które przekazuje sygnały wysyłane przez pobudzoną światłem rodopsynę, a stymulujące równocześnie fosfodwuesterazę cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) [132].

Białka G_s są heterotrimerami złożonymi z trzech podjednostek: alfa, beta i gamma [55]. Podjednostki beta i gamma wykazują wiele znamienych podobieństw strukturalnych, a ponadto są ze sobą połączone, stąd ich wspólna nazwa podjednostki beta-gamma. Podjednostka alfa, odmienna strukturalnie, warunkuje specyficzność czynnościową białek G [16]. Gdy podjednostka alfa otrzyma specyficzny sygnał i zwiąże GTP, następuje harmonijna dysocjacja podjednostek beta i gamma. Z kolei uwolniona podjednostka alfa aktywuje cyklazę adenylową i sama ulega inaktywacji przez hydrolizę wiązania GTP.

Chociaż białka kodowane przez rodzinę genów „ras” są o około połowę mniejsze od największej z białek G podjednostki alfa (odpowiednio 21 i 45 kd), to jednak istnieją między nimi podobieństwa [14]:

1. Zarówno białka G, jak i p 21 „ras” są zlokalizowane na wewnętrznej cytoplazmatycznej powierzchni błony komórkowej. Jak się wydaje, to położenie ma zasadnicze znaczenie dla ich czynności, np. mutacja, która uniemożliwia przyleganie produktu v-„ras” do błony komórkowej, niweczy także jego właściwości transformujące [147].

2. Zarówno białka G, jak i p 21 „ras” wiążą i hydrolizują GTP. Zwiążanie GTP przez te białka powoduje, że wchodzą one w „stan aktywności” (active state), ale równocześnie ujawnia się wewnętrzna aktywność GTP-azy, która powoduje ich przejście w „stan nieaktywny” (relaxed state). Hydroliza GTP ogranicza więc czas trwania aktywności tych białek i przesyłanie wewnątrzkomórkowych sygnałów, a zatem stanowi mechanizm samohamujący.

3. Między białkami G a p 21 „ras” występują homologie sekwencji aminokwasów, w pewnych wprawdzie ograniczonych, ale istotnych odciśnięciach, które m.in. dotyczą obszaru wiążącego GTP. Homologia sekwencji aminokwasów sugeruje zresztą wspólne pochodzenie ewolucyjne tych białek.

Nie dysponujemy jednak dowodami, aby białka „ras” miały zdolność regulacji cyklicznej adenylowej, przynajmniej w komórkach kręgowców, chociaż białka kodowane przez geny „RAS-1” i „RAS-2” drożdży regulują jej czynność [137].

W jaki zatem sposób p 21 „ras” działają regulująco na czynność komórki? Dotychczas jeszcze nie zidentyfikowano przypuszczalnych molekuł detektorowych (wychwytyjących i przekazujących sygnał na p 21 „ras”), jak i molekuł efektorowych (warunkujących odpowiedź) dla p 21 „ras”. Przez analogię do białek G wydaje się, że rodzina białek p 21 „ras” jest zdolna do rozdzielczej transdukcji więcej niż jednego rodzaju sygnałów pochodzących z różnych receptorów powierzchni komórkowej i wywołujących odmienne skutki regulacyjne. Przemawiają za tym różnice w pierwotnej strukturze trzech protoonkogenów „ras”, ich odmienna lokalizacja w chromosomach człowieka oraz fakt, że są one tak skrupulatnie przechowywane w procesie ewolucji. Być może p 21 c-Ha-„ras” reguluje czynność innego enzymu efektorowego niż p 21 c-Ki-„ras”, a p 21 N-„ras” działa na jeszcze inny enzym. Pogląd oparty na zdolności wywoływania transformacji nowotworowej przez wirusowe białka „ras” i w związku z tym zakładający, że prawidłowe p 21 „ras” transdukuje sygnały pobudzające proliferację komórki, jest raczej odosobniony. Przeważa opinia [7, 103], że aktywacja p 21 „ras” sprzyja raczej różnicowaniu niektórych komórek niż proliferacji. Uproszczając można przyjąć, że sygnały indukujące aktywację p 21 „ras” są pochodzenia pozakomórkowego, p 21 „ras” zaś transdukuje efekt regulatorowy na molekule (białka lub metabolity) znajdujące się we wnętrzu komórki [16].

Jaki jest enzym efektorowy (docelowy substrat) dla p 21 „ras”? Z dwu powodów przypuszcza się [16], że jest nim fosfolipaza C.

1. Hormonalna aktywacja fosfolipazy C powoduje uwalnianie dwu wewnątrzkomórkowych przekaźników informacji (intracellular messengers), które, jak się wydaje, uczestniczą w procesach regulujących proliferację komórki wywołaną peptydowymi czynnikami wzrostu. Do przekaźników tych należą trójfosforan inozytolu odpowiedzialny za uwalnianie jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów i dwuacylglicerol, który aktywuje kinazę białkową C. Fleischman i wsp. [52] wykazali, że w komórkach stransformowanych przez geny „ras” ulega zmianie poziom fosforanu inozytolu i innych metabolitów, natomiast aktywacja kinazy białkowej C zapoczątkowuje m. in. wymianę Na^+/H^+

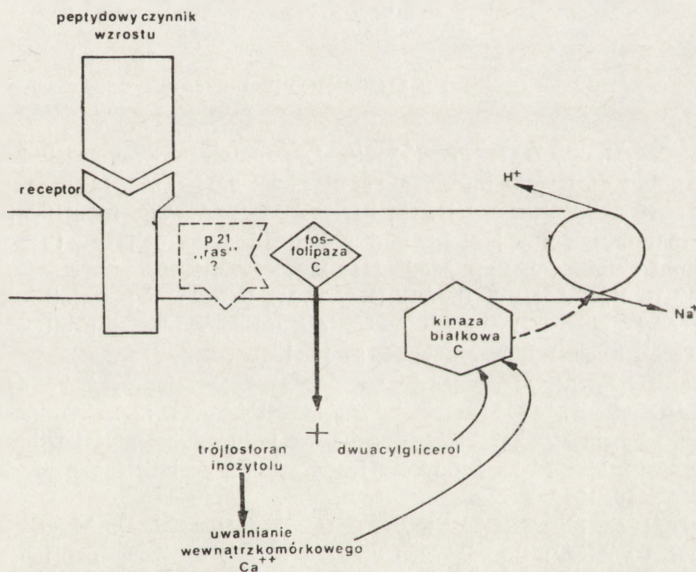
wraz z przejściowym wzrostem pH, który charakteryzuje komórki stymulowane czynnikami wzrostu.

2. Wiele danych wskazuje, że GTP uczestniczy w zależnej od receptora aktywacji fosfolipazy C.

Dotychczas jednak nie dysponujemy bezpośrednimi dowodami biochemicznymi wskazującymi, że docelowym substratem dla p 21 „ras” jest fosfolipaza C. Należy dodać, że Bar-Sagi i Feramisco [7a] wykazali, że wstrzyknięcie w fibroblasty pozostające w fazie spoczynkowej cyklu komórkowego p 21 „ras” wywołuje aktywację fosfolipazy A₂.

Na ryc. 2, będącej modyfikacją rycin z prac Newmarka [99] oraz Hoffbranda i wsp. [65], przedstawiono przypuszczalną drogę transdukcji sygnału nadawanego przez czynnik wzrostu z powierzchni komórki do jej wnętrza, mediowaną przez białka p 21 „ras”.

W jaki sposób komórkowe onkogeny „ras” wyizolowane z różnych nowotworów ludzi i gryzoni wywierają działanie transformujące? Naj-



Ryc. 2. Przypuszczalna droga transdukcji sygnału nadawanego przez czynnik wzrostu z powierzchni komórki do jej wnętrza za pośrednictwem białek p 21 kodowanych przez rodzinę genów „ras”. Związanie czynnika wzrostu ze specyficznym receptorem powoduje zmianę konformacji białka wiążącego GTP (p. 21 „ras”?). Zmiana konformacji tego białka aktywuje enzym — fosfolipazę C, która z lipidów błony komórkowej uwalnia dwa wewnątrzkomórkowe przekazniki informacji: trójfosforan inozytoli i dwuacylglicerol. Trójfosforan inozytoli powoduje uwalnianie wewnątrzkomórkowych jonów wapnia, a dwuacylglicerol aktywuje kinazę białkową C. Te dwa sygnały pozwalają na dalsze przekazanie informacji, możliwe że przez elementy szkieletowe komórki (cytoskeleton) do jądra (modyfikacja wg [65, 99])

częstszym mechanizmem indukującym aktywność transformującą genów „ras” jest punktowa mutacja. W białkach kodowanych przez zmutowane geny „ras” pojedyncze aminokwasy zostają zastąpione innymi zwykle w pozycjach 12, 13, 59, 61 i 63 [50]. Mutacje te zmieniają aktywność GTP-azy p 21 „ras”, która staje się około 8-10-krotnie niższa od prawidłowej [53, 90, 92, 135]. Prawie we wszystkich dotychczas badanych genach „ras” wykryto korelację między obniżoną aktywnością GTP-azy a zdolnościami transformującymi. Jak się wydaje, utrata zdolności do efektywnej hydrolizy GTP stanowi pułapkę utrzymującą docelowe białko w „stanie aktywności”, wskutek czego do wnętrza komórki jest przekazywany sygnał ciągły. Ostatnio jednak Lacal i wsp. [82] ustalili, że właściwości transformujące białek „ras” nie muszą się wiązać z obniżoną aktywnością GTP-azy „in vitro”. Autorzy ci stwierdzili, że p 21 „ras” zarówno z wysoką, jak i niską aktywnością GTP-azy wydajnie transformuje komórki NIH 3T3. A zatem dokładne zależności między mutacjami genów „ras” a onkogenezą dalekie są jeszcze od wyjaśnienia.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABELSON H. T., RABSTEIN L. S., Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res.*, **30**: 2213 - 2222, 1970.
- [2] ABRAMSON S., MILLER R. G., PHILLIPS R. A., The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J. Exp. Med.*, **145**: 1567 - 1579, 1979.
- [3] ACRES R. B., LAMB J. R., FELDMAN M., Effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on antigen-induced proliferation of human T-cell lines. *Immunology*, **54**: 9 - 16, 1985.
- [4] ADAMSON E. D., Oncogenes in development. *Development*, **99**: 449 - 471, 1987.
- [5] ANZANO M. A., ROBERTS A. B., SPORN M. B.: Anchorage-independent growth of primary rat embryo cells vs induced by platelet-derived growth factor and inhibited by type beta transforming growth factor. *J. Cell. Physiol.* **126**: 312 - 318, 1986.
- [6] ASSOIAN R. K., GROTENDORST G. R., MILLER D. M., SPORN M. B., Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets. *Nature*, **309**: 804 - 806, 1984.
- [7] BAR-SAGI D., FERAMISCO J. R., Micro injection of the “ras” oncogene protein into PC 12 cells induces morphological differentiation. *Cell*, **42**: 841 - 848, 1985.
- [7a] — Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by “ras” proteins. *Science*, **233**: 1061 - 1066, 1986.
- [8] BERRIDGE M. J., IRVINE R. F., Inositol trisphosphate, a novel second messenger in signal transduction. *Nature*, **312**: 315 - 321, 1984.
- [9] BESMER P., HARDY W. D. Jr., ZUCKERMAN E. E., BEGOLD P., LEDERMAN L., SNYDER H. W. Jr., The Hardy-Zuckerman 2-FeSV, a new feline retrovirus with oncogene homology to Abelson-MuLV. *Nature*, **303**: 825 - 828, 1983.

- [10] BESMER P., MURPHY J. E., GEORGE P. C., QIU F., BERGOLD P. J., LEDERMAN L., SNYDER H. W. Jr., BRODEUR D., ZUCKERMAN E. E., HARDY W. D., A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-"kit" with the protein kinase gene family. *Nature*, **320**: 415 - 421, 1986.
- [11] BESMER P., SNYDER H. W. Jr., MURPHY J. E., HARDY W. D. Jr., PARODI A., The Parodi-Irgens feline sarcoma virus, and simian sarcoma virus have homologous oncogenes, but in different contexts of the viral genomes. *J. Virol.*, **46**: 606 - 613, 1983.
- [12] BETSHOLTZ C., JOHNSON A., HELDIN C.-H., WESTERMARK B., LIND P., URDEA M. S., EDDY R., SHOWS T. B., PHILPOTT K., MELLOR A. L., KNOTT T. J., SCOTT J., cDNA sequences and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature*, **320**: 695 - 699, 1986.
- [13] BETSHOLTZ C., WESTERMARK B., EK B., HELDIN C.-H., Coexpression of a PDGF-like factor, and PDGF receptors in a human osteosarcoma cell line: Implications for autocrine receptor activation. *Cell*, **39**: 447 - 457, 1984.
- [14] BISHOP J. M., Viral oncogenes. *Cell*, **42**: 23 - 38, 1985.
- [15] — Tricks with tyrosine kinases. *Nature*, **319**: 722 - 723, 1986.
- [16] BOURNE H. R., SULLIVAN K. A., Mammalian G proteins: models for "ras" proteins in transmembrane signalling? *Cancer Surveys*, **5**: 257 - 274, 1986.
- [17] BOWEN-POPE D. F., The growth factor-platelet-transformation connection. [W] *The Cell Surface in Development and Cancer*, Red. L. Browder, Plenum Press, New York 1986.
- [18] BOWEN-POPE D. F., SEIFERT R. A., ROSS R., The platelet-derived growth factor receptor, [W] *Control of Animal Cell Proliferation*, Red. A. L. Boynton, H. L. Leffert, Academic Press, New York 281 - 312, 1985.
- [19] BOWEN-POPE D. F., VOGEL A., ROSS R., Production of platelet-derived growth factor-like molecules and reduced expression of platelet-derived growth factor receptors accompany transformation by a wide spectrum of agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 2396 - 2400, 1984.
- [20] BRODEUR G., SEEGER R. C., SCHWAB M., VARMUS H. E., BISHOP J. M., Amplification of N-"myc" in untreated human neuroblastoma correlates with advanced stage disease. *Science*, **224**: 1121 - 1124, 1984.
- [21] CAMPISI J., GRAY H. E., PARDEE A. B., DEAN M., SONENSHEIN G. E., Cell-cycle control of c-"myc" but not c-"ras" expression is lost following chemical transformation. *Cell*, **36**: 241 - 247, 1984.
- [22] CHANG E. H., GONDA M. A., ELLIS R. W., SCOLNICK E. M., LOWY D. R., Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 4848 - 4852, 1982.
- [23] CLEMMONS D. R., UNDERWOOD L. E., Van WYK J. J., Hormonal control of immunoreactive somatomedin production by cultured human fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, **67**: 10 - 19, 1981.
- [24] CLEMMONS D. R., Van WYK J. J., Evidence for a functional role of endogenously produced somatomedin-like peptides in the regulation of DNA synthesis in cultured human fibroblasts and porcine smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, **75**: 1914 - 1918, 1985.
- [25] COCHRAN B. H., ZULLO J., VERMA I. M., STILES C. D., Expression of the c-"fos" gene and of an "fos"-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor. *Science*, **226**: 1080 - 1082, 1984.

- [26] COHEN D. R., HAPEL A. J., YOUNG I. G.: Cloning and expression of the rat interleukin-3 gene. *Nucl. Acids Res.*, **14**: 3641 - 3658, 1986.
- [27] COLLINS S. J., GROUDINE M., Amplification of endogenous „myc”-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. *Nature*, **298**: 679 - 681, 1982.
- [28] COOK W. D., METCALF D., NICOLA N. A., BURGESS A. W., WALKER F., Malignant transformation of a growth dependent myeloid cell line by Abelson virus without evidence of an autocrine mechanism. *Cell*, **41**: 677 - 683, 1985.
- [29] COOPER G. M.: Cellular transforming genes. *Science*, **218**: 801 - 806, 1982.
- [30] COOPER J. A., BOWEN-POPE D. F., RAINES E., ROSS R., HUNTER T., Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. *Cell*, **31**: 263 - 273, 1982.
- [31] CROCE C. M., NOWELL P. C., Molecular basis of human B-cell neoplasia. *Blood*, **65**: 1 - 7, 1985.
- [32] CURRAN T., MILLER D. A., ZOKAS L., VERMA I. M., Viral and cellular „fos” proteins: A comparative analysis. *Cell*, **36**: 259 - 268, 1984.
- [33] DALLA-FAVERA R., GALLO R. C., GIALONGO A., CROCE C. M., Chromosomal localization of the human homolog (c-„sis”) of the simian sarcoma virus „onc” gene. *Science*, **218**: 686 - 688, 1982.
- [34] DALLA FAVERA R., WONG-STAAAL F., GALLO R. C., „Onc” gene amplification on promyelocytic leukemia cell line HL-60 and primary leukemia cells in the same patient. *Nature*, **299**: 61 - 63, 1982.
- [35] DELWICHE F., RAINES E., POWELL J., ROSS R., ADAMSON J., Platelet-derived growth factor enhances „in vitro” erythropoiesis via stimulation of mesenchymal cells. *J. Clin. Invest.*, **76**: 137 - 142, 1985.
- [36] deMARTINVILLE B., CUNNINGHAM J. M., MURRAY M. J., FRANCKE U., The N-„ras” oncogene assigned to the short arm of human chromosome 1. *Nucl. Acid Res.*, **11**: 5267 - 5275, 1983.
- [37] DEUEL T. F., HUANG J. S., Platelet-derived growth factor: Purification, properties, and biological activities. *Progr. Hematol.*, **13**: 201 - 221, 1983.
- [38] DHAR R., NIETO A., KOLLER R., DeFEO-JONES D., SCOLNICK E. M., Nucleotide sequence of two „ras”^H related-genes isolated from the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acid Res.*, **12**: 3611 - 3619, 1984.
- [39] DICK J. E., MAGLI M. C., HUSZAR D., PHILLIPS R. A., BERNSTEIN A., Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hemopoietic system of W/W^v mice. *Cell*, **42**, 71 - 79, 1985.
- [40] DONAHUE R. E., EMERSON S. G., WANG E. A., WONG G. G., CLARK S. C., NATHAN D. G., Demonstration of burst-promoting activity of recombinant human GM-CSF on circulating erythroid progenitors using an assay involving the delayed addition of erythropoietin. *Blood*, **66**: 1479 - 1481, 1985.
- [41] DOOLITTLE R. F., HUNKAPILLER M. W., HOOD L. E., DEVARE S. G., ROBBINS K. C., AARONSON S. A., ANTONIADES H. N., Simian sarcoma virus „onc” gene, v-„sis”, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science*, **221**: 275 - 277, 1983.
- [42] DONWARD J., YARDEN Y., MAYES E., SCRACE G., TOTTY N., STOCKWELL P., ULLRICH A., SCHLESSINGER J., WATERFIELD M. D., Close

- similarity of epidermal growth factor receptor and v-,erbB" oncogene protein sequences. *Nature*, **307**: 521 - 527, 1984.
- [43] DUNN A. R., METCALF D., STANLEY E., GRAIL D., KING J., NICE E. C., BURGESS A. W., GOUGH N. M., Biological characterization of regulators encoded by cloned hematopoietic growth factor gene sequences. [W] „Cancer Cells”, Volume 3, „Growth Factors and Transformation”. Red. J. Feramisco, B. Ozanne, C. Stiles (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory), **3**: 227 - 234, 1985.
- [44] ELLIS R. W., LOWY D. R., SCOLNICK E. M., The viral and cellular p 21 („ras”) gene family, [W] „Advances in Viral Oncology”, vol. 1, Red. G. Klein, Raven Press, New York 107 - 126, 1982.
- [45] EMERSON S. G., SIEFF C. A., WANG E. A., WONG G. G., CLARK S. C., NATHAN D. G., Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity. *J. Clin. Invest.*, **76**: 1286 - 1290, 1985.
- [46] EVAN G., Growth factors, receptors and oncogenes. *Trends Genet.*, **2**: 2 - 3, 1986.
- [47] EVANS S. W., RENNICK D., FARRAR W. L., Multilineage hematopoietic growth factor interleukin 3 and direct activators of protein kinase C stimulate phosphorylation of common substrates. *Blood*, **68**: 906 - 913, 1986.
- [48] FARRAR W. L., ANDERSON W. B.: Interleukin-2 stimulates association of protein kinase C with plasma membranes. *Nature*, **315**: 233 - 235, 1985.
- [49] FARRAR W. L., THOMAS T. P., ANDERSON W. B., Altered cytosol/membrane enzyme redistribution on interleukin-3 activation of protein kinase C. *Nature*, **315**: 235 - 237, 1985.
- [50] FASANO O., ALDRICH T., TAMANOI F., TAPAROWSKY E., FURTH M., WIGLER M., Analysis of the transforming potential of the human H-,„ras” gene by random mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **81**: 4008 - 4012, 1984.
- [51] First International Workshop on Chromosomes in Leukemia: chromosomes in Ph¹ positive chronic granulocytic leukaemia. *Br. J. Haematol*, **39**: 305 - 309, 1978.
- [52] FLEISCHMAN L. F., CHAHWALA S. B., CANTLEY L., „Ras”-transformed cells: altered levels of phosphatidylinositol-4,5 biphosphate and catabolites. *Science*, **231**: 407 - 410, 1986.
- [53] GIBBS J. B., SIGAL I. S., POE M., SCOLNICK E. M., Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic „ras” p 21 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 5704 - 5708, 1984.
- [54] GILBERT H. S., Myelofibrosis revisited: Characterization and classification of myelofibrosis in the setting of myeloproliferative disease, [W] Myelofibrosis and the Biology of Connective Tissue, Red. P. D. Berk, H. Castro-Malaspina, L. R. Wasserman, Alan R. Liss, New York 3 - 17, 1984.
- [55] GILMAN A. G., G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*, **36**: 577 - 579, 1984.
- [56] GOFF S. P., D'EUSTACHIO P., RUDDLE F. H., BALTIMORE D., Chromosomal assignment of the endogenous proto-oncogene c-„abl”. *Science*, **218**: 1317 - 1319, 1982.
- [57] GOFF S. P., GILBOA E., WITTE O. N., BALTIMORE D., Structure of the Abelson murine leukemia virus genome and the homologous cellular gene: studies with cloned viral DNA. *Cell*, **22**: 777 - 785, 1980.

- [58] GOLDWASSER E., IHLE J. N., PRYSTOWSKY M. B., RICH I., Van ZANI G., The effect of interleukin-3 on hemopoietic precursor cells, [W] Normal and Neoplastic Hemopoiesis, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Red. D. W. Golde, P. A. Marks, Alan R. Liss, New York 301 - 309, 1983.
- [59] GRAVES D. T., OWEN A. J., BARTH R. K., TEMPST P., WINOTO A., FORS L., HOOD L. E., ANTONIADES H. N., Detection of c-,,"sis" transcripts and synthesis of PDGF-like proteins by human osteosarcoma cells. *Science*, **226**: 972 - 974, 1984.
- [60] GREENBERG M. E., ZIFF E. B., Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-,,"fos" proto-oncogene. *Nature*, **311**: 433 - 438, 1984.
- [61] HABENICHT A. J. R., GLOMSET J. A., KING W. C., NIST C., MITCHELL C. D., ROSS R., Early changes in phosphatidylinositol and arachidonic acid metabolism in quiescent Swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.*, **256**: 12329 - 12335, 1981.
- [62] HAPEL A. J., FUNG M. C., JOHNSON R. M., YOUNG I. G., JOHNSON G., METCALF D., Biological properties of molecularly cloned and expressed murine interleukin-3. *Blood*, **65**: 1453 - 1459, 1985.
- [63] HEIM S., MITELMAN F., Multistep cytogenetic scenario in chronic myeloid leukemia, [W] *Adv. Viral Oncol*, Red. G. Klein, Raven Press, New York, **7**: 53 - 76, 1987.
- [64] HEISTERKAMP N., GROFFEN J., STEPHENSON J. R., SPURR N. K., GOODFELLOW P. N., SOLOMON E., CARRITT B., BODMER W. F., Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes. *Nature*, **299**: 747 - 749, 1982.
- [65] HOFFBRAND A. V., DREXLER H. G., GANESHAGURU K., PIGA A., WICKREMASINGHE R. G., Biochemical aspects of acute leukaemia. *Clin. Haematol.*, **15**: 669 - 694, 1986.
- [66] HOFFMAN-FALK H., EINAT P., SHILO B.-Z., HOFFMAN F. M., *Drosophila melanogaster* DNA clones homologous to vertebrate oncogenes: evidence for a common ancestor to the „src" and „abl" cellular genes. *Cell*, **32**: 589 - 598, 1983.
- [67] HUANG J. S., HUANG S. S., DEUEL T. F., Transforming protein of simian sarcoma virus stimulates autocrine cell growth of SSV-transformed cells through PDGF cell-surface receptors. *Cell*, **39**: 79 - 87, 1984.
- [68] HUNTER T., The proteins of oncogenes. *Scient. Am.*, **251**: (August), 70 - 79, 1984.
- [69] HURLEY J. B., SIMON M. I., TEPLow D. B., ROBISHAW J. D., GILMAN A. G.: Homologies between signal transducing G proteins and „ras" gene products. *Science*, **226**: 860 - 862, 1984.
- [70] IHLE J. N., KELLER J., OROSZALAN S., HENDERSON L. E., COPELAND T. D., FITCH F., PRYSTOWSKY M. B., GOLDWASSER E., SCHRADER J. W., PALASZYNSKI E., DY M., LEBEL B., Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, P cell-stimulating activity, and histamine-producing cell-stimulating activity. *J. Immunol.*, **131**: 282 - 287, 1983.
- [71] JOHNSON A., BETSHOLTZ C., HELDIN C.-H., WESTERMARK B., Antibodies against platelet-derived growth factor inhibit acute transformation by simian sarcoma virus. *Nature*, **317**: 438 - 440, 1985.
- [72] JOHNSON A., BETSHOLTZ C., von der HELM K., HELDIN C.-H., WESTERMARK B., Platelet-derived growth factor agonist activity of a secreted

- form of the v-,sis" oncogene product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 1721 - 1725, 1985.
- [73] JOHNSON A., HELDIN C.-H., WASTESON A., WESTERMARK B., DEUEL T. F., HUANG J. S., SEEBURG P. H., GRAY A., ULLRICH A., SCRACE G., STROBAND P., WATERFIELD M. D., The c-,sis" gene encodes a precursor of the B chain of platelet-derived growth factor. EMBO J., **3**: 921 - 928, 1984.
- [74] KELLER G., PAIGE C., GIBOA E., WAGNER E. F., Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent hematopoietic precursors. Nature, **318**: 149 - 154, 1985.
- [75] KELLY K., COCHRAN B. H., STILES C. D., LEDER P., Cell-specific regulation of the c-,myc" gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. Cell, **35**: 603 - 610, 1983.
- [76] KINDLER V., THORENS B., deKOSSODO S., ALLET B., ELIASON J. F., THATCHER D., FARBER N., VASSALLI P., Stimulation of hematopoiesis „in vitro" by recombinant bacterial murine interleukin 3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**: 1001 - 1005, 1986.
- [77] KLEIN G., KLEIN E., Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. Nature, **315**: 190 - 195, 1985.
- [78] KONOPKA J. B., WATANABE S. M., WITTE O. N., An alteration of the human c-,abl" protein in K 562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. Cell, **37**: 1035 - 1042, 1984.
- [79] KONOPKA J. B., WITTE O. N., Activation of the „abl" oncogene in murine and human leukemias Biochim. Biophys. Acta, **823**: 1 - 17, 1985.
- [80] — Detection of c-,abl" tyrosine kinase activity „in vitro" permits direct comparison of normal and altered „abl" gene products. Mol. Cell. Biol., **5**: 3116 - 3123, 1985.
- [81] KRONTIRIS T. G., COOPER G. M., Transforming activity of human tumor DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**: 1181 - 1184, 1981.
- [82] LACAL J. C., SRIVASTAVA S. K., ANDERSON P. S., AARONSON S. A., „Ras" p 21 proteins with high or low GTPase activity can efficiently transform NIH/3T3 cells. Cell, **44**: 609 - 617, 1986.
- [83] LAND H., PARADA L. F., WEINBERG R. A., Cellular oncogenes and multi-step carcinogenesis. Science, **222**: 771 - 778, 1983.
- [84] — Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. Nature, **304**: 596 - 602, 1983.
- [85] LEAL F., WILLIAMS L. T., ROBBINS K. C., AARONSON S. A., Evidence that the v-,sis" gene product transforms by interaction with the receptor for platelet-derived growth factor. Science, **230**: 327 - 330, 1985.
- [86] LEMISCHKA I. R., RAULET D. H., MULLIGAN R. C., Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. Cell, **45**: 917 - 927, 1986.
- [87] LIN S. L., KIKUCHI T., PLEDGER W. J., TAMM I., Interferon inhibits the establishment of competence in G₀/S-phase transition. Science, **233**: 356 - 359, 1986.
- [88] LOWY D. R., WILLUMSEN B. M., The „ras" gene family. Cancer Surveys, **5**: 275 - 289, 1986.
- [89] MACARA I. G., MARTINETTI G. V., BALDUZZI P. C., Transforming protein of avian sarcoma virus UR 2 is associated with phosphatidylinositol kinase activity: possible role in tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**: 2728 - 2732, 1984.

- [90] MANNE V., BEKESI E., KUNG H.-F., Ha-,ras" proteins exhibit GTPase activity: point mutations that activate Ha-,ras" gene products result in decreased GTPase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 376 - 380, 1985.
- [91] McCOY M. S., TOOLE J. J., CUNNINGHAM J. M., CHANG E. H., LOWY D. R., WEINBERG R. A., Characterization of a human colon/lung carcinoma oncogene. *Nature*, **302**: 79 - 82, 1983.
- [92] McGRATH J. P., CAPON D. J., GOEDEL D. V., LEVINSON A. D., Comparative biochemical properties of normal and activated human „ras" p 21 protein. *Nature*, **310**: 644 - 649, 1984.
- [93] METCALF D., BEGLEY C. G., NICOLA N. A., The proliferative effects of human GM-CSF alpha and beta and murine G-CSF in microwell cultures of fractionated human marrow cells. *Leuk. Res.*, **9**: 521 - 528, 1985.
- [94] MITELMAN F., LEVAN G., Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. IV. A survey of 1,871 cases. *Hereditas*, **95**: 79 - 139, 1981.
- [95] MOZER B., MARLOR R., PARKHURST S., CORCES V., Characterization and developmental expression of a Drosophila „ras" oncogene. *Mol. Cell. Biol.*, **5**: 885 - 889, 1985.
- [96] MURRAY M. J., SHILO B.-Z., SHIH C., COWING D., HSU H. W., WEINBERG R. A., Three different human tumor cell lines contain different oncogenes. *Cell*, **25**: 355 - 361, 1981.
- [97] MÜLLER R., BRAVO R., BURCKHARDT J., CURRAN T., Induction of c-„fos" gene and protein by growth factors precedes activation of c-„myc". *Nature*, **312**: 716 - 720, 1984.
- [98] MYERS C. D., KATZ F. E., JOSHI G., MILLAR J. L., A cell line secreting stimulating factors for CFU-GEMM culture, *Blood*, **64**: 152 - 155, 1984.
- [99] NEWMARK P., Events at the surface of the cell. *Nature*, **317**: 380, 1985.
- [100] NICOLA N. A., BEGLEY C. G., METCALF D., Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells. *Nature*, **314**: 625 - 628, 1985.
- [101] NIMAN H. L., HOUGHTEN R. A., BOWEN-POPE D. F., Detection of high molecular weight forms of platelet-derived growth factor by sequence-specific antisera. *Science*, **226**: 701 - 703, 1984.
- [102] NIMAN H. L., THOMPSON A. M. H., YU A., MARKMAN M., WILLEMS J. J., HERWIG K. R., HABIN N. A., WOOD C. B., HOUGHTEN R. A., BERNER R. A., Anti-peptide antibodies detect oncogene-related proteins in urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 7924 - 7928, 1985.
- [103] NODA M., KO M., OGURA A., LIU D., AMANO T., TAKANO T., IKAWA Y., Sarcoma viruses carrying „ras" oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. *Nature*, **318**: 73 - 75, 1985.
- [104] NOWELL P. C., Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.*, **46**: 2203 - 2207, 1986.
- [105] NOWELL P. C., HUNGERFORD D. A., A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science*, **132**: 1497 - 1499, 1960.
- [106] OHNO S., YAZAKI A., Simple construction of human c-„myc" gene implicated in B-cell neoplasms and its relationship with avian v-„myc" and human lymphokines. *Scand. J. Immunol.*, **18**: 373 - 388, 1983.
- [107] PAPAGEORGE A. G., DeFEO-JONES D., ROBINSON P., TEMELES G., SCOLNICK E. M., *Saccharomyces cerevisiae* synthesis proteins related to the p 21 gene product of „ras" found in mammals. *Mol. Cell. Biol.*, **4**: 23 - 29, 1984.

- [108] PERUCHO M., GOLDFARB M., SHIMIZU K., LAMA C., FOGH J., WIGLER M., Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell*, **27**: 467 - 476, 1981.
- [109] PIERCE J. H., Di FIORE P. P., AARONSON S. A., POTTER M., PUMPHREY J., SCOTT A., IHLE J. N., Neoplastic transformation of mast cells by Abelson-MuLV: abrogation of IL-3 dependence by nonautocrine mechanism. *Cell*, **41**: 685 - 693, 1985.
- [110] PIERCE J. H., EVA A., AARONSON S. A., Interactions of oncogenes with haematopoietic cells. *Clin. Haematol.*, **15**: 573 - 596, 1986.
- [111] PLATZER E., WELTE K., GABRILOVE J. L., LU L., HARRIS P., MERTELSMANN R., MOORE M. A. S., Biological activities of a human pluripotent hemopoietic colony stimulating factor on normal and leukemic cells. *J. Exp. Med.*, **162**: 1788 - 1802, 1985.
- [112] POWERS S., KARAOKA T., FASANO O., GOLDFARB M., STRATHERN J., BROACH J., WIGLER M., Genes in *S. cerevisiae* encoding proteins with domains homologous to the mammalian „ras” proteins, *Cell*, **36**: 607 - 612, 1984.
- [113] RENNICK D. M., LEE F. D., YOKOTA T., ARAI L., CANTOR H., NABEL G. J., A cloned MCGF cDNA encodes a multilineage hematopoietic growth factor: multiple activities of interleukin-3. *J. Immunol.*, **134**: 910 - 914, 1985.
- [114] RENZ M., VERRIER B., KURZ C., MÜLLER R., Chromatin association and DNA binding properties of the c-„fos” proto-oncogene. *Nucl. Acids. Res.*, **15**: 277 - 292, 1987.
- [115] Research News: c-„myc” implicated in RNA processing. *Science*, **233**: 159, 1986.
- [116] RETTENMIER C. W., CHEN J. H., ROUSSEL M. F., SHERR C. J., The product of the c-„fms” proto-oncogene: a glycoprotein with associated tyrosine kinase activity. *Science*, **228**: 320 - 322, 1985.
- [117] ROSS R., RAINES E. W., BOWEN-POPE D. F., The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, **46**: 155 - 169, 1986.
- [118] ROWLEY J. D., A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, **243**: 290 - 291, 1973.
- [119] RUPNIEWSKA Z. M., Delecje długich ramion chromosomu 5 (5q-). *Przegląd Lekarski*, **45**: 406 - 411, 1988.
- [120] RUPNIEWSKA Z. M., ROŻYNKOWA D., KOWAL M., Czy można uznać chromosom Ph¹ za marker nowotworowej wieloważnej limfohemopoetycznej komórki pnia? *Postępy Hig. Med. Dośw.*, **38**: 39 - 60, 1984.
- [121] SAMBUCETTI L. C., CURRAN T., The „fos” protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulase. *Science*, **234**: 1417 - 1419, 1986.
- [122] SCHMIDT R. A., GLOMSET J. A., WIGHT T. N., HABENICHT A. J. R., ROSS R., A study of the influence of mevalonic acid and its metabolites on the morphology of Swiss 3T3 cells. *J. Cell. Biol.*, **95**: 144 - 153, 1982.
- [123] SHERR C. J., RETTENMIER C. W., The „fms” gene and the CSF-1 receptor. *Cancer Surveys*, **5**: 221 - 232, 1986.
- [124] SHIH C., PADHY L. C., MURRAY M., WEINBERG R. A., Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature*, **290**: 261 - 264, 1981.
- [125] SHIH T. Y., PAPAGEORGE A. G., STOKES P. E., WEEKS M. O., SCOLNICK E. M., Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities

- associated with the p 21 „src” protein of Harvey murine sarcoma virus. *Nature*, **287**: 686 - 691, 1980.
- [126] SHIMIZU K., GOLDFARB M., PERUCHO M., WIGLER M., Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 383 - 387, 1983.
- [127] SHTIVELMAN E., LIFSHITZ B., GALE R. P., ROE B. A., CANAANI E., Alterantive splicing of RNAs transcribed from the human „abl” gene and from the „bcr”-„abl” fused gene. *Cell*, **47**: 277 - 284, 1986.
- [128] SIEFF C. A., EMERSON S. G., DONAHUE R. E., NATHAN D. G., WANG E. A., WONG G. G., CLARK S. C., Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a multi-lineage hematopoietin. *Science*, **230**: 1171 - 1173, 1985.
- [129] SILVER R. T., GALE R. P., Chronic myeloid leukemia. *Amer. J. Med.*, **80**: 1137 - 1148, 1986.
- [130] SOUZA L. M., BOONE T. C., GABRILOVE J., LAI P. H., ZSEBO K. M., MURDOCK D. C., CHAZIN V. R., BRUSZEWSKI J., LU H., CHEN K. K., BARENDT J., PLATZER E., MOORE M. A. S., MERTELSMANN R., WELTE K., Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*, **232**: 61 - 65, 1986.
- [131] STILES C. D., The molecular biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, **33**: 653 - 655, 1983.
- [132] STRYER L., Cyclic GMP cascade of vision. *Ann. Rev. Neuroscience*, **9**: 87 - 119, 1986.
- [133] SUGIMOTO Y., WHITMAN M., CANTLEY L. C., ERIKSON R. L., Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositide and diacylglycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 2117 - 2121, 1984.
- [134] SWAN D. C., McBRIDE O. W., ROBBINS K. C., KEITHLEY D. A., REDDY E. P., AARONSON S. A., Chromosomal mapping of the simian sarcoma virus „onc” gene analogue in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 4691 - 4695, 1982.
- [135] SWEET R. W., YOKOYAMA S., KAMATA T., FERAMISCO J. R., ROSENBERG M., GROSS M., The product of „ras” is a GTPase and T 24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature*, **311**: 273 - 275, 1984.
- [136] TILL J. E., McCULLOCH E. A., SIMINOVITCH L., A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen-colony forming cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **51**: 29 - 36, 1964.
- [137] TODA T., UNO I., ISHIKAWA T., POWERS S., KATAOKA T., BROEK D., CAMERON S., BROACH J., MATSUMOTO K., WIGLER M., In yeast, „RAS” proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell*, **40**: 27 - 36, 1985.
- [138] VADAS M. A., LOPEZ A. F., SHANNON M. F., ATKINSON Y., Human myeloid growth factors. *Immunol. Cell Biol.*, **65**: 141 - 145, 1987.
- [139] van ZOELLEN E. J. J., van de VEN W. J. M., FRANSSEN H. J., van OOSTWAARD T. M. J., van der SAAG P. T., HELDIN C.-H., LAAT S. W., Neuroblastoma cells express c-„sis” and produce a transforming growth factor antigenically related to the platelet-derived growth factor. *Mol. Cell. Biol.*, **5**: 2289 - 2297, 1985.
- [140] WANG J. Y. J., LEDLEY F., GOFF S., LEE R., GRONER Y., BALTIMORE D., The mouse c-„abl” locus: molecular cloning and characterization *Cell*, **36**: 349 - 356, 1984.

- [141] WATERFIELD M., SCRACE G. T., WHITTLE N., STROOBANT P., JOHNSSON A., WASTESON A., WESTERMARK B., HELDIN C.-H., HUANG J. S., DEUEL T. F., Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p 28 „sis” of simian sarcoma virus. *Nature*, **304**: 35 - 39, 1983.
- [142] WEINBERG R. A., „ras” oncogenes and the molecular mechanisms of carcinogenesis. *Blood*, **64**: 1143 - 1145, 1984.
- [143] WEISS L., TEICH N., VARMUS H., COFFIN J. (Red.), RNA Tumor viruses. 2nd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1984.
- [144] WELTE K., PLATZER E., LU L., GABRILOVE J. L., LEVI E., MERTELSMANN R., MOORE M. A. S., Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 1526 - 1530, 1985.
- [145] WESTERMARK B., HELDIN C.-H., JOHNSSON A., MELLSTRÖM K., NISTER M., WASTESON A., Biochemistry and biology of platelet-derived growth factor, [W] Growth and Maturation Factors, Red. G. Guroff, John Wiley and Sons, New York 73 - 115, 1983.
- [146] WESTIN F. H., WONG-STAAAL F., GELMANN E. P., DALLA-FAVERA R., PAPAS T. S., LAUTENBERGER J. A., EVA A., REDDY E. P., TRONICK S. R., AARONSON S. A., GALLO R. C., Expression of cellular homologues of retroviral onc genes in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 2490 - 2494, 1982.
- [147] WILLUMSEN B. M., CHRISTENSEN A., HUBBERT N. L., PAPAGEORGE A. G., LOWY D. R., The p 21 „ras” C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature*, **310**: 583 - 586, 1984.
- [148] YANG Y.-C., CIARLETTA A. B., TEMPLE P. A., CHUNG M. P., KOVACIC S., WITEK-GIANNOTTI J.-A. S., LEARY A. C., KRIZ R., DONAHUE R. E., WONG G. G., CLARK S. C., Human IL-3 (multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell*, **47**: 3 - 10, 1986.
- [149] YARDEN Y., ESCOBEDO J. A., KUANG W.-J., YANG-FENG T. L., DANIEL T. O., TREMBLE P. M., CHEN E. Y., ANDO M. E., HARKINS R. N., FRANCKE U., FRIED V. A., ULLRICH A., WILLIAMS L. T., Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature*, **323**: 226 - 232, 1986.
- [150] YUNIS J. J., SORENG A. L., BOWE A. E., Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens. *Oncogene*, **1**: 59 - 69, 1987.

Otrzymano: 2 listopada 1987.

Przyjęto: 10 stycznia 1988.

Adres autorki: ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin.

WIELOETAPOWY ROZWÓJ PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ. II. ZMIANY MOLEKULARNE ZWIĄZANE Z PRZEWLEKŁĄ BIAŁACZKĄ SZPIKOWĄ

MULTISTEP EVOLUTION OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA. II. MOLECULAR CHANGES IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Zofia, Monika RUPNIEWSKA

Klinika Hematologii Instytutu Chorób Wewnętrznych AM w Lublinie

Streszczenie. Przewlekła białaczka szpikowa (chronic myeloid leukemia, w skrócie CML) najczęściej wiąże się ze stałą nieprawidłowością chromosomową, określaną jako translokacja 9;22 — t(9;22)(q34.1;q11.21). Następstwem tej translokacji będzie kaskada zmian molekularnych, na którą składają się:

przemieszczenie protoonkogenu c-„abl”* z prawidłowego położenia w chromosomie 9 w rejon „bcr” (breakpoint cluster region) w chromosomie 22;

fuzja między genami c-„abl” i „bcr”;

transkrypcja hybrydowego informacyjnego RNA, wielkości 8 kb;

translacja nowego białka — p 210 o aktywności kinazy tyrozynowej.

Pomimo dowodów, że przemieszczenie c-„abl” odgrywa kluczową rolę w patogenezie CML, nie jest, jak się wydaje, pierwszą zmianą. Brodsky i wsp. sugerują, że we wczesnym okresie CML, mającym miejsce w komórce macierzystej, zachodzi:

przemieszczenie genu, za co prawdopodobnie odpowiada płytkowa polimeraza DNA, wykazująca właściwości odwrotnej transkryptazy;

aktywacja protoonkogenu c-„sis” zlokalizowanego w chromosomie 22 i zmiany we wzroście komórek wywołane przez płytkowy czynnik wzrostu, który jest produktem c-„sis”.

Ostatnim etapem w patogenezie CML jest klonalna ekspansja komórek z t(9;22).

Summary. Chronic myeloid leukemia (CML) is most frequently associated with a consistent chromosome abnormality designated as translocation 9;22 — t(9;22)(q34.1;q11.21). Translocation 9;22 causes a cascade of molecular changes generating:

transfer of c-„abl” proto-oncogene from its normal residence on chromosome 9 to chromosome 22 on the “bcr” region (breakpoint cluster region);

* Wykaz skrótów podano w I części pracy.

fusion of genes formed between c-“abl” and “bcr”;
transcription of hybrid 8 kb messenger RNA;
translation of novel 210 kd tyrosine kinase protein.

Despite evidence that translocation of c-“abl” plays an important role in the pathogenesis of CML, it may not be the primary event. Brodksy et al. proposed that on the early step of CML, at the stem cell level, the following changes take place:

acquisition of the ability for gene movement in which increased levels of of platelet DNA polymerase (PDP-reverse transcriptase),

activation of the “sis” proto-oncogene, which is located on chromosome 22, and growth changes caused by platelet derived growth factor (PDGF — the product of the c-“sis” gene).

The clonal expansion of cells with t(9;22) is the late event in the pathogenesis of CML.

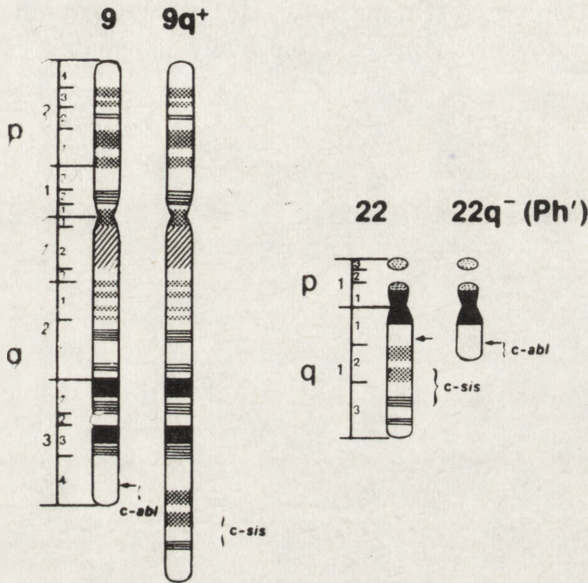
POWSTANIE HYBRYDOWEGO GENU „bcr”-„abl”

Jak powiedziano w I części pracy, w 90 - 95% przypadków przewlekłej białaczki szpikowej (chronic myelogenous leukemia, w skrócie CML) występuje t(9;22)(q34.1;q11.21). W następstwie tej translokacji proto-onkogen c-„abl”, który w warunkach prawidłowych znajduje się w długich ramionach chromosomu 9 (3q34) (patrz I cz. pracy), zostaje przemieszczony w chromosom 22 [17]. Przemieszczenie c-„abl” występuje niezależnie od tego, czy jest to typowa t(9;22), czy złożone lub proste warianty tej translokacji. Drugim protoonkogenem ulegającym przemieszczeniu w CML jest c-„sis”, położony w 22q13 (patrz I cz. pracy). Chociaż c-„sis” jest zawsze tracony z chromosomu 22, to jednak chromosomy-biorcy są różni zależnie od typu translokacji. Zwykle biorcą jest chromosom 9 [4, 26]. Udział protoonkogenów c-„abl” i c-„sis” w t(9;22) schematycznie przedstawia ryc. 1.

Złamanie punktowe w chromosomie 9 występuje w różnych miejscach, najczęściej w granicach od 14 kilobaz (kilobase, w skrócie kb) do ponad 100 kb w górę od (upstream) końca 5' c-„abl” [30]. W przeciwieństwie do zmiennej lokalizacji złamania punktowego w chromosomie 9, złamanie w chromosomie 22 występuje w obrębie małego segmentu DNA długości kilku par zasad (5,8 kb), stąd segment ten nazwano „break-point cluster region”, w skrócie „bcr” [28]. Złamanie punktowe w krytycznym rejonie „bcr” jest cechą nabytą i specyficzną dla CML z t(9;22). Rejon „bcr” jest częścią genu długości ok. 45 kb, kodującego polipetyd [29]. Gen ten nie wykazuje homologii z genem kodującym część stałą łańcucha lekkiego lambda immunoglobulin, który także leży w długich ramionach chromosomu 22 (22q11) [37]. W rezultacie w delecyjnym chromosomie 22 pozostają: gen dla części stałej łańcucha lekkie-

go lambda immunoglobulin i koniec 5' „bcr”, przy czym 5' „bcr” i translokowany c-„abl” pozostają w tej samej orientacji transkrypcyjnej.

W prawidłowych komórkach hemopoetycznych oraz w komórkach niehemopoetycznych c-„abl” ulega transkrypcji w dwie molekuly informacyjnego RNA (messenger RNA, w skrócie mRNA) długości 6 i 7 kb [52], które z kolei ulegają translacji w białko o ciężarze cząsteczkowym



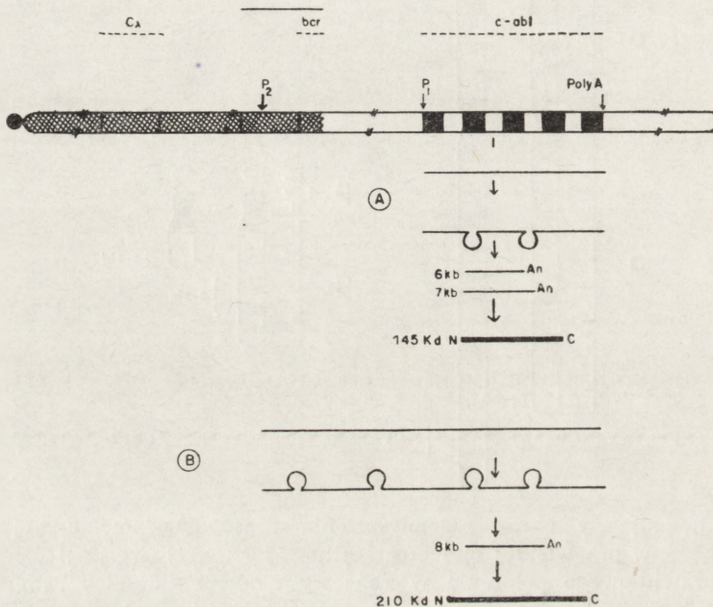
Ryc. 1. Schematyczny obraz przemieszczenia protoonkogenów c-„abl” i c-„sis” w przewlekłej białaczce szpikowej z t(9;22) (wg [27])

c-„abl” z prawidłowego położenia w końcowym odcinku długich ramion chromosomu 9 zostaje przemieszczony w delecyjne krótkie ramiona chromosomu 22, c-„sis” jest zawsze tracony z chromosomu 22 i zwykle, chociaż nie zawsze, ulega przemieszczeniu w chromosom 9

145 kilodaltonów (w skrócie kd) — p 145 [33]. W komórkach CML pojawia się natomiast nowy transkrypt c-„abl” długości 8 kb, a niekiedy nawet większy [5, 11, 14, 24]. Klonowanie stykowego rejonu z chromosomu 22 ujawniło, że nieprawidłowo długi transkrypt mRNA jest molekułą hybrydową zawierającą egzony z końca 5' „bcr”, pozostającego w chromosomie 22, jak i prawie wszystkie egzony (z wyjątkiem I) z translokowanego c-„abl” [45]. Tak więc w wyniku t(9;22) powstaje nowy gen, którego część 5' pochodzi z sekwencji „bcr”, część 3' zaś z sekwencji c-„abl”. Niezwykła długość transkryptu, który rozciąga się od złamania punktowego w chromosomie 22 do sygnałnej poliadenylacji z c-„abl” prawdopodobnie zależy od aktywacji promotora „bcr”. Nieprawidłowy mRNA długości 8 kb ulega translacji w białko o ciężarze cząsteczkowym

210 kd — p 210, które jest białkiem unikatowym, charakterystycznym dla CML. Wszystkie te przemiany przedstawia schematycznie ryc. 2.

Koniec aminowy prawidłowego białka p 145, kodowanego przez c-„abl”, składający się z ok. 25 aminokwasów, w nowym białku p 210 zostaje zastąpiony przez 600 - 700 aminokwasów kodowanych przez „bcr”. W białku p 160, kodowanym przez onkogen v-„abl” retrowirusa białaczki Abelsona myszy, 113 aminokwasów z końca aminowego prawidłowego białka kodowanego przez komórkowy gen „abl” zostaje zastąpio-



Ryc. 2. Schemat zmian molekularnych, jakie występują w przewlekłej białaczce szpikowej [46]. Na rycinie przedstawiono hybrydowy chromosom 22 (Ph¹). Dystalna część długich ramion Ph¹ pochodzi z chromosomu 9. Powyżej zaznaczono: gen kodujący część stałą lekkiego łańcucha lambda immunoglobulin (C lambda); gen „bcr” (od break-point cluster region), przy czym linia ciągła przedstawia cały gen „bcr”, a linia przerywana — krytyczny rejon złamania punktowego (rejon „bcr”); c-„abl” (homologiczny z v-„abl” retrowirusa białaczki Abelsona myszy, który jest przedstawiony jako szereg egzonów (pola białe) i intronów (pola białe)); P₁ — promotor c-„abl” położony w egzonie I; Poly A — sygnał poliadenylacji; P₂ — rejon promotora genu „bcr”. W części A ryciny przedstawiono prawidłową transkrypcję genu c-„abl”, w której wyniku powstają dwie molekuly mRNA długości 6 i 7 kb oraz produkt translacji — p 145. W białku tym zaznaczono koniec aminowy (N) i karboksylowy (C). W części B ryciny przedstawiono transkrypcję i tranlację, jakie mają miejsce w hybrydowym chromosomie Ph¹. Transkrypcję inicjuje P₂, a przebiega ona przez złamanie punktowe i obejmuje translokowany c-„abl”. Długość nowego transkryptu mRNA zazwyczaj wynosi 8 kb [24], chociaż opisywano i większe transkrypty 8,2 kb [14], a nawet 8,5 kb [5]. Następstwem translacji tego mRNA jest p 210

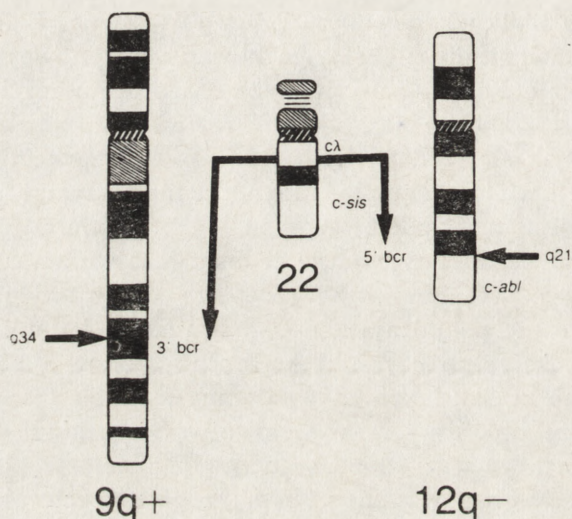
nych przez 236 aminokwasów kodowanych przez gen „gag” retrowirusa. A zatem transformujące białko retrowirusa powstaje wskutek podstawięcia końca aminowego produktu c-„abl” przez sekwencje kodowane przez v-„gag” [1].

Dotychczas nie wiemy, w jaki sposób hybrydowy gen „bcr”-„abl” indukuje proliferację hemopoetycznej komórki macierzystej. Występuje co najmniej jedna istotna różnica czynnościowa między „bcr”-„abl” a prawidłowym c-„abl”, a mianowicie białka kodowane zarówno przez v-„abl” retrowirusa, jak i p 210, występujące w komórkach CML, wykazują dużo wyższy stopień aktywności kinazy tyrozynowej niż prawidłowe białko p 145 kodowane przez c-„abl” [31-33]. Obszar kinazy tyrozynowej w białku kodowanym przez retrowirusa białaczki Abelsona myszy jest homologiczny z obszarem kinazy tyrozynowej w białkach kodowanych przez onkogeny innych szybko transformujących retrowirusów, których przedstawicielem jest v-„src” retrowirusa mięsaka Rousa drobiu. A zatem, jak się wydaje, hybrydowe p 210 ma krytyczne znaczenie w transformacji wielopotencjalnej komórki macierzystej szpiku. Prawdopodobieństwo jest duże, ponieważ zgodnie z sugestiami niektórych autorów [41] p 160 v-„abl” wywołuje transformację komórki macierzystej szpiku, działając jako namiastka receptora dla interleukiny-3 lub dla czynnika wzrostu pobudzającego wytwarzanie kolonii granulocytów i makrofagów, które to czynniki kontrolują wzrost i różnicowanie zarówno tej komórki, jak i komórek potomnych (patrz I cz. pracy). Należy przypomnieć, że hipoteza „ryzyka nowotworu” zakłada możliwość rozwoju nowotworu we wszystkich tych przypadkach, w których zachodzą zaburzenia mechanizmów genetycznych regulujących proliferację bądź wskutek nadmiaru czynnika wzrostu, bądź wskutek nadmiernej aktywności komórki na czynnik wzrostu.

Dotychczas jednak nie ustalono, na które komórki macierzyste ludzkiego szpiku działa produkt hybrydowego genu „bcr”-„abl” — p 210. McLaughlin i wsp. [38] wykazali, że w hodowli komórek myszy p 210 początkowo stymuluje wzrost niedojrzałych komórek limfoidalnych typu komórki B, w późniejszym zaś okresie hodowli niektóre klony ulegają pełnej transformacji nowotworowej. Zjawisko to, jak się wydaje, jest analogiczne do wieloetapowego rozwoju ludzkiej CML. Kurzrock i wsp. [34] odkryli dwa warianty p 210 kodowanego przez „bcr”-„abl”. Warianty te różnią się występowaniem lub brakiem trzeciego egzonu „bcr” i zostały określone jako „bcr (3⁺)”-„abl” i „bcr (3⁻)”-„abl”. Brak trzeciego egzonu nie wpływa prawdopodobnie dlatego w uchwytny sposób na rozmiary p 210, że egzon ten jest mały i koduje tylko 25 aminokwasów. Oba warianty wykazują aktywność kinazy tyrozynowej. Jednakże pacjenci z wariantem „bcr (3⁻)”-„abl” przeżywali 10 i 11 lat, a prze-

łom blastyczny był typu limfoidalnego, natomiast pacjenci z wariantem „bcr (3⁺)”-„abl” przeżywali 3 i 3,5 lat, a przełom blastyczny miał charakter mieloidalny.

Kluczowa rola, jaką wydaje się odgrywać przemieszczenie c-„abl” w rejon „bcr”, i powstanie nowego hybrydowego białka — p 210 zostały niedawno potwierdzone w opublikowanym przypadku CML, który przebiegał z rzadką translokacją (9; 12)(q34; q21) [49]. W translokacji tej w delecyjnych długich ramionach chromosomu 12 doszło do fuzji „bcr” (z chromosomu 22) i c-„abl” (z chromosomu 9), co schematycznie przedstawia ryc. 3. Morris i wsp. [40] badali 5 pacjentów z CML Ph’ ujemną.



Ryc. 3. Fuzja 5'„bcr” i c-„abl” w długich ramionach chromosomu 12 w przewlekłej białaczce szpikowej Ph', ujemnej w przypadku opublikowanym przez Teyssier i wsp. [49]. Złamania punktowe, zaznaczone strzałkami, występują w 9q34 i 12q21. c-„abl” zostaje przemieszczony w 12q21. Pomimo że nie dochodzi do utraty długich ramion chromosomu 22, to jednak w rejonie „bcr” następuje złamanie i koniec 3'„bcr” zostaje przemieszczony w chromosom 9, koniec zaś 5'„bcr” — w chromosom 12, gdzie następuje fuzja z c-„abl”

U dwu z nich, pomimo prawidłowego kariotypu, autorzy wykryli istnienie hybrydowego genu „bcr”-„abl”. Mechanizm powstania tego genu w obu tych przypadkach nie wiązał się z translokacją chromosomową, ale był następstwem przemieszczenia (relocation) genu. Opisano również pacjenta z podwójnym chromosomem Ph' w przebiegu przełomu blastycznego CML, u którego wykryto amplifikację „bcr” i znacznie większy transkrypt RNA (nowy transkrypt RNA był długości 10,3 kb, podczas gdy zwykle spotykany w CML transkrypt jest długości ok. 8 kb) [3].

ROLA PŁYTKOWEJ POLIMERAZY DNA

Pomimo przekonujących danych, że translokacja c-„abl” z chromosomu 9 w chromosom 22 i fuzja między 5’ „bcr” a c-„abl” odgrywają kluczową rolę w patogenezie CML, to opisane wydarzenia nie muszą stanowić pierwszego etapu w rozwoju tej choroby. Badania epidemiologiczne osób, które przeżyły wybuch bomby atomowej i u których następnie rozwinęła się CML Ph’ dodatnia, ujawniły, że okres utajenia wynosił 5 - 14 lat [6]. Zanim więc pojawią się tak „grube” nieprawidłowości cytogenetyczne, jak chromosom Ph’, musi zajść wiele zmian submikroskopowych, które inicjują proliferację komórek i stan przedbiałaczkowy.

Do zmian inicjujących, a następnie potrzymujących rozwój CML zdaniem Brodsky i wsp. [9] należą:

1. Przegrupowanie genu (gene rearrangement, gene movement), za co prawdopodobnie jest odpowiedzialny podwyższony poziom płytkowej polimerazy DNA (platelet DNA polymerase, w skrócie PDP). Jak się wydaje enzym ten warunkuje odwrócenie transkrypcji.

2. Aktywacja c-„sis”, który koduje łańcuch B płytkowego czynnika wzrostu (platelet-derived growth factor, w skrócie PDGF) i związana z tym proliferacja komórek, a zwłaszcza komórek środowiska hemopoeetycznego.

3: translokacja c-„abl” z chromosomu 9 w chromosom 22, fuzja między 5’ „bcr” a c-„abl”, transkrypcja hybrydowego mRNA długości 8 kb, translacja nowego białka p 210 o aktywności kinazy tyrozynowej. Wszystkie te wydarzenia wiążą się z chromosomem Ph’ i są już wydarzeniami późnymi w patogenezie CML.

4. Klonalna ekspansja komórek Ph’ dodatnich.

Wiadomo, że przemieszczenia genu lub genów komórkowych mają miejsce podczas translokacji chromosomowych, a także w procesie transdukcji i rekombinacji komórkowego protoonkogenu w genom retrowirusa, który staje się wówczas transformującym retrowirusem. Oba te zdarzenia prowadzą do powstania onkogenów. Brodsky i wsp. [9] sugerują, że odwrotna transkryptaza, którą wykryto także u człowieka, może powodować przegrupowanie genu, co inicjuje onkogenezę.

PDP została wyizolowana z cząsteczek wirusopodobnych (virus-like particles), znajdujących się w płytkach człowieka i ma zdolność podtrzymywania syntezy komplementarnego DNA na matrycy RNA (zdolność odwrotnej transkrypcji) [10, 47]. PDP jest odmienna od którejkolwiek ze znanych polimeraz DNA pochodzenia komórkowego, lecz wykazuje podobieństwo do odwrotnej transkryptazy. Dotychczas jest nie-

odróżnialna od polimerazy DNA, którą wykryto i wyizolowano z cząsteczek wirusopodobnych, występujących w cytoplazmie komórek nowotworowych człowieka [2, 44]. Oznacza to, że zarówno PDP, jak i polimeraza ludzkiej komórki nowotworowej znajdują się w odpowiadających im wirusopodobnych cząsteczkach razem ze starterowym i matrycowym RNA (RNA primers and templates), tak że *in vitro* może być syntetyzowany krótki komplementarny DNA [10, 47]. We wszystkich badanych przypadkach nowotworów, łącznie z ostrymi białaczkami w okresie remisji, stwierdzono w zasadzie podwyższony poziom polimerazy komórki nowotworowej [2, 44, 50]. Najwyższe wartości PDP występują u chorych z CML i spotyka się je już w bardzo wczesnym okresie choroby [10, 47]. Zdaniem Brodsky i wsp. [9] podwyższony poziom PDP prawdopodobnie wyprzedza wystąpienie objawów klinicznych, ponieważ enzym ten warunkuje mechanizm przegrupowania genu. Wprawdzie wyniki dotychczasowych badań sugerują, że podwyższony poziom PDP raczej nie wiąże się ze zwiększonym ryzykiem nowotworu, ale Brodsky i wsp. są odmiennego zdania, ponieważ enzym ten w niektórych przypadkach wpływa na ekspresję lub amplifikację onkogenu. Według tych ostatnich autorów podwyższenie poziomu PDP jest zjawiskiem bardzo wczesnym w CML, znacznie wyprzedzającym translokację c-„abl”, która w zasadzie zbiega się z wystąpieniem chromosomu Ph' i klonalną ekspansją komórek białaczkowych. Sugestie te są zgodne z modelem rozwoju CML, według którego inicjującą zmianą jest klonalny wzrost szpikowej komórki macierzystej, jednakże bez cech złośliwości, co może nie dawać objawów klinicznych [46].

ROLA c-„sis”

Gale [46] przytacza trzy rodzaje argumentów przemawiających przeciw roli c-„sis” w patogenezie CML:

1. c-„sis” może być przemieszczony w różne chromosomy.
2. Brak przegrupowania DNA c-„sis”.
3. Niemożność wykrycia transkryptu RNA c-„sis” w białaczkowych komórkach.

Autor zastrzega jednak, że w małej subpopulacji komórek białaczkowych może występować ekspresja c-„sis” i może on odgrywać pewną rolę w CML. Brodsky i wsp. [9] nie wykluczają, że wniosek Gale odnośnie niewielkiego lub nawet żadnego udziału c-„sis” w patogenezie CML jest słuszny, ale zastrzegają, że dotyczy on względnie późnego etapu choroby, gdy już nastąpi translokacja c-„abl” z chromosomu 9 w 22 i ekspresja hybrydowego genu „bcr”-„abl” w białaczkowych komórkach. We wczesnym zaś etapie CML, przed powstaniem chromosomu Ph',

zdaniem Brodsky i wsp. [9] należy oczekiwać istotnego wzrostu aktywności PDP, c-„sis” i jego produktu — PDGF. Mianowicie we wczesnym okresie CML występuje charakterystyczny wzrost megakariopoezy. Niedawno wykazano ekspresję c-„sis” we wszystkich białaczkowych megakarioblastach u pacjenta z ostrą białaczką megakarioblastyczną i zespołem Downa [48]. Wiadomo również, że megakariocyty wytwarzają PDGF. Morgan i Brodsky [39] od zdrowego dawcy wyprowadzili linię komórki hemopoetycznej złożoną z bardzo wczesnych rozwojowo prekursorów megakariocytów (megakarioblastów), które miały zdolność zarówno wytwarzania PDGF, jak i receptorów dla PDGF, co stanowi przykład automitogenezy. Zdaniem Brodsky i wsp. [9] PDGF może uczestniczyć w proliferacji labilnego genetycznie klonu komórki macierzystej szpiku, działając bądź bezpośrednio na komórki macierzyste, bądź pośrednio powodując rozrost komórek środowiska hemopoetycznego, które mogą być komórkami „żywiącymi” (feeder cells). Hipoteza Brodsky i wsp. [9] znajdują uzasadnienie w badaniach przedstawionych w I części pracy. W badaniach tych wykazano, że molekuły PDGF-podobne wytwarzane przez linię erytroleukemiczną działają jako czynnik mitogenny na komórki mezenchymalne i za ich pośrednictwem stymulują hemopoezę.

Hipoteza Brodsky i wsp. [9] nie wyklucza możliwości, że c-„sis” i PDGF odgrywają również rolę w późniejszym okresie CML. Translokacja c-„sis” z chromosomu 22 w chromosom 9 może się wiązać z jego nieprawidłową ekspresją w komórkach Ph’ dodatnich [23]. Potwierdza to wykrycie ekspresji c-„sis” w białaczkowych blastach chorych z CML w okresie zaostrzenia lub przełomu blastycznego [7, 36, 42], a także w komórkach linii K 562 pobudzonych do różnicowania w megakariocyty. (Linia K 562 została wyprowadzona z komórek wysięku opłucnowego pacjenta z przełomem blastycznym w przebiegu Ph’ dodatniej CML i jest uważana za linię bardzo młodych komórek blastycznych i/lub bardzo młodych prekursorów erytroblastów [25].) Jeśli zatem komórki białaczkowe będą wydzielały produkt kodowany przez c-„sis”, to odczyn ze strony fibroblastów zrębu szpikowego spowoduje zwłóknienie szpiku. Zwłóknienie to często towarzyszy późnym okresom CML [43].

ROLA N-„ras”

Eva i wsp. [22] badali metodą transfekcji transformujące sekwencje DNA m. in. w linii komórkowej IM 9 wyprowadzonej od pacjenta z CML i wykazali, że wywołują one złośliwą transformację komórek NIH 3T3. Aktywnym genem okazał się N-„ras”, jeden z trzech członków rodziny genów „ras” (patrz I cz. pracy). Jest on zresztą najczęściej wykrywanym metodą transfekcji genem w ludzkich proliferacjach hemo- i limfopoe-

tycznych. Onkogen ten występuje w ponad 50% przypadków ostrych białaczek szpikowych, a także w ostrych białaczkach limfoblastycznych i chłoniakach [21], przy czym obecność aktywnego N-„ras” nie zależy od stopnia zróżnicowania komórki nowotworowej [41].

Dzięki badaniom molekularnym prawidłowych klonów protoonkogenów „ras” i ich aktywnych alleli ustalono, że najczęstszym mechanizmem odpowiedzialnym za złośliwą konwersję c-„ras” jest punktowa mutacja. W przypadku aktywacji N-„ras” w ostrych białaczkach szpikowych zmiana pojedynczej zasady występuje w kodonie 13 [8].

INNE NOWOTWORY PRZEBIEGAJĄCE Z TRANSLOKACJĄ 22q11

Translokację 22q11 poza CML Ph' dodatnią spotykano:

w ostrej białaczce limfoblastycznej (acute lymphoblastic leukemia, w skrócie ALL) Ph' dodatniej;

w wariacie karyotypowym chłoniaka Burkitta (Burkitt lymphoma, w skrócie BL), przebiegającym z translokacją (8; 22);

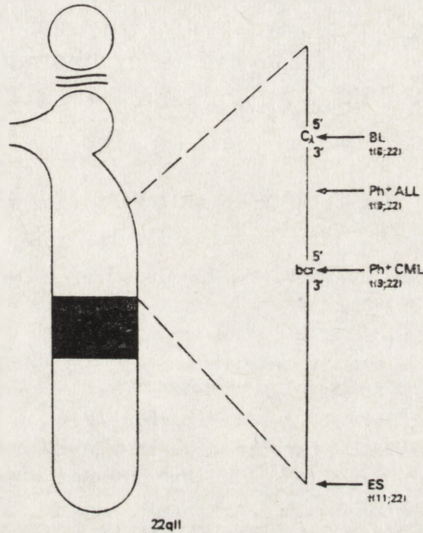
w mięsaku Ewinga (Ewing sarcoma, w skrócie ES) [16, 19, 20].

Dotychczasowe dane wskazują, że chociaż złamanie punktowe w chromosomie 22 w tych nowotworach w badaniu mikroskopowym wydaje się zlokalizowane w tym samym miejscu, to jednak w badaniach molekularnych stwierdza się heterogenność złamań punktowych. I tak np. Erikson i wsp. [20] wykazali różnice w miejscach pozornie identycznych złamań punktowych w 22q11, jakie występują w CML Ph' dodatniej i w ALL także Ph' dodatniej. Autorzy badali 5 chorych z ALL Ph' dodatnią. W dwu przypadkach, u osób dorosłych, translokacja była identyczna z translokacją występującą w CML i dotyczyła rejonu „bcr”, natomiast u dwojga dzieci i jednego młodocianego złamanie punktowe w 22q11 leżało bardziej proksymalnie od rejonu „bcr”. U jednego z tych pacjentów wykazano również, że transkrypt RNA z c-„abl” jest prawidłowy. W tym przypadku złamanie punktowe w 22q11 różniło się od miejsca złamania w wariacie chłoniaka Burkitta z t(8; 22) i nie obejmowało locus dla części stałej łańcucha lekkiego lambda immunoglobulin [16] (leżało bardziej dystalnie od locus dla części stałej łańcucha lekkiego lambda immunoglobulin, a bardziej proksymalnie w stosunku do „bcr”).

Na ryc. 4 przedstawiono poznaną dotychczas, metodami genetyki molekularnej, różnorodną lokalizację złamań punktowych w prążku q11 chromosomu 22 w różnych nowotworach.

Badania Eriksona i wsp. [20] potwierdza niedawna publikacja Croce i wsp. [15]. Autorzy ci wykryli cztery odrębne loci związane z genem „bcr”, analogiczne do loci genów immunoglobulinowych lub genów re-

ceptora komórki T. Loci te nazwano „bcr 4”, „bcr 3”, „bcr 2” i „bcr 1”. Składają się odpowiednio z fragmentów 23, 19, 13 i 9 kb. W chromosomie 22 w stosunku do centromeru leżą w następującej kolejności: „bcr 2” → „bcr 4” → locus dla części stałej łańcucha lekkiego lambda immunoglobulin → „bcr 1” → „bcr 3” → „sis”. Z uwagi na położenie można wyeliminować loci „bcr 2” i „bcr 4” jako potencjalnych kandy-



Ryc. 4. Odmienna lokalizacja złamań punktowych w prążku q11 chromosomu 22 w różnych nowotworach [20]: Złamanie punktowe w chłoniaku Burkitta (BL) w 22p11 z translokacją (8;22) obejmuje locus dla części stałej łańcucha lekkiego lambda immunoglobulin (C lambda); Złamanie punktowe w dziecięcej ostrej białaczce limfoblastycznej Ph' dodatniej Ph+ ALL) z translokacją (9;22) leży dystalnie w stosunku do locus immunoglobulinowego, a proksymalnie w stosunku do rejonu „bcr”; Złamanie punktowe w przewlekłej białaczce szpikowej Ph' dodatniej (Ph+ CML) leży w rejonie „bcr”; Złamanie punktowe w mięsaku Ewinga (ES), leżące na pograniczu prążków q11 → q12 chromosomu 22, znajduje się najbardziej dystalnie

datów na fuzję z c-„abl” w przypadkach ALL Ph' dodatniej. Niedawno kilka zespołów naukowych wykryło białkowy produkt — p 190 kodowany przez translokowany c-„abl” w przypadkach ALL Ph' dodatniej, lecz „bcr” ujemnej [12, 13, 35, 51] (ALL „bcr” ujemna oznacza, że nie zachodzi przegrupowanie loci „bcr” [18]). Występowanie p 190 koreluje z ekspresją niezwykłego mRNA „abl” [12, 13, 35]. Nie znamy jednakże sekwencji w chromosomie 22, które ulegają fuzji z translokowanym c-„abl” w przypadkach ALL Ph' dodatnich i „bcr” ujemnych. Croce i wsp. [15] sugerują, że sekwencją tą jest locus „bcr 1”. Wynikiem fuzji c-„abl” z jakąś sekwencją z chromosomu 22 jest nowy mRNA i chimeryczne białko — p 190 wykazujące, podobnie jak p 210 (z CML Ph' do-

datniej), aktywność kinazy tyrozynowej [12, 13, 35, 51]. Nie jest wykluczone, że p 190 ma inną lokalizację w obrębie struktur komórkowych lub działa na inny substrat niż p 210 [51].

Przyjmuje się, że przypadki ALL Ph' dodatnie i „bcr” dodatnie są przełomem limfoblastycznym w przebiegu utajonej klinicznie CML, a transformacja nowotworowa zachodzi na poziomie wielopotencjalnej komórki macierzystej. Przypadki zaś ALL Ph' dodatnie, „bcr” ujemne i p 190 dodatnie są przypadkami de novo, a transformacja nowotworowa ma miejsce na poziomie komórki ukierunkowanej do różnicowania w linię limfoidalną [12, 18].

PIŚMIENICTWO

- [1] ADAMS J. M., Oncogene activation by fusion of chromosomes in leukaemia. *Nature*, **315**: 542 - 543, 1985.
- [2] AXEL R., GULATI S. C., SPIEGELMAN S., Particles containing RNA-instructed DNA polymerase and virus-related RNA in human breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**: 3133 - 3137, 1972.
- [3] BARTRAM C. R., deKLEIN A., HAGEMEIJER A., CARBONELL F., KLEIHAUER E., GROSVELD G., Additional c-„abl”/„bcr” rearrangements in a CML patient exhibiting two Ph' chromosomes during blast crisis. *Leuc. Res.*, **10**: 221 - 225, 1986.
- [4] BARTRAM C. R., deKLEIN A., HAGEMEIJER A., GROSVELD G., HEISTERKAMP N., GROFFEN J., Localization of the human c-„sis” oncogene in Ph'-positive and Ph'-negative chronic myelocytic leukemia by „in situ” hybridization. *Blood*, **63**: 223 - 225, 1984.
- [5] BEN-NERIACH Y., DALEY G. Q., MES-MASSON A.-M., WITTE O. N., BALTIMORE D., The chronic myelogenous leukemia — specific p 210 protein is the product of „bcr”/„abl” hybrid gene. *Science*, **233**: 212 - 214, 1986.
- [6] BIZZOZERO J. O., JOHNSON K. G., CIOCCO A., KAWASAKI S., TOYODA S., Radiation related leukemia in Hiroshima and Nagasaki 1946 - 64. II. Observations on type-specific leukemia, survivorship and clinical behavior. *Ann. Int. Med.*, **66**: 522 - 530, 1967.
- [7] BLICK M., WESTIN E., GUTTERMAN J., WONG STAAL F., GALLO R., MCCREDIE K., KEATING M., MURPHY E., Oncogene expression in human leukemia. *Blood*, **64**: 1234 - 1239, 1984.
- [8] BOS J. L., TAKSOZ D., MARSHALL C. J., VERLAAN-de VRIES M., VEENEMAN G. H., van derEB A. J., vanBOOM J. H., JANSSEN J. W. G., STEENVOORDEN A. C. M., Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-„ras” oncogene in human acute myeloid leukemia. *Nature*, **315**: 726 - 730, 1985.
- [9] BRODSKY I., HUBBELL H. R., STRAYER D. R., GILLESPIE D. H., Implications of retroviral and oncogene activity in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **26**: 15 - 23, 1987.
- [10] BRODSKY I., STRAYER D. H., GILLESPIE D. H., Platelet DNA polymerase levels in CML: Implications for oncogenesis. *Leuc. Res.*, **8**: 761 - 768, 1984.
- [11] CANAANI E., GALE R. P., STEINER-SALTZ D., AGHAI E., BERREBI A.,

- JANUSZEWICZ A., Altered transcription of an oncogene in chronic myeloid leukemia. *Lancet*, 1: 593 - 595, 1984.
- [12] CHAN L. C., KARHI K. K., RAYTER S. I., HEISTERKAMP N., ERIDANI S., POWLES R., LAWLER S. D., GROFFEN J., FOULKES J. G., GREAVES M. F., WIEDEMANN L. M., A novel „abl” protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 325: 635 - 637, 1987.
- [13] CLARK S. S., McLAUGHLIN J., CRIST W. M., CHAMPLIN R., WITTE O. N., Unique forms of the „abl” tyrosine kinase distinguish Ph¹-positive CML from Ph¹-positive ALL. *Science*, 235: 85 - 88, 1987.
- [14] COLLINS S. J., KUBONISHI I., MIOYOSHI I., GROUNDINE M. T., Altered transcription of the c-„abl” oncogene in K 562 and other chronic myelogenous leukemia cells. *Science*, 225: 72 - 74, 1984.
- [15] CROCE C. M., HUEBNER K., ISOBE M., FAINSTAIN E., LIFSHITZ B., SHTIVELMAN E., CANAANI E., Mapping of four distinct „BCR”-related loci to chromosome region 22q11: Order of „BCR” loci relative to chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia breakpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7174 - 7178, 1987.
- [16] CROCE C. M., NOWELL P. C., Molecular basis of human B cell neoplasia. *Blood*, 65: 1 - 7, 1985.
- [17] deKLEIN A., GEURTS vanKESSEL A., GROSVELD G., BARTRAM C. R., HAGEMEIJER A., BOOTSMA D., SPURR N. K., HEISTERKAMP N., GROFFEN J., STEPHENSON J. R., A cellular oncogene (c-„abl”) is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature*, 300: 765 - 767, 1982.
- [18] deKLEIN A., HAGEMEIJER A., BARTRAM C. R., HOUWEN R., HOEFSLOOT L., CARBONELL F., CHAN L., BARNETT M., GREAVES M., KLEIHAUER E., HEISTERKAMP N., GROFFEN J., GROSVELD G., „bcr” rearrangement and translocation of the c-„abl” oncogene in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 68: 1369 - 1375, 1986.
- [19] EMANUEL B. S., NOWELL P. C., CROCE C. M., ISRAEL M. I., Translocation breakpoint mapping: molecular and cytogenetic studies of chromosome 22. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 19: 81 - 84, 1986.
- [20] ERIKSON J., GRIFFIN C. G., ar-RUSHDI A., VALTIERI M., HOXIE J., FINAN J., EMANUEL B. S., ROVERA G., NOWELL P. C., CROCE C. M., Heterogeneity of chromosome 22 breakpoint in Ph-positive acute lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 1807 - 1810, 1986.
- [21] EVA A., PIERCE J., AARONSON S. A., Interactions of oncogenes with hematopoietic cells, [W] *Leukemia — Recent Advances in Biology and Treatment*, Red. R. P. Gale, D. W. Golde, Alan R. Liss, Inc., 28: 3 - 15, 1985.
- [22] EVA A., TRONICK S. R., GOL R. A., PIERCE J. H., AARONSON S. A., Transforming genes of human hematopoietic tumors: Frequent detection of „ras” related oncogenes whose activation appears to be independent of tumor phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4926 - 4930, 1983.
- [23] FRANCIS G. E., MICHALEWICZ R., WICKREMasinghe R. G., Chronic myeloid leukaemia and the Philadelphia translocation: do the c-„sis” oncogene and platelet-derived growth factor provide the link? *Leuk. Res.*, 7: 817 - 820, 1983.
- [24] GALE R. P., CANAANI E., An 8-kilobase „abl” RNA transcript in chronic myelogenous leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 5648 - 5652, 1984.

- [25] GALLO R. C., WONG-STAAAL F., Retroviruses as etiologic agents of some animal and human leukemias and lymphomas and as tools for elucidating the molecular mechanism of leukemogenesis. *Blood*, **60**: 565 - 557, 1982.
- [26] GROFFEN J., HEISTERKAMP N., STEPHENSON J. R., GEURTS vanKESSEL A., deKLEIN A., GROSVELD G., BOOTSMAN D., c-,,"sis" is translocated from chromosome 22 to chromosome 9 in chronic myelocytic leukemia. *J. Exp. Med.*, **158**: 9 - 16, 1983.
- [27] GROFFEN J., STEPHENSON J. R., HEISTERKAMP N., BARTRAM C., deKLEIN A., GROSVELD G., The human c-,,"abl" oncogene in the Philadelphia translocation. *J. Cell. Physiol. Suppl.*, **3**: 179 - 191, 1984.
- [28] GROFFEN J., STEPHENSON J. R., HEISTERKAMP N., deKLEIN A., BARTRAM C. R., GROSVELD G., Philadelphia chromosomal break points are clustered within a limited region „bcr”, on chromosome 22. *Cell*, **36**: 93 - 99, 1984.
- [29] HEISTERKAMP N., GROFFEN J., deKLEIN A., GROSVELD G., Distribution of Ph¹ breakpoints in the „bcr” region on chromosome 22 (abstr.). *J. Cell. Biochem.*, **9a** (suppl. 1): 84, 1985.
- [30] HEISTERKAMP N., STEPHENSON J. R., GROFFEN J., HANSEN P. F., deKLEIN A., BARTRAM C. R., GROSVELD G., Localization of the c-,,"abl" oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, **306**: 239 - 242, 1983.
- [31] KLOETZER W. R., KURZROCK L., SMITH M., TALPAZ M., SPILLER J., GUTTERMAN J., ARLINGHAUS R., The human cellular „abl" gene product in the chronic myelogenous leukemia cell line has an associated tyrosine protein kinase activity. *Virology*, **140**: 230 - 238, 1985.
- [32] KONOPKA J. B., WATANABE S. M., WITTE O. N., An alteration of the human c-,,"abl" protein in K 562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*, **37**: 1035 - 1042, 1984.
- [33] KONOPKA J. B., WITTE O. N., Detection of c-,,"abl" tyrosine kinase activity „in vitro” permits direct comparison of normal and altered „abl" gene products. *Mol. Cell. Biol.*, **5**: 3116 - 3123, 1985.
- [34] KURZROCK R., KLOETZER W. S., TALPAZ M., BLICK M., WALTERS R., ARLINGHAUS R. B., GUTTERMAN J. U., Identification of molecular variants of p 210 „bcr”-,,"abl" in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, **70**: 233 - 236, 1987.
- [35] KURZROCK R., SHTALRID M., ROMERO P., KLOETZER W. S., TALPAS M., TRUJILLO J. M., BLICK M., BERAN M., GUTTERMAN J. U., A novel c-,,"abl" protein in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, **325**: 631 - 635, 1987.
- [36] MAVILIO F., SPOSI N. M., PETRINI M., BOTTERO L., MARINUCCI M., DeROSSI G., AMADORI S., MANDELLI F., PESCHLE C., Expression of cellular oncogenes in primary cells from human acute leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 4394 - 4398, 1986.
- [37] McBRIDGE D. W., HIETER P. A., HOLLIS G. F., SWAN D., OTEY M. C., LEDER P., Chromosomal location of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes. *J. Exp. Med.*, **155**: 1480 - 1490, 1982.
- [38] McLAUGHLIN J., CHIANESE E., WITTE O. N., „In vitro” transformation of immature hematopoietic cells by the p 210 „BCR”/„ABL" oncogene product of the Philadelphia chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6558 - 6562, 1987.

- [39] MORGAN D. A., BRODSKY I., Novel peripheral blood-derived human cell lines with properties of megakaryocytes. *J. Cell. Biol.*, **100**: 565 - 573, 1985.
- [40] MORRIS C. M., REEVE A. E., FITZGERALD P. H., HOLLINGS P. E., BEARD M. E. J., HEATON D. C., Genomic diversity correlates with clinical variation in Ph⁻negative chronic myeloid leukaemia. *Nature*, **320**: 281 - 283, 1986.
- [41] PIERCE J. H., EVA A., AARONSON S. A., Interactions of oncogenes with haematopoietic cells. *Clin. Haematol.*, **15**: 573 - 596, 1986.
- [42] ROMERO P., BLICK M., TALPAZ M., MURPHY E., HESTER J., GUTTERMAN J., C-„sis” and c-„abl” expression in chronic myelogenous leukemia and other hematologic malignancies. *Blood*, **67**: 839 - 841, 1986.
- [43] ROSENFELD M., KEATING A., BOWEN-POPE D. F., SINGER J. W., ROSS R., Responsiveness of the „in vitro” hematopoietic microenvironment to platelet-derived growth factor. *Leuk. Res.*, **9**: 427 - 434, 1985.
- [44] SARNGADHARAN M. G., SARIN P. S., REITZ M. S., GALLO R. C., Reverse transcriptase activity of human acute leukemia cells: Purification of the enzyme, response to AMV, 70 S RNA, and characterization of the DNA product. *Nature*, **240**: 67 - 72, 1972.
- [45] SHTIVELMAN E., LIFSHITZ B., GALE R. P., CANAANI E., Fused transcript of „abl” and „bcr” genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*, **315**: 550 - 554, 1985.
- [46] SILVER R. T., GALE R. P., Chronic myeloid leukemia. *Amer. J. Med.*, **80**: 1137 - 1148, 1986.
- [47] STRAYER D. R., BRODSKY I., CARANIA M. H., GILLESPIE D. H., Quantitation of RNA-dependent platelet DNA polymerase activity in patients with myeloproliferative disorders. *Br. J. Haemat.*, **50**: 521 - 530, 1982.
- [48] SUNAMI S., FUSE A., SIMIZU B., EGUCHI M., HAYASHI Y., SUGITA K., NAKAZAWA S., OKIMOTO Y., SATO T., NAKAJIMA H., The c-„sis” gene expression in cell from a patient with acute megakaryoblastic leukemia and Down's syndrome. *Blood*, **70**: 368 - 371, 1987.
- [49] TEYSSIER J. R., BARTRAM C. R., DEVILLE J., POTRON G., PIGEON F., c-„abl” oncogene and chromosome 22 „bcr” juxtaposition in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.*, **312**: 1393 - 1394, 1985.
- [50] VIOLA M. V., FRAZIER M., WIERNIK P. H., McCREDIE K. B., SPIEGELMAN S., Reverse transcriptase in leukocytes of leukemic patients in remission. *N. Engl. J. Med.*, **294**: 75 - 80, 1976.
- [51] WALKER L. C., GANESAN T. S., DHUT S., GIBBONS B., LISTER T. A., ROTHBARD J., YOUNG B. D., Novel chimaeric protein expressed in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, **329**: 851 - 853, 1987.
- [52] WESTIN E. H., WONG-STAAAL F., GELMAN E. P., DALLA-FAVERA R., PAPAS T., LAUTENBERGER J. A., EVA A., REDDY E. P., TRONICK S. R., AARONSON S. A., GALLO R. C., Expression of cellular homologue of retroviral oncogenes in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 2490 - 2494, 1982.

Otrzymano: 2 listopada 1987.

Przyjęto: 10 stycznia 1988.

Adres autorki: ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin.

NABYTY ZESPÓŁ NIEDOBORU IMMUNOLOGICZNEGO (AIDS)
W ŚWIETLE NAUK BIOLOGICZNYCH *

ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROME (AIDS);
BIOLOGICAL APPROACH

Zofia KILIAŃSKA

Zakład Cytobiochemii, Instytut Biochemii UŁ, Łódź

Streszczenie. Artykuł obejmuje przegląd piśmiennictwa dotyczący molekularnej organizacji wirusa HIV, etiologicznego czynnika nabytego zespołu niedoboru immunologicznego (AIDS). Przedstawiono poznane dotąd składniki genomu wirusa HIV i kodowane przez nie produkty białkowe oraz ich rolę w patogenezie zespołu AIDS. Przedyskutowano zagadnienie leczenia i profilaktyki AIDS.

Summary. This paper is the review of the data concerning molecular organization of HIV virus, the ethiological agent of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). The article describes known genes of HIV virus and the proteins coded by them as well as their role in the pathogenesis of AIDS. The problem of drugs treatment and prophylaxis against AIDS is briefly discussed.

WSTĘP

Na początku lat osiemdziesiątych [46, 51] pojawiły się opisy zakaźnej choroby związanej z głęboką depresją układu immunologicznego, tj. nabytego zespołu niedoboru immunologicznego AIDS. Od przełomu lat 1983/1984 wiadomo, że czynnikiem etiologicznym zespołu AIDS są retrowirusy wykryte w tym samym czasie przez dwa wiodące zespoły wirusologów, kierowane przez Luca Montagniera z Instytutu Pasteura w Paryżu [12] i Roberta Gallo z Narodowego Instytutu Badań nad Rakiem w Bethesda (USA) [104]. Tabela 1 przedstawia nazwy ściśle spo-

* Praca wykonana w ramach CPBR 11.5.

TABELA 1

Nomenklatura retrowirusów wywołujących zespół AIDS

Skrót	Nazwa angielska	Dane literaturowe
LAV	Lymphadenopathy Associated Virus	Montagnier i wsp. 1983 r. [12]
HTLV-III	Human T-Lymphotropic Virus type III	Gallo i wsp. 1984 r. [104]
ARV	AIDS Associated Retrovirus	Levy i wsp. 1984 r. [82]
PGL	Persistent Generalized Lymphadenopathy	Dalgleish i wsp. 1984 r. (27)
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Nazwa zalecana przez Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (cyt. Palca, 1986 r. [102])

krewnionych wirusów wywołujących AIDS, stosowane w literaturze przedmiotu przez różnych badaczy. Wirusy te wykazują identyczną organizację materiału genetycznego, aczkolwiek występują w nich różnice sekwencyjne nawet do 25% [25, 107, 127]. W maju 1986 r. tygodnik *Nature* na wniosek Międzynarodowego Komitetu Taksonomii Wirusów wprowadził dla czynnika etiologicznego AIDS nazwę Human Immunodeficiency Virus — HIV [102].

Z uwagi na występowanie w Afryce innych retrowirusów, wywołujących zespół niedoboru immunologicznego, komplikujących obraz epidemiologiczny AIDS, przyjęto skrót HIV-1 dla retrowirusów związanych z AIDS w krajach Europy Zachodniej, Stanach Zjednoczonych i w części państw afrykańskich (na podstawie analizy sekwencyjnej genu), a HIV-2 i HTLV-4 dla wirusów spotykanych jak dotąd w zachodniej i centralnej Afryce. W niniejszym artykule przedstawiono badania dotyczące głównie retrowirusów HIV-1.

1. OBRAZ KLINICZNY I IMMUNOPATOGENEZA ZESPOŁU AIDS

Z dotychczasowych danych wynika, że wirus HIV zostaje przenoszony głównie przez krew. Do infekcji dochodzi poprzez: kontakty płciowe, wielokrotne używanie igieł do iniekcji narkotyków, transfuzje krwi, stosowanie krwiopochodnych preparatów, np. czynnik VIII, oraz infekcje płodu [42]. Należy również odnotować fakty sygnalizujące przeniesienie wirusa przy sztucznym zapładnianiu kobiet [132]. Początkowo uważano AIDS za chorobę homoseksualistów. Należą oni rzeczywiście do podstawowej grupy ryzyka (obok narkomanów, biorców krwi i preparatów krwiopochodnych, partnerów osobników o orientacji biseksualnej oraz dzieci matek zainfekowanych AIDS), ale dotyczy to krajów Euro-

py Zachodniej i USA [42, 48]. W Afryce, gdzie choruje najwięcej ludzi, szczególnie w centralnych i zachodnich regionach kontynentu, a stopień zachorowań osiąga 550 - 1000 przypadków na 1 milion mieszkańców, AIDS jest przenoszony drogą heteroseksualną [106].

W patogenezie zespołu AIDS największe znaczenie przypisuje się T-limfocytotropowej infekcji wirusowej, która powoduje spadek liczby limfocytów pomocniczych o fenotypie OKT4, w których przebiega ekspresja antygeny CD4 [3, 12, 27, 43, 69, 70, 72, 95, 104, 140]. Ten efekt wiąże się przede wszystkim ze zmniejszoną biosyntezą białka z grupy limfokiny, tj. interleukiną-2 w odpowiedzi na bodźce antygenowe [33, 83, 134, 142]. Z kolei produkcja interleukiny-2 jest jednym z pierwszych i podstawowych etapów niezbędnych do właściwej proliferacji i ekspresji klonów limfocytów T wszystkich podgrup, czyli odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego. Właściwy poziom tej limfokiny warunkuje również odpowiedź immunologiczną typu humoralnego, czyli produkcję przeciwciał. Wskutek niskiego poziomu limfocytów T4 dochodzi do zaburzenia sterowania czynnością limfocytów linii B. Układ odporności humoralnej często odpowiada pobudzeniem na bodźce antygenowe, działając niejako „na opak”, bez podporządkowania się ogólnemu planowi obrony immunologicznej. Dochodzi do produkcji przeciwciał w sposób chaotyczny i często niewłaściwie skierowanych, np. przeciwko własnym komórkom ustroju. Defektowi ilościowemu limfocytów T4 towarzyszą zmiany innych komponentów zapewniających homeostazę immunologiczną ustroju. Obserwuje się wzrost aktywacji limfocytów B, spadek aktywności komórek „natural killer” i limfocytów cytotoksycznych, osłabioną hemotaksję monocytów i makrofagów oraz zmniejszoną ich zdolność w niszczeniu mikroorganizmów [13, 33]. Z ostatnich wyników Berman i wsp. [13] wynika, że osłabiona produkcja interleukiny-1 przez monocyty, typowa dla zespołu AIDS, jest spowodowana wysoką aktywnością inhibitorów tej limfokiny (szczególnie frakcji o masie cząsteczkowej 6000 - 9000). Wydaje się, że ten inhibitor może blokować dojrzewanie limfocytów T zależnie od interleukiny-1, przyczyniając się przez to do pogłębienia niedoboru immunologicznego. Atak wirusa HIV znosi bariery odpornościowe, jakie działają w zdrowym organizmie, w wyniku czego dochodzi w nim do ujawnienia się infekcji oportunistycznych, często endogennego pochodzenia (por. [79, 121]). Te infekcje wywołane przez pierwotniaki, grzyby, wirusy czy bakterie występują wielokrotnie, wyniszczając organizm (tab. 2).

W przebiegu AIDS można wyróżnić 3 stadia: bezobjawowe, prodromalne (pre-AIDS; ARC-AIDS related complex) oraz pełnoobjawowe (por. [121, 122]). Postępującej chorobie towarzyszy istotny spadek stosunku limfocytów T4/T8 z około $2,0 \pm 0,3$ — typowego dla zdrowych

TABELA 2

Mikroorganizmy wywołujące infekcje oportunistyczne, typowe dla zespołu AIDS

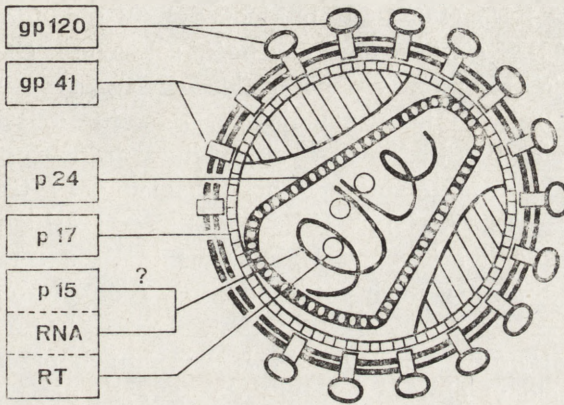
Pierwotniaki	<i>Pneumocystis carinii</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Cryptosporidium enteritis</i> , <i>Giardia lamblia</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> i inne
Grzyby	<i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Aspergillus</i> i inne
Wirusy	Cytomegalowirus (CMV), wirus Epsteina-Barr (EBV), <i>Herpes simplex</i> typu 1 i 2, wirus zapalenia wątroby typu B (HSB), adenowirusy i inne
Bakterie	<i>Salmonella</i> , <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Nocardia asteroides</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> i inne

ludzi, do 0,7 - 0,9 w stadium bezobjawowym; 0,4 - 0,6 — dla pre-AIDS i dramatycznie niskiego, tj. 0,01 - 0,3 w przypadku pełnoobjawowej postaci AIDS [4, 35, 51]. W stadium prodromalnym obserwuje się powiększenie węzłów chłonnych, biegunki, osłabienie, nocne pocenie, wysoką temperaturę oraz postępującą utratę wagi ciała. W stadium pełnoobjawowym te symptomy nasilają się i dodatkowo występują wyniszczające ustrój infekcje oportunistyczne. Infekcje te dotyczą przede wszystkim jamy ustnej i przewodu pokarmowego, płuc, układu nerwowego i moczopłciowego [133, 139]. Ponadto często odnotowuje się nietypowe nowotwory, np. mięsak Kaposiego czy chłoniaki ośrodkowego układu nerwowego [5, 42]. Rozwojowi choroby towarzyszy osłabiona ekspresja receptora interleukiny-2, spadek zawartości interferonu gamma [33, 99, 134], pojawienie się kwasolabilnego interferonu alfa, przeciwciał antylimfocytarnych i krążących kompleksów immunologicznych [47, 72] oraz wzrost peptydów grasiczych — tymozyny α_1 [58, 100, 101] i β_4 [101]. Na uwagę zasługuje obecność w osoczu chorych na AIDS zasadowych białek o masie cząsteczkowej około 90 000 i 27 000 [29].

Obecnie uważa się, że wirus wywołujący AIDS wykazuje również neurotropizm [14, 60]. U chorych następuje często uszkodzenie układu nerwowego, które może być wynikiem bezpośredniego namnażania się wirusa, np. w komórkach glejowych, makrofagach, limfocytach czy też wskutek infekcji oportunistycznych [5, 74]. Wirusy HIV preferują limfocyty T4, ale mogą również atakować komórki linii monocyty-makrofagi, płytki krwi a nawet limfocyty B, które mogą stawać się niejako ich rezerwuarem [74, 80, 95]. Obecność wirusa HIV stwierdzono w krwi, węzłach chłonnych, szpiku, nasieniu, łzach, ślinie i wydzielinie pochwy chorych na AIDS [26, 46, 87, 137, 140]. Identyfikację wirusa w materiale biologicznym przeprowadza się za pomocą: wykrywania antygenów wirusowych, oznaczania aktywności odwrotnej transkryptazy zależnej od jonów Mg^{2+} oraz analizy pod mikroskopem elektronowym.

2. STRUKTURALNA I GENETYCZNA ORGANIZACJA WIRUSA HIV

Na podstawie technik ultracienkich skrawków i powierzchniowej repliki połączonych z immunomikroskopią elektronową Gelderblom i wsp. [47] zaproponowali ostatnio model strukturalnej organizacji wirusa HIV (ryc. 1). Zdaniem tych badaczy wirus HIV wykazuje wiele



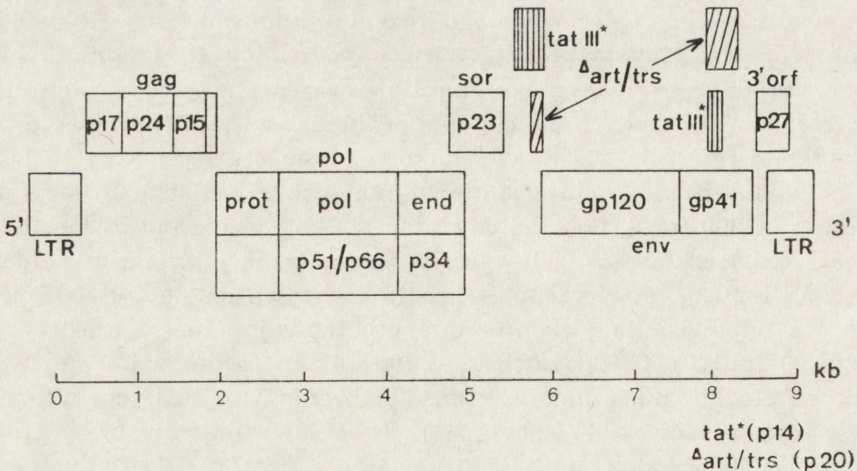
Ryc. 1. Model strukturalnej organizacji cząstki wirusa HIV [47], RT — odwrotna transkryptaza

cech podrodziny retrowirusów *Lentivirinae*, głównie przez obecność w nim wydłużonego, pałeczkowatego rdzenia zbudowanego z nukleoidu i osłonki rdzenia. Kulista cząstka wirusa o średnicy 100-120 nm [43, 96], pokryta dwuwarstwową otoczką lipidową, pochodzącą z błon komórek gospodarza, zawiera dwie kopie jednoniciowego RNA zasocjowane z białkami (głównie zasadowe białko o masie cząsteczkowej 15 000) [140]. Osłonkę rdzenia buduje silnie immunogenne białko o masie cząsteczkowej 24 000 (p24), podczas gdy inne białko rdzenia opisywane jako p17 (masa cząsteczkowa 17 000) wyściela wewnętrzną powierzchnię otoczki wirusa. Kulistą powierzchnię cząstki pokrywa około 70-80 guzków, które odpowiadają glikoproteinie otoczkowej o masie cząsteczkowej 120 000 (gp120). Guzki te mają około 15 nm średnicy i 9 nm wysokości; są luźno połączone z transmembranowym białkiem otoczki o masie cząsteczkowej 41 000 (gp41). Procesowi dojrzewania wirusa HIV towarzyszy spadek liczby guzkowatych tworów. Wirus zawiera wiele kopii swoistej RNA-zależnej polimerazy DNA, zwanej odwrotną transkryptazą.

2.1. GENOM WIRUSA HIV I JEGO PRODUKTY BIAŁKOWE

W 1985 roku kilkunastoosobowy zespół Gallo [108] jako pierwszy określił w genomie wirusa HIV, długości 9749 nukleotydów, położenie trzech znanych u pozostałych retrowirusów genów gag, pol, env oraz sekwencji regulatorowych LTR (Long Terminal Repeats), znajdujących się przy 5' i 3' końcu RNA, odpowiedzialnych za ekspresję genów wirusa i jego integrację z komórką docelową. Niekodujące sekwencje LTR wirusa HIV zawierają region R (78 nukleotydów) otoczony unikatowymi sekwencjami U3 i U5 (483 i 103 nukleotydy). W regionie LTR czynnika etiologicznego AIDS stwierdzono obecność sekwencji GGGACTTCCA, które występują również w materiale genetycznym wirusa SV-40, stanowiąc tzw. sekwencje wzmacniające. Ponadto opisano w odcinku LTR miejsca wiązania białkowego aktywatora transkrypcji SP1, który wiąże się do układu nukleotydów bogatych w pary G-C, w rejonie poprzedzającym „TATA box” [16]. Na uwagę zasługuje doniesienie o znacznej homologii sekwencji LTR wirusa HIV z regionami kontrolującymi sekwencji w genach interleukiny-2 i interferonu gamma [78, 88].

Rycina 2 jest próbą syntezy danych uzyskanych przez kilka laboratoriów na świecie w okresie od 1984 do 1987 r., dotyczących genomu wirusa HIV oraz produktów jego translacji [3, 53, 86, 94, 97, 108, 120, 138]. W genomie tego wirusa poza konwencjonalnymi genami gag, pol i env (zajmujących pozycje 310 - 1869, 1629 - 4673 i 5781 - 8369), kodujących odpowiednio białka rdzenia, odwrotną transkryptazę i glikopro-



Ryc. 2. Struktura genomu wirusa HIV (zmodyfikowany model Mitsuya i Brodera [94])

teiny otoczkowe, zidentyfikowano pięć dodatkowych genów. Są to: sor (short open reading frame), tat III (transactivator), art (anti-repressor of transcription), 3'orf (3'-open reading frame) oraz ostatnio opisany gen R [1, 6, 37, 65, 81, 89, 112, 123, 124, 138].

Techniki immunologiczne przyczyniły się do scharakteryzowania produktów białkowych kodowanych przez poznane geny wirusa HIV. Otrzymano przeciwciała monoklonalne przeciwko antygenom wirusowym, a potem użyto je do wydzielenia i oczyszczenia antygenów, aby z kolei zidentyfikować geny, które kodują poszczególne antygeny. Te przeciwciała umożliwiły poznanie białek prekursorowych wirusa i mechanizmu ich „dojrzwania” oraz oznaczenie ich struktury pierwszorzędowej [116, 119].

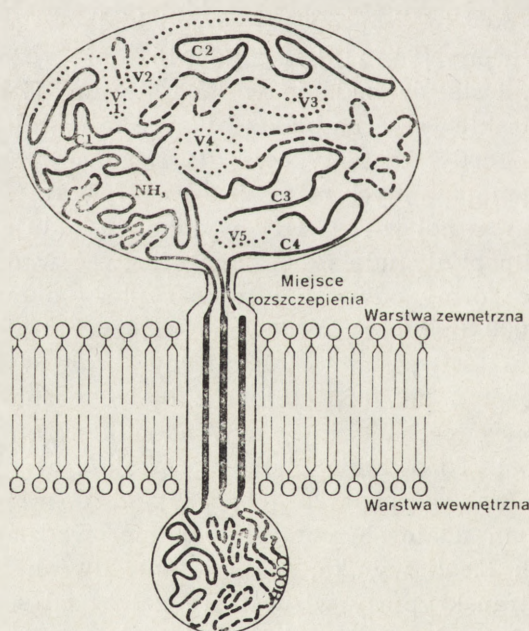
2.1.1. Geny strukturalne wirusa HIV i ich produkty białkowe

Gen gag koduje białko prekursorowe o masie cząsteczkowej 53 000 (p53) [78, 115, 119]. Według Robeya i wsp. [111] białka p70 i p55 stanowią pierwotne produkty tego genu. „Dojrzwianie” białek rdzenia wirusowego, związane z jego proteolizą, dostarcza trzech polipeptydów, tj. p17, p24 (główny składnik rdzenia) i p15, stanowiących odpowiednio N-końcowy, środkowy i C-końcowy fragment białkowego produktu genu gag dojrzałego wiriona [64, 116]. Białko p15 może rozpadać się, dając peptydy p9 i p7. Ostatnie badania w laboratorium Gallo [116] wykazały, że cechą charakterystyczną białka p17 jest mirystylacja jego N-końcowej glicyny — modyfikacja typowa dla N-końcowych peptydów kodowanych przez gen gag innych retrowirusów [57, 118].

Z prac nad genem pol wirusa HIV wynika, że koduje on cztery białka [34]. Trzy polipeptydy udało się zidentyfikować w dojrzałych wirionach. Są to dwie formy odwrotnej transkryptazy o masie cząsteczkowej 66 000 i 51 000 (p66/p51), kodowane przez centralny region genu pol, różniące się właściwościami molekularnymi, ale wykazujące wspólny N-końcowy peptyd [32, 85, 116] oraz białko o masie 34 000 (p34), stanowiące enzym o cechach integrazy/endonukleazy, kodowane przez 3' koniec genu pol. To ostatnie białko uczestniczy w integracji wirusa z genomem komórek gospodarza [85, 129]. Z doświadczeń Farmerie i wsp. [34], którym udało się pomyślnie przeprowadzić ekspresję genu pol w komórkach *E.coli* wynika, że powstanie dwóch form molekularnych odwrotnej transkryptazy wirusa HIV zależy od sekwencji nukleotydowych w 5' domenie genu pol, kodujących czwarty polipeptyd — proteazę (podobnie jak w retrowirusach ptaków i ssaków). Początkowo oszacowana masa cząsteczkowa odwrotnej transkryptazy około 95 000 - 98 000 uległa weryfikacji [18] dzięki badaniom immunologicznym. Biał-

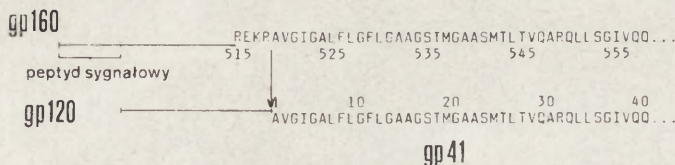
ko enzymatyczne o takiej masie, otrzymane w toku sączenia na Ultra-gel AcA44, okazało się kompleksem enzymu polimeryzującego p66/p53 z glikoproteiną otoczki wirusa gp41 [19]. Odwrotna transkryptaza przejawiająca aktywność wyłącznie w obecności jonów Mg^{2+} (optimum: 5 mM, pH 7,8) rozdziela się podczas ogniskowania izoelektrycznego na składowe o pI 5,75 i 6,25 [18].

Dotychczas najlepiej poznano gen env wirusa wywołującego AIDS oraz kodowane przez niego białka [7, 111, 127, 128]. Gen ten zawiera 2619 nukleotydów, zatem jego potencjalna możliwość kodująca wynosi 873 aminokwasy [127]. W genie env w pozycji 8 lub 9 występuje kodon inicjujący dla metioniny, po którym w pozycjach 17-37 znajdują się kodony dla tzw. peptydu sygnałowego, bogatego w aminokwasy hydrofobowe, który w procesie „dojrzewania” białek ulega odłączeniu. Bezpośrednim produktem translacji tego genu jest bogato glikozylowane białko otoczki o masie cząsteczkowej 160 000 (gp160) [17, 54]. Stwierdzono, że łańcuch polipeptydowy gp160 zawiera pewne stałe, konserwatywne regiony występujące u wszystkich poznanych szczepów wirusa, obok fragmentów o średniej i dużej zmienności (ryc. 3). Glikoproteina ta jest prekursorem dwóch podjednostek budujących otoczkę,



Ryc. 3. Model glikoproteiny otoczki wirusa HIV (za zgodą autora [46]). Regiony konserwatywne (—), umiarkowanie zmienne (- - -) i zmienne (.....). Zaznaczono miejsce rozszczepienia glikoproteiny gp160 na dwie podjednostki: białko zewnętrzno-otoczkowe gp120 i białko transmembranowe gp41

tj. zewnątrzotoczkowego białka gp120 i transmembranowego białka gp41. Procesowi „dojrzwania” gp160 towarzyszy rozszczepienie łańcucha między Arg⁵¹⁸ i Ala⁵¹⁹ pierwotnego produktu kodowanego przez gen env (ryc. 4). Miejsce rozszczepienia poprzedza hydrofilowy region boga-



Ryc. 4. Schemat „dojrzwania” pierwotnego produktu białkowego genu env [31] wirusa HIV. Aminokwasy: A — alanina, F — fenyloalanina, G — glicyna, I — izoleucyna, K — lizyna, L — leucyna, M — metionina, Q — glutamina, R — arginina, S — seryna, T — treonina i V — walina

ty w argininę w białku zewnątrzotoczkowym, po którym następuje przejście w długi region hydrofobowy, charakterystyczny dla białka transmembranowego, stanowiącego C-końcowy peptyd genu env [31, 127]. Białka otoczkowe wirusa HIV charakteryzuje wysoka zawartość cysteiny (18 reszt w gp120 i 1-5 reszt w gp41), która zajmuje konserwatywne położenie wśród dotychczas zsekwencjonowanych bądź oznaczonych na podstawie znanej sekwencji nukleotydowej preparatów. Aminokwas ten jest zapewne ważny dla utrzymania właściwej struktury białek otoczkowych. W glikoproteinach otoczki wirusa HIV występuje 22 - 29 potencjalnych miejsc glikozylacji.

W surowicy chorych na AIDS występują zwykle przeciwciała skierowane przeciwko gp160, gp120 i gp41 [2, 31, 115]. Główne pasmo antygenowe stanowi zwykle białko gp41 [115].

Porównawcza analiza sekwencji genomu indywidualnych preparatów wirusa HIV, pochodzących z hodowli limfocytów czy wydzielonych z krwi pacjentów zainfekowanych AIDS, dowodzi najwyższego stopnia zmienności w genie env (do 25%), szczególnie w jego regionie kodującym białko gp120 [17, 107, 127, 128, 130]. Zmienność ta jest wynikiem mutacji punktowych, delecji, insercji czy duplikacji nukleotydów.

Przedstawiono wiele dowodów przemawiających za tym, że wnikiwanie wirusa HIV do komórek docelowych zależy od interakcji między stałymi regionami glikoproteiny gp120 i cząsteczkami antygeny CD4 o masie cząsteczkowej 62 000 (lub 58 000) w ich błonie [27, 30, 62, 71, 84, 117]. Klatzmann i wsp. [71] wykazali, że inkubacja limfocytów T4 z przeciwciałami przeciwko glikoproteinie CD4 tych komórek blokuje ich infekcję wirusem HIV. Udział białek otoczki wirusa w cytopatogenezie AIDS nie ulega wątpliwości. In vitro tworzenie wielojądrowych komórek (syncycjów) w zainfekowanych wirusem hodowlach wydaje

się być wynikiem fuzji zależnej od obecności powierzchniowego antygenu CD4 limfocytów pomocniczych i jego interakcji z glikoproteiną otoczkową wirusa [41, 62, 91, 125]. Lifson i wsp. [84] stwierdzili, że rekombinant wirusa ospy krowiej, zawierający gen glikoproteiny gp120 wirusa HIV, w nieobecności pozostałych genów białek strukturalnych i regulatorowych był zdolny indukować zależną od antygeny CD4 fuzję limfocytów T4, prowadząc do ich degeneracji i śmierci. Syncycja nie tworzą się w komórkach linii T, nie zawierających antygeny CD4, a także w obecności przeciwciał przeciwko glikoproteinie CD4 [125]. Ostatnio zwrócono również uwagę na udział białka gp41 w cytopatogenezie zainfekowanych wirusem HIV komórek. Fischer i wsp. [38] otrzymali wariant wirusa HIV z delecją segmentu 200 nukleotydów w 3' regionie jego genomu, obejmującego część genu dla białka gp41, który utracił cechy uśmiercania komórek, przy zachowanej zdolności wirusa do replikacji. Te wyniki wydają się tłumaczyć zjawisko występowania, jak dotąd niepatogennego, wirusa HTLV-4 wśród ludzi zamieszkujących zachodnie regiony Afryki [67] oraz retrowirusa STLV-3 u małp afrykańskich [28, 66], w których genomie kodon „stop” znajduje się w części genu env, kodującego białko transmembranowe gp41. Być może skrócenie białka gp41 może prowadzić do zmian w postaci utraty efektów cytopatycznych tych retrowirusów [59, 90].

Bardzo sugestywna wydaje się hipoteza immunosupresji komórek T przez wirus HIV, wynikająca z możliwości wiązania się białka gp41 z receptorem dla interleukiny-2, co prowadziłoby do zablokowania ich interakcji z interleukiną-2 [109].

Gallo [46] sugeruje, że w czasie „pączkowania” wirusa HIV z limfocytów następuje interakcja glikoprotein otoczkowych z antygenem powierzchniowym CD4, doprowadzająca do powstawania licznych otworów w ich błonach. Z uwagi na masowy charakter „dziurawienia” błon i niezdolności do błyskawicznej ich naprawy, dochodzi do wycieku zawartości komórek i ich śmierci. Okazało się, że białko gp120 może doprowadzać do lizy nie tylko zainfekowane komórki, ale również wolne od wirusów [125].

2.1.2. Niestrukuralne geny wirusa HIV i ich produkty białkowe.

Uważa się, że nietypowe dla retrowirusów geny tatIII, art, sor i 3'orf kodują białka, które są zaangażowane w kontrolę ekspresji genów wirusa [44, 45]. Geny tatIII i art są zaliczane do genów transaktywacji, których działanie dotyczy aktywacji transkrypcji innych genów nie znajdujących się w ich bezpośrednim sąsiedztwie [94, 112]. Gen tatIII tworzą trzy eksony, z których pierwszy jest niekodujący, drugi —

istotny dla transaktywacji (leży między genami *src* i *env*) koduje 72-aminokwasowy bogaty w cysteinę peptyd, oraz trzeci — zlokalizowany wewnątrz genu *env* — produkuje krótki, 14-aminokwasowy fragment [6, 37, 112, 123, 141]. Produkt genu *tatIII*, bogaty w aminokwasy zasadowe, wędruje w żelu poliakryloamidowym w postaci pasma odpowiadającego masie cząsteczkowej 14 000 (p14). Białko to powoduje wzrost produktów transkrypcji genów strukturalnych wirusa HIV poprzez oddziaływanie z sekwencjami regulatorowymi LTR (w odcinku R) [112], a także wpływa na stabilność RNA i prawdopodobnie na efektywność translacji wirusowego mRNA [46, 94]. Gen ten jest prawdopodobnie nieodzowny dla replikacji wirusa. Z doświadczeń wynika, że mutacja w pobliżu dwóch kodujących eksonów [124] bądź delecja genu *tatIII* [37] dramatycznie zmniejsza zdolność wirusa do ekspresji białek strukturalnych i jego replikacji. Wong-Staal przedstawiła wyniki potwierdzające, że produkt genu *tatIII*, działający posttranslacyjnie, powoduje wzrost wydarzeń transkrypcyjnych i translacyjnych, co wiąże się bezpośrednio z jego ilością [89]. Przy niewielkich ilościach białka p14 dominuje wpływ na transkrypcję, przy większych zaś na stymulację transkrypcji i translacji.

W 1986 roku okazało się [6, 35, 124], że nowo poznany gen *art* wirusa HIV, wykorzystujący mRNA, kodujący *tatIII* ze zmienioną „ramką odczytu”, produkuje zasadowe białko zbudowane ze 116 aminokwasów (pierwszy ekson — 25, a drugi — 91 aminokwasów), nieodzowne do procesu transaktywacji wirusa. Przy braku tego czynnika regulatorowego synteza białek strukturalnych wirusa jest kilkakrotnie niższa. Gen regulatorowy *art* bez wątplenia jest potrzebny do replikacji wirusa, ale mechanizm działania jego produktu jest kontrowersyjny. Odkrywcy genu *art* [124] uważają, że jego produkt wpływa na znoszenie hamowania translacji wirusowego mRNA, kodującego białka strukturalne wirusa, skąd jego nazwa *art*, tj. anti-repression transactivator. „Niedojrzały” mRNA białek strukturalnych wirusa HIV zawiera sekwencje regulatorowe, które hamują syntezę tych białek, jeśli ich efektowi nie przeciwdziała produkt genu *art*. Białko to zatem znosi efekty represji sekwencji hamujących mRNA [89].

Feinberg i wsp. [35] sugerują, że produkt tego genu regulatorowego utrzymuje w równowadze ilość „niedojrzałego” i „dojrzałego” wirusowego RNA, zabezpieczając mRNA genów *gag*, *pol* i *env*, skąd alternatywna nazwa tego genu stosowana przez laboratorium Gallo — *trs* — trans-acting regulator of splicing [35, 46]. Mutacje w genie *art/trs* znoszą zdolność syntezy genów strukturalnych [35].

W 1987 roku w laboratorium Haseltine [50] udało się dokonać ekspresji genu *art* w komórkach *E.coli*. Produkt tego genu — białko o ma-

sie cząsteczkowej około 20 000 było rozpoznawane przez surowice pacjentów z AIDS. Zsyntetyzowane w bakteriach białko współzawodniczy w reakcjach immunologicznych z białkiem o analogicznej masie cząsteczkowej w zainfekowanych wirusem HIV limfocytach T4. Na podkreślenie zasługuje fakt, że przeciwciała otrzymane przeciwko syntetycznemu oligopeptydowi, odpowiadającemu początkowym sekwencjom kodowanym przez drugi ekson genu *art* (Arg-Arg-Asn-Arg-Arg-Arg-Arg-Trp-Arg-Glu-Arg-Gln-Arg-Gln), precypitują białko o masie 20 000 zainfekowanych komórek.

Knight i wsp. [73] również uzyskali ekspresję genu *art/trs* w komórkach ssaczy. Otrzymane tą drogą białko o masie cząsteczkowej 19 000 reagowało z surowicą chorych na AIDS. Badacze ci podkreślają, że produkty genów transaktywacji — *tatIII* i *art/trs* wydają się nieodzowne do syntezy glikoproteiny otoczkowej wirusa HIV gp120 oraz jej mRNA.

Z dotychczasowych badań nad genomem wirusa HIV wynika [39, 65], że *sor* należy do najbardziej konserwatywnych genów. Buduje go 609 nukleotydów, a jego produkt translacji stanowi białko o masie cząsteczkowej 23 000 (p23). Wydaje się, że gen ten warunkuje efektywną transmisję wirusa HIV [39]. Usunięcie lub skrócenie genu *sor* powoduje w potomstwie wirusa zmniejszoną ponad 100 razy zdolność do infekcji komórek zawierających antygen CD4. Fischer i wsp. [39] rozważają, że gen ten może odgrywać rolę strukturalną jako „wtórna błona” cząstki wiriona, wymagana do transmisji, aczkolwiek produkt tego genu występuje w znacznie mniejszych ilościach niż np. białka otoczkowe gp120 i gp41. Nie wyklucza się również, że *sor* (lub jego produkt) może brać udział we wczesnych etapach replikacji (od penetracji do syntezy pro-wirusowego DNA) bądź w przygotowaniu środowiska komórki, w którym przebiega replikacja.

Kolejny gen 3'orf jest usytuowany w genomie wirusa HIV po genie *env* (ryc. 2), a blisko połowa jego sekwencji mieści się wewnątrz odcinka U3 sekwencji 3'LTR [1, 81]. Gen ten koduje białko o masie cząsteczkowej 27 000 (p27), którego cechą charakterystyczną jest mirystylacja jego N-końcowego aminokwasu [1]. Delecja w genie 3'orf (między 55 a 109 nukleotydem) prowadzi do powstania silnie cytopatycznego wariantu wirusa, co przemawia za tym, że gen ten nie jest istotny do wywoływania cytopatycznych efektów wirusa HIV [38]. Z ostatnich doniesień na VII Kongresie Hybrydoma/DNA w San Francisco wynika, że usunięcie segmentu 3'orf z genomu wirusa HIV powoduje 5 - 10-krotny wzrost jego replikacji (Luciw, cyt. [89]). Działanie tego genu może być związane z utrzymywaniem długiego okresu latencji wirusa w zainfekowanym ustroju.

Jak dotąd najmniej wiadomo o genie R, opisanym przez Wain-Hobson i wsp. [138]. Gen ten jest umiejscowiony między genami sor i tatIII. Wydaje się, że reprezentuje on znaczną konserwatywność sekwencji nukleotydowych [59]. Nie poznano dotychczas białkowego produktu tego genu.

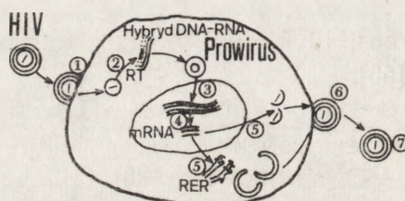
Techniki molekularnego klonowania, mapowania enzymami restrykcyjnymi oraz sekwencjonowania materiału genetycznego wirusa HIV, wydzielonego z zainfekowanych komórek linii T bądź z limfocytów chorych na AIDS, dowodzą jego wysokiej zmienności. Najwyższą zmienność sekwencji nukleotydowych obserwowano w genie env. Zmiany w genomie różnych wariantów wirusa wywołującego zespół niedoboru immunologicznego spowodowane są głównie mutacjami punktowymi, krótkimi delecjami czy insercjami nukleotydów bądź specyficznymi duplikacjami krótkich fragmentów łańcucha nukleotydowego [3, 127]. Tempo ewolucyjnych zmian genomu wirusa HIV jest niezwykle wysokie. Dla genu env wynosi $10^{-2} - 10^{-3}$, a dla genu gag 10^{-4} zmian nukleotydów w ciągu roku [55].

Szeroko zakrojone badania genetyczne i biochemiczne wskazują na duże podobieństwo wirusa HIV do wirusa małp STLV-3 — oraz do podrodziny retrowirusów *Lentivirinae* [20, 110, 126]. Zarówno wirusy HIV, jak i STLV-3 wykazują wiele wspólnych właściwości (morfologia, efekty cytopatyczne, transaktywacja) z neuropatogennymi wirusami kopytnych, tj. kóz (wirus zapalenia mózgu), owiec (Visna) i koni (wirus niedokrwistości zakaźnej). Łączy je natomiast pokrewieństwo z ludzkimi onkogennymi, limfotropowymi wirusami HTLV-1 i HTLV-2 (T-tropizm, transaktywacja, podobna struktura części białek wirusowych) [56, 131].

3. MOLEKULARNE PODSTAWY INFЕКCJI WIRUSEM HIV KOMÓREK GOSPODARZA

W wyniku specyficznej interakcji między glikoproteiną otoczki wirusa i antygenem powierzchniowym CD4 błony komórkowej wirus wnika do wnętrza limfocyta. W komórce traci płaszcz lipidowo-białkowy, a uwolniony RNA staje się matrycą do odwrotnej transkryptazy, która wykorzystując jako „starter” tRNA^{Lys} [138] syntetyzuje nić (—) cDNA. Jednołańcuchowy cDNA tworzy przejściowy hybryd RNA-DNA, trawiony następnie przez RN-azę H. Wtedy na nici cDNA tworzy się nowy łańcuch DNA (nić (+)) i powstała cząsteczka ulega zamknięciu (prowirus). Prowirusowy DNA zostaje zintegrowany z genomem komórki gospodarza i w tym stanie może pozostać do momentu jego aktywacji.

Shaw i wsp. [120] zwracają uwagę na pozostawanie znacznych ilości wirusowego DNA w formie episomalnej w zainfekowanych komórkach. Po aktywacji wirusowy DNA jest transkrybowany, a powstały mRNA ulega „dojrzwaniu” (modyfikacje końców 5' i 3') i translacji za pomocą komórkowych układów enzymatycznych, co prowadzi do odtworzenia potomnego RNA oraz białek wirusowych [135]. Białka otoczkowe wirusa są syntetyzowane w szorstkim retikulum endoplazmatycznym i transportowane przez aparat Golgiego do błon cytoplazmatycznych. Rodzicielski RNA wirusa otacza się białkami rdzenia w cysternach albo błonach cytoplazmatycznych i potomny wirus przez stadium „pączkowania” zostaje uwolniony z błon komórek gospodarza. Rycina 5 przedstawia mechanizm ataku komórki docelowej przez wirus HIV zaproponowany przez Gupta [52].



- 1 WIAZANIE
- 2 TRANSKRYPCJA
- 3 INTEGRACJA Z GENOMEM GOSPODARZA
- 4 MODYFIKACJA POSTRANSKRYPCYJNA
- 5 TRANSLACJA
- 6 PĄCZKOWANIE
- 7 UWALNIANIE

RT-ODWROTNA TRANSKRYPTAZA

RER-SZORSTKIE RETIKULUM ENDOPLAZMATYCZNE

Ryc. 5. Etapy infekcji wirusem HIV komórki gospodarza [52]

4. RETROWIRUSY STLV-3, HIV-2 I HTLV-4

Ostatnio wydzielono z kilku gatunków małp afrykańskich, tj. makak [28], koczkodan zielony [66] i mangaba [98], retrowirusy wykazujące T-tropizm, opisane jako STLV-3 (Simian T-Lymphotropic Virus type 3). Okazało się, że wirusy te nie wywołują choroby u dziko żyjących koczkodanów i uwięzionych mangabów, natomiast wyizolowany wirus STLV-3 indukuje u makaków chorobę zbliżoną do zespołu AIDS u ludzi, łącznie ze zmianami neuropatologicznymi [28, 98]. Retrowirusy STLV-3 wykazują wiele cech wspólnych z HIV-1 pod względem ultrastruktury, budowy materiału genetycznego, interakcji wirus - komórka

(indukują powstawanie wielojądrowych komórek — syncycjów, wykorzystują Mg^{2+} -zależną odwrotną transkryptazę w syntezie cDNA oraz antygen CD4 limfocytów w wiązaniu glikoproteiny otoczkowej) oraz właściwości immunologicznych (krzyżowe reakcje z białkami kodowanymi przez geny gag, pol, env i 3'orf). Jednakże, w przeciwieństwie do wirusa HIV-1, cząstki STLV-3 nie lizują *in vitro* ludzkich limfocytów krwi obwodowej czy komórek linii T [28, 66].

W 1986 roku opisano kolejne dwa retrowirusy [21, 22, 67, 77] wyodrębnione z limfocytów ludzi w Afryce. Jeden z nich — HIV-2, spotykany wśród pacjentów z AIDS w krajach Afryki Zachodniej, wykazuje pokrewieństwo z wirusem HIV-1 (morfologia, T-tropizm), jednakże z istotnymi różnicami w sekwencjach nukleotydowych, dochodzącymi do około 60% dla genu env [23]. Białka retrowirusów HIV-1 i HIV-2 wykazują różnice w masie cząsteczkowej. Obserwowano niewielką tylko krzyżową reaktywność przeciwciał surowic pacjentów zainfekowanych HIV-2, ograniczoną głównie do białka p24 rdzenia obydwu wirusów, bez śladu krzyżowej reakcji z glikoproteinami otoczki [23]. Drugi retrowirus, opisywany jako HTLV-4, wydzielony z krwi ludzi zdrowych, jak dotąd bez cech patogennych, wykazuje prawie identyczną strukturę genomu (99% homologii) z wirusami STLV-3 małp [59, 66, 67]. Wirusy HIV-2 i HTLV-4 wykazują między sobą więcej homologii pod względem budowy genomu (około 20% różnic w sekwencji nukleotydów) i właściwości serologicznych aniżeli z wirusem HIV-1. Z badań genetycznych i biochemicznych wynika, że genomy i kodowane przez nie białka wirusów HIV-2 i HTLV-4 wykazują znaczne pokrewieństwo z małpim wirusem STLV-3 [59, 77].

Białka rdzenia wirusów STLV-3 dają reakcje krzyżowe z białkami HIV-1 i HIV-2, podczas gdy białka otoczkowe reagują tylko z pochodzącymi z wirusa HIV-2 [21, 22, 67].

Na podkreślenie zasługuje pionierskie doniesienie Gnanna i wsp. [49], zmierzające do opracowania prostego testu różnicującego retrowirusy HIV-1 i HIV-2. Badacze ci posłużyli się syntetycznymi peptydami (12 aminokwasów), analogiami fragmentów konserwatywnych, wysoce immunogennych regionów transmembranowego białka gp41, które za pomocą testu ELISA pozwoliły wyodrębnić surowice pacjentów zainfekowanych wirusami HIV-1 i HIV-2, a także wirus STLV-3. Okazało się, że taki region znajduje się w każdym z tych wirusów (HIV-1: 598 - 609; HIV-2: 592 - 603; STLV-3: 608 - 619 aminokwas) i zawiera charakterystyczny układ aminokwasów: Try-Gly-Cys-X-X-X-X-X-Cys. Wydaje się, że do rozpoznania immunogennej domeny białka tych wirusów wystarczy siedem aminokwasów zawierających dwie reszty cysteiny, tworzące mostek dwusiarczkowy.

5. LECZENIE I PROFILAKTYKA ZESPOŁU AIDS

Zgodnie z raportem Światowej Organizacji Zdrowia [10, 90], zachorowania na AIDS odnotowano w ponad 100 krajach. Zgłoszone i leczone przypadki tej choroby osiągnęły ponad 50 000. W USA opisano ponad 36 000 zachorowań, przy czym zmarło już około 21 000 osób. Nosiciele wirusa HIV w tym kraju ocenia się na około 1,5 mln (na świecie ok. 10 mln). Wciąż trudno o szacunek stanu zachorowań i nosicielstwa w Afryce, gdzie choroba ta wykazuje zastraszające tempo rozwoju i nieco odmienny obraz epidemiologiczny [24, 76, 106]. W tej sytuacji gwałtownie narasta potrzeba wprowadzenia skutecznych leków, a w przyszłości szczepionki.

Obecne kierunki leczenia zespołu AIDS obejmują: terapię infekcji oportunistycznych i nowotworów, próby unieszkodliwienia wirusa HIV oraz usiłowanie rekonstrukcji aktywności immunologicznej zainfekowanych organizmów [15, 113, 136]. Z biologicznego punktu widzenia największe nadzieje pokłada się w zatrzymaniu replikacji wirusa przez zastosowanie inhibitorów odwrotnej transkryptazy.

Za najskuteczniej poprawiający stan zdrowia chorych na AIDS uważa się wprowadzony przez zespół Brodera [93, 94, 113] analog tymidyny — 3' azydo-3'deoksytymidynę (AZT). Lek ten przy udziale komórkowych enzymów ulega fosforylacji i w tej formie stanowi kompetycyjny nukleotyd dla tymidyno-5-trifosforanu. W przypadku włączenia go do łańcucha cDNA za pomocą odwrotnej transkryptazy, następuje terminacja syntezy z powodu niemożliwości utworzenia kolejnego wiązania 5'—3' fosfodiesterowego. Związek ten przy stężeniu 5-10 μM hamuje w pełni replikację wirusa. AZT blokuje ekspresję białka rdzenia p24 [93]. W roku bieżącym lek ten oficjalnie wprowadzono do lecznictwa szpitalnego [75]. Obserwacje poczynione dotąd wśród pacjentów z AIDS pobierających AZT pozwalają odnotować poprawę ich stanu immunologicznego, przyrost wagi ciała, a nawet cofanie zmian neurologicznych [94]. W badaniach *in vitro* pewne nadzieje na pozytywne wyniki leczenia przeciw-wirusowego wiąże się z kombinacją AZT z preparatem aciclovir (analog guanozyny). Stwierdzono ponadto, że 2'3'-dideoksynukleozydy mogą również powodować przedwczesną terminację cDNA [94]. Inne leki, tj. suramina, fosfonomrówczan i HPA-23, które *in vitro* są skutecznymi inhibitorami odwrotnej transkryptazy, nie spełniają — jak dotąd — klinicznej poprawy stanu immunologicznego chorych na AIDS [52, 92]. Na uwagę zasługują również próby zastosowania w leczeniu AIDS ribowiryny, analogu guanozyny, której działanie wiązałoby się ze zmianą struktury 5'mRNA, transkrybowanego ze zintegrowanego z genomem komórkowym DNA wirusa, na etapie jego „oczyszczenia” [136].

Nowe podejście w leczeniu AIDS wiąże się z zatrzymaniem procesu transaktywacji wirusa HIV [80, 143]. W tym celu zastosowano *in vitro* „anti-sense” oligodeoksynukleotydy, tj. krótkie sekwencje DNA (albo chemicznie zmodyfikowane DNA w celu zwiększenia penetracji komórek i odporności na degradację enzymatyczną) komplementarne do określonych segmentów genomu wirusa, istotnych do jego replikacji. Takie sekwencje mogłyby blokować ekspresję odcinków genomu wirusowego przez pewien rodzaj hybrydyzacji, ograniczając ich translację, lub interferować w wiązaniu białek regulatorowych, kodowanych przez geny *tatIII* czy *art/trs* [143]. W toku są próby wykorzystania substancji biologicznie czynnych, tj. hormonów grasiczych, interleukiny-2, interferonów alfa i gamma czy preparatów immunofarmakologicznych (izoprynozyna, cyklosporyna, imuthiol) jako potencjalnych czynników odbudowy układu immunologicznego chorych na AIDS [52].

Wysoka zmienność materiału genetycznego wirusa HIV komplikuje otrzymanie szczepionki przeciwko AIDS, niemniej trwają intensywne prace w tym kierunku [8, 9, 36, 63]. Nadzieje na szybkie uzyskanie szczepionki (podjednostkowej) pogłębiły wyniki stwierdzające, że antygenowe białka wirusa — glikoproteiny otoczkowe, a także białka rdzenia (*p17*) wywołują powstawanie przeciwciał neutralizujących [61, 105, 114]. Produkcja skutecznej szczepionki wiąże się z wydzieleniem z wirusa HIV stałego składnika antygenowego, wywołującego odpowiedź układu immunologicznego skierowaną przeciwko wszystkim wnikającym do organizmu wirusom, w których obecny jest tenże składnik. Wykrycie regionów o wysokiej konserwatywności sekwencji nukleotydowych w genie glikoproteiny otoczkowej wirusa wywołującego AIDS daje realne szanse otrzymania szczepionki w niedługim czasie [11, 36, 61]. Wykorzystując techniki inżynierii genetycznej i biotechnologii wbudowuje się całe geny bądź ich fragmenty bakteriom, drożdżom, aby wywołać w nich ekspresję białek wirusowych, i to w znacznej ilości [11, 105]. Dużą szansę powodzenia na drodze do otrzymania szczepionki wiąże się z syntetycznymi peptydami (m. in. peptyd T) o homologicznej sekwencji do regionów konserwatywnych glikoproteiny *gp 120* [49, 68, 90]. Na uwagę zasługują również prace nad uzyskaniem rekombinantów wirusowych z wszczepionymi genami wirusa HIV [105]. Zasygnalizowano pierwsze wprowadzenie takich rekombinantów ludziom. W 1987 r. Zagury (cyt. [9]) zaszczepił siebie oraz 10 osób w Zairze rekombinantem wirusa krowianki z genem glikoproteiny *gp 160*.

W laboratorium Koprowskiego [8, 40] powstała koncepcja wytworzenia szczepionki przez immunizację przeciwciałami antyidiotypowymi. W wyniku kolejnych generacji przeciwciał przeciwko białkom wirusa HIV dochodzi do powstania przeciwciał imitujących naturalne przeciwciała antywirusowe.

Ogrom problemów, które stwarza zespół AIDS, a jednocześnie potrzeba zrozumienia tragedii, jaką on powoduje, niesie potrzebę:
 masowego uświadamiania,
 lansowania zasady bezpiecznego seksu,
 testowania dawców krwi na obecność przeciwciał przeciwko wirusowi HIV,
 syntezy czynnika VIII na drodze inżynierii genetycznej,
 używania sprzętu jednorazowego do wstrzyknięć dożylnych,
 sterylizacji podstawowego sprzętu medycznego wielokrotnego użytku (wirus ginie po kilkuminutowej inkubacji w temperaturze 56°C).

LITERATURA

- [1] ALLAN J. S., COLIGAN J. E., LEE T.-H., McLANE M. F., KANKI P. J., GROOPMAN J. E., ESSEX M., A new HTLVIII/LAV encoded antigen detected by antibodies from AIDS patients, *Science*, **230**: 810 - 813, 1985.
- [2] ALLAN J. S., COLIGAN J. E., BARIN F., McLANE M. F., SODROSKI J. G., ROSEN C. A., HASELTINE W. A., LEE T. H., ESSEX M., Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV III, *Science*, **228**: 1091 - 1094, 1985.
- [3] ALIZON M., SONIGO P., BARRE-SINOUSI T., CHERMANN J. C., TIOLLAIS P., MONTAGNIER L., WAIN-HOBSON S., Molecular cloning of lymphadenopathy associated virus, *Nature*, **312**: 757 - 760, 1984.
- [4] AMMANN A. J., ABRAMS D., CONANT M., CHUDWIN D., COWAN M., VOLBERDING P., LEWIS B., CASAVANT C., Acquired immune dysfunction in homosexual men: immunologic profiles, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **27**: 315 - 325, 1983.
- [5] ANDERS K. M., GUERRA W. F., TOMIYASU U., VERITY M. A., VINTERS H. V., The neuropathology of AIDS, *Am. J. Pathol.*, **124**: 537 - 558.
- [6] ARYA S. K., GUO C., JOSEPHS S. F., WONG-STAAAL F., Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III), *Science*, **229**: 69 - 73, 1985.
- [7] BARIN F., McLANE M. F., ALLAN J. S., LEE T. H., GROOPMAN J. E., ESSEX M., Virus envelope of HTLV III represents major target for antibodies in AIDS patients, *Science*, **228**: 1094 - 1098, 1985.
- [8] BARNES D. M., Strategies for an AIDS Vaccine, *Science*, **233**: 1149 - 1153, 1986.
- [9] — Candidate AIDS vaccine, *Science*, **235**: 1575, 1987.
- [10] — AIDS: statistics but few answers, *Science*, **236**: 1423 - 1425, 1987.
- [11] BARR P. J., STEIMER K. S., SABIN E. A., PARKES D., GEORGE-NASCIMENTO C., STEPHANS J. C., POWERS M. A., GYENES A., Van NEST G. A., MILLER E. T., HIGGINS K. W., LUCIW P. A., Antigenicity and immunogenicity of domains of the human immunodeficiency virus (HIV) envelope polypeptide expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Vaccine*, **5**: 90 - 101, 1987.
- [12] BARRE-SINOUSI F., CHERMANN J. C., REY F., NUGEYRE M. T., CHAMBERT S., GRUEST J., DAUGUET C., AXLER-BLIN C., VÉZINET-BRUN F.,

- ROUZIOUX C., ROSENBAUM W., MONTAGNIER L., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), *Science*, **220**: 868 - 871, 1983.
- [13] BERMAN M. A., SANDBORG C. I., CALABIA B. S., ANDREWS B. S., FRIOU G. J., Interleukin 1 inhibitor masks high interleukin 1 production in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **42**: 133 - 140, 1987.
- [14] BLACK P. H., HTLV-III, AIDS, and brain, *N. Engl. J. Med.*, **313**: 1538 - 1540, 1985.
- [15] BOLOGNESI D. P., FISCHINGER P. J., Prospects for treatment of human retrovirus associated diseases, *Cancer Res. (Suppl.)*, **45**: 4700S - 4705S, 1985.
- [16] BRIGGS M. R., KADONAGA J. T., BELL S. P., TIJAN R., Purification and biochemical characterization of the promoter specific transcription factor, Sp 1, *Science*, **234**: 47 - 52, 1986.
- [17] CHAKRABARTI S., GRUOFF M. R., WONG-STAAAL F., GALLO R. C., MOSS B., Expression of the HTLV-III envelope gene by a recombinant vaccina virus, *Nature*, **320**: 535 - 537, 1986.
- [18] CHANDRA A., GERBER T., CHANDRA P., Biochemical heterogeneity of reverse transcriptase purified from the AIDS virus, HTLV-III, *FEBS Lett.*, **197**: 84 - 88, 1986.
- [19] CHANDRA A., GERBER T., KAUL S., WOLF C., DEMIRHAN I. CHANDRA P., Serological relationship reverse transcriptases from human T-cell lymphotropic viruses defined by monoclonal antibodies, *FEBS Lett.*, **200**: 327 - 332, 1986.
- [20] CHIU I. M., YANIV A., DAHLBERG J. E., GAZIT A., SKUNTZ S. F., TRONICK S. R., AARONSON S. A., Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses, *Nature*, **317**: 366 - 368, 1985.
- [21] CLAVEL F., GUYADER M., GUÉTARD D., SALLÉ M., MONTAGNIER L., ALIZON M., Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2, *Nature*, **324**: 691 - 695, 1986.
- [22] CLAVEL F., GUETARD D., BRUN-VÉZINET F., CHAMARET S., REY M. A., SANTOS-FERREIRA M. O., LAURENT A. G., DAUGUET C., KATLAMA C., ROUZIOUX C., KLATZMANN D., CHAMPALIMAUD J. L., MONTAGNIER L., Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS, *Science*, **233**: 343 - 346, 1986.
- [23] CLAVEL F., MANSINHO K., CHAMARET S., GUETARD D., FAVIER V., NINA J., SANTOS-FERREIRA M.-O., CHAMPALIMAUD J.-L., MONTAGNIER L., Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa, *New Engl. J. Med.*, **316**: 1180 - 1185, 1987.
- [24] CLUMECK N., MASCART-LEMONE F., De MAUBEUGE J., BRENEZ D., MARCELIS L., Acquired immune deficiency syndrome in black Africans, *Lancet*, **1**: 642 - 642, 1983.
- [25] COFFIN J. M., Genetic variation in AIDS viruses, *Cell*, **46**: 1 - 4, 1986.
- [26] CURRAN J. W., MORGAN W. M., HARDY A. M., JAFFE H. W., DARROW W. W., DOWDLE W. R., The epidemiology of AIDS: Current status and future prospects, *Science*, **229**: 1352 - 1357, 1985.
- [27] DALGLEISH A. G., BEVERLEY P. C. L., CLAPHAN P. R., CRAWFORD D. H., GREAVES M. F., WEISS R. A., The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus, *Nature*, **312**: 763 - 767, 1984.
- [28] DANIEL M. D., LETVIN N. L., KING N. W., KANNAGI M., SEHGAL P. K.,

- HUNT R. D., KANKI P. J., ESSEX M., DESROSIERS R. C., Isolation of T-tropic HTLV III-like retrovirus from macaques, *Science*, **228**: 1201 - 1204, 1985.
- [29] DAYAL V. K., LEA M. A., ARKEL Y. S., Plasma protein alterations in AIDS and hemophilia A, *AIDS Res.*, **2**: 309 - 319, 1986.
- [30] DEWHURST S., STEVENSON M., VOLSKY D. J., Expression of the T4 molecule (AIDS virus receptor) by human brain-derived cells, *FEBS Lett.*, **213**: 133 - 137, 1987.
- [31] DiMARZO VERONESE F., DeVICO A. L., COPELAND T. D., OROSZLAN S., GALLO R. C., SARNGADHARAN M. G., Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene, *Science*, **229**: 1402 - 1405, 1985.
- [32] DiMARZO VERONESE F., COPELAND T. D., DeVICO A. L., RAHMAN R., OROSZLAN S., GALLO R. C., SARNGADHARAN M. G., Characterization of highly immunogenic p66/p51 as reverse transcriptase of HTLV-III/LAV, *Science*, **231**: 1289 - 1291, 1986.
- [33] FAHEY J. L., GIORGI J., MARTINEZ-MAZA O., DETELS R., MITSUYASU R., TAYLOR J., Immune pathogenesis of AIDS and related syndromes, *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.*, **138**: 245 - 252, 1987.
- [34] FARMERIE W. G., LOEB D. D., CASAVANT N. C., HUTCHISON III C. A., EDGELL M. H., SWANSTROM R., Expression and processing of the AIDS virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*, *Science*, **236**: 305 - 308, 1987.
- [35] FEINBERG M. B., JARRETT R. E., ALDOVINI A., GALLO R. C., WONG-STAAAL F., HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA, *Cell*, **46**: 807 - 817, 1986.
- [36] FERDINAND F.-J., DORNER F., KURTH R., Perspectives of HIV vaccine developments, *J. Virol.*, **17**: 63 - 67, 1987.
- [37] FISCHER A. G., FEINBERG M. B., JOSEPH S. F., HARPER M. E., MARSELLE L. M., REYES G., GONDO A., ALDOVINI A., DEBOUK C., GALLO R. C., WONG-STAAAL F., The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication, *Nature*, **320**: 367 - 371, 1986.
- [38] FISCHER A. G., RATNER L., MITSUYA H., MARSELLE L. M., HARPER M. F., BRODER S., GALLO R. C., WONG-STAAAL F., Infectious mutant of HTLV-III with changes in the 3' region and markedly reduced cytopathic effects, *Science*, **233**: 655 - 659, 1986.
- [39] FISCHER A. G., ENSOLI B., IVANOFF L., CHAMBERLAIN M., PETTEWAY S., RATNER L., GALLO R. C., WONG-STAAAL F., The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro, *Science*, **237**: 888 - 893, 1987.
- [40] FISCHINGER P. J., ROBEY W. G., KOPROWSKI H., GALLO R. C., BOLOGNESI D. P., Current status and strategies for vaccines against diseases induced by human T-cell lymphotropic retroviruses, *Cancer Res. Suppl.*, **45**: 4694S - 4699S, 1985.
- [41] FOLKS T., POWEL D. M., LIGHTFOOTE M. M., BENN S., MARTIN M. A., FAUCI A. S., Induction of HTLV-III/LAV from a nonvirus-producing T-cell line: Implications for latency, *Science*, **231**: 600 - 602, 1986.
- [42] FRIEDLAND G., The acquired immunodeficiency syndrome. General overview, *Intern. J. Neuroscience*, **32**: 677 - 686, 1987.
- [43] GALLO R. C., SALAHUDDIN S. Z., POPOVIC M., SHEARER G. M., KAPLAN M., HAYNES B. F., PALKER T. J., REDFIELD R., OLESKE J.,

- SAFAI B., WHITE G., FOSTER P., MARKHAM P. D., Frequent deletion and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and of risk for AIDS, *Science*, **224**: 500 - 503, 1984.
- [44] GALLO R. C., HTLV-III: untangling the retroviral origin of the AIDS pandemic, *Advances Oncol.*, **2**: 3 - 10, 1987.
- [45] GALLO R. C., SARNGADHARAN M. G., ARYA S. K., WONG-STAAAL F., Human retroviruses with emphasis on HTLV-III/LAV: Now and future perspectives, *Ann. Inst. Pasteur/Virol.*, **138**: 13 - 19, 1987.
- [46] GALLO R. C., The AIDS virus, *Scientific Am.*, **256**: 47 - 56, 1987.
- [47] GELDERBLOM H. R., HAUSMANN E. H. S., OZEL M., PAULI G. KOCH M. A., Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins, *Virology*, **156**: 171 - 176, 1987.
- [48] GŁADYSZ A., INGLOT A. D., Zespół nabytego upośledzenia odporności (AIDS): Stan badań od 1981 do 1986 r., *Post. Hig. Med. Dośw.*, **40**: 361 - 379, 1986.
- [49] GNANN J. W., McCORMICK J. B., MITCHELL S., NELSON J. A., OLDSTONE M. B. A., Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and HIV type 2 infections, *Science*, **237**: 1346 - 1349, 1987.
- [50] GOH W.-C., SODROSKI J. G., ROSEN C. A., HASELTINE W. A., Expression of the art gene protein of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) in bacteria, *J. Virol.*, **61**: 633 - 637, 1987.
- [51] GOTTLIEB M., GROOPMAN J., *Acquired immune deficiency syndrome*. Alan R. Liss, N. York 1984, 1 - 308.
- [52] GUPTA S., Therapy of AIDS and AIDS-related syndromes, *TIPS Reviews*, 1986.
- [53] HAHN B. H., SHAW G. M., ARYA S. K., POPOVIC M., GALLO R. C., WONG-STAAAL F., Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS, *Nature*, **312**: 166 - 169, 1984.
- [54] HAHN B. H., GONDA M. A., SHAW G. M., POPOVIC M., HOXIE J. A., GALLO R. C., WONG-STAAAL F., Genomic diversity of the acquired immune deficiency syndrome virus HTLV-III: Different viruses exhibit greatest divergence in their envelope genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 4813 - 4817, 1985.
- [55] HAHN B. H., SHAW G. M., TAYLOR M. E., REDFIELD R. R., MARKHAM P. D., SALAHUDDIN S. Z., WONG-STAAAL F., GALLO R. C., PARKS E. S., PARKS W. P., Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS, *Science*, **232**: 1548 - 1553, 1986.
- [56] HASELTINE W. A., PATARCA R., AIDS virus and scrapie agent share protein, *Nature*, **323**: 115 - 116, 1986.
- [57] HENDERSON L. E., KRUTZSCH H. C., OROSZLAN S., Mirystyl amino-terminal acylation of murine retrovirus proteins: An unusual post-translational protein modification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 339 - 343, 1983.
- [58] HERSH E. M., REUBEN J. M., RIOS A., MANSELL P. W. A., NEWLL G. R., McGLURE J. E., GOLDSTEIN A. L., Elevated serum thymosin alfa₁ levels associated with evidence of immune dysregulation in male homosexuals with history of infectious diseases or Kaposi sarcoma, *N. Engl. Med.*, **308**: 45 - 46, 1983.
- [59] HIRSCH V., RIEDEL N., MULLINS J. I., The genome organization of STLV-3 is similar to that of the AIDS virus except for a truncated transmembrane protein, *Cell*, **49**: 309 - 319, 1987.
- [60] HO D., ROTA T., SCHOOLEY R. T., KAPLAN J. C., ALLAN J. D., GROOP-

- MAN J., RESNICK L., FELSENSTEIN D., ANDREWS C., HIRSCH M., Isolation of HTLV-III from cerebrospinal fluid and neutral tissues of patients with neurologic syndromes related to acquired immunodeficiency syndrome, *New Engl. J. Med.*, **313**: 1493 - 1497, 1985.
- [61] HO D. D., SARGADHARAN M. G., HIRSCH M. S., SCHOOLEY R. T., ROTA T. R., KENNEDY R. C., CHANH T. C., SATO V. L., Human immunodeficiency virus neutralizing antibodies recognize several conserved domains on the envelope glycoproteins, *J. Virol.*, **61**: 2024 - 2028, 1987.
- [62] HOXIE J. A., ALPERS J. D., RACKOWSKI J. L., HUEBNER K., HAGGARTY B. S., CEDARBAUM A. J., REED J. C., Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV, *Science*, **234**: 1123 - 1127, 1986.
- [63] HUNSMANN G., Subunit vaccines against exogenous retroviruses: Overview and perspectives, *Cancer Res. (Suppl.)*, **45**: 4691S - 4693S, 1985.
- [64] KALYANRAMAN V. S., CABRADILLA C. D., GETCHELL J. P., NARAYANAN R., BRAFF E. H., CHERMANN J.-C., BARRE-SINOUSSE F., MONTAGNIER L., SPIRA T. J., KAPLAN J., FISHBEIN D., JAFFE H. W., CURRAN J. W., FRANCIS D. P., Antibodies to the core protein of lymphadenopathy-associated virus (LAV) in patients with AIDS, *Science*, **225**: 321 - 324, 1984.
- [65] KAN N. C., FRANCHINI G., WONG-STAAAL F., DuBOIS G. C., ROBEY W. G., LAUTENBERGER J. A., PAPAS T. S., Identification of HTLV-III/LAV *src* gene product and detection of antibodies in human sera, *Science*, **231**, 1553 - 1555, 1986.
- [66] KANKI P. J., ALROY J., ESSEX M., Isolation of T-lymphotropic retrovirus related to HTLV-III/LAV from wild-caught African green monkeys, *Science*, **230**: 951 - 954, 1985.
- [67] KANKI P. J., BARIN F., BOUP S. M., ALLAN J. S., ROMET-LEMONNE J., MARLINK R., McLANE M., LEE T. H., ARTEILLE B., DENIS F., ESSEX M., New human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic virus type III (STLV-III_{AGM}), *Science*, **232**: 238 - 243, 1986.
- [68] KENNEDY R. C., HENKEL R. D., PAULETTI D., ALLAN J. S., LEE T. H., ESSEX M., DREESMAN G. R., Antiserum to a synthetic peptide recognizes the HTLV-III envelope glycoprotein, *Science*, **231**: 1556 - 1559, 1986.
- [69] KITCHEN L. W., BARIN F., SULLIVAN J. L., McLANE M. F., BRETTLER D. B., LEVINE P. H., ESSEX M., Aetiology of AIDS — antibodies to human T-cell leukaemia virus (type III) in haemophiliacs, *Nature*, **312**: 367 - 369, 1984.
- [70] KLATZMANN D., BARRE-SINOUSSE F., NUGEYRE M. T., DAUGUET C., VILMER E., GRISCELLI C., BRUM-VEZINET F., ROUZIOUX C., GLUCKMANN J. C., CHERMANN J.-C., MONTAGNIER L., Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes, *Science*, **225**: 59 - 63, 1984.
- [71] KLATZMANN D., CHAMPAGNE E., CHAMARET S., GRUEST J., GUE-TARD D., HERCENOL T., GLUCKMANN J.-C., MONTAGNIER L., T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV, *Nature*, **312**: 767 - 768, 1984.
- [72] KLATZMANN D., MONTAGNIER L., Approaches to AIDS therapy, *Nature*, **319**: 10 - 11, 1986.
- [73] KNIGHT D. M., FLOMERFELT F. A., GHAYEB J., Expression of the

- art/trs protein of HIV study of its role in viral envelope synthesis, *Science*, **236**: 837 - 840, 1987.
- [74] KOENIG S., GENDELMAN H. E., ORENSTEIN J. M., Dal CANTO M. C., PEZESHKOUR G. H., YUNGBLUTH M., JANOTTA F., AKSAMIT A., MARTIN M. A., FAUCI A. S., Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy, *Science*, **233**: 1089 - 1093, 1986.
- [75] KOLATA G., Imminent marketing of AZT raised problems, *Science*, **235**: 1462 - 1463, 1987.
- [76] KORNASZEWSKI W., KORNASZEWSKA M., SKOTNICKI A. B., Nabyty zespół niedoboru immunologicznego (AIDS) w środowisku afrykańskim, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **40**: 331 - 346, 1986.
- [77] KORNFELD H., RIEDEL N., VIGLIANTI G. A., HIRSCH V., MULLINS J. I., Cloning of HTLV-4 and its relation to simian and human immunodeficiency viruses, *Nature*, **326**: 610 - 613, 1987.
- [78] KRAMER R. A., SCHABER M. D., SKALKA A. M., GANGULY K., WONG-STAAAL F., REDDY E. P., HTLV-III gag protein is processed in yeast cells by the virus pol-protease, *Science*, **231**: 1580 - 1584, 1986.
- [79] KURATOWSKA Z., AIDS nowa choroba, *Wiedza Powszechna*, 1986, 1 - 138.
- [80] LAURENCE J., The immune system in AIDS, *Scientific Am.*, **253**: 84 - 93, 1985.
- [81] LEE T.-H., COLIGAN J. E., ALLAN J. S., McLANE M. F., GROOPMAN J. E., ESSEX M., A new HTLV-III/LAV protein encoded by a gene found in cytopathic retroviruses, *Science*, **321**: 412 - 417, 1986.
- [82] LEVY J. A., HOFFMAN A. D., KRAMER S. M., OSHIRO L. S., Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS, *Science*, **225**: 840 - 842, 1984.
- [83] LIFSON J. D., MARK D. F., BENIKE C. J., KOTHS K., ENGLEMAN E. G., Human recombinant interleukin 2 partially reconstitutes deficient in vitro immune responses of lymphocytes from patients with AIDS, *Lancet*, **1**: 698 - 792, 1984.
- [84] LIFSON J. D., REYES G. R., McGRATH M. S., STEIN B. S., ENGELMAN E. G., AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen, *Science*, **232**: 1123 - 1127, 1986.
- [85] LIGHFOOTE M. M., COLIGAN J. E., FOLKS T. M., FAUCI A. S., MARTIN M. A., VENKATESAN S., Structural characterization of research transcriptase and endonuclease polypeptides of acquired immune deficiency syndrome retrovirus, *J. Virol.*, **60**: 771 - 775, 1986.
- [86] LUCIW P. A., POTTER S. J., STEIMER K., DINA D., LEVY J. J., Molecular cloning of AIDS-associated retrovirus, *Nature*, **312**: 760 - 763, 1984.
- [87] MARKHAM P. D., SALAHUDDIN S. Z., POPOVIC M., PATEL A., VERNEN K., ORNDORFF S., GALLO R. C., Advances in isolation of HTLV-III from patients with AIDS and AIDS-related complex and from donors at risk, *Cancer Res. (Suppl.)*, **45**: 4588s - 4591s, 1985.
- [88] MARX J. L., The slow insidious natures of the HTLV's, *Science*, **231**: 450 - 451, 1986.
- [89] — The AIDS virus — well known but a mystery, *Science*, **236**: 390 - 392, 1987.
- [90] — Probing the AIDS virus and its relatives, *Science*, **236**: 1523 - 1525, 1987.
- [91] Mc DOUGAL J. S., KENNEDY M. S., SLIGH J. M., CORT S. I., MAWLE A.,

- NICHOLSON K. A., Binding of HTLV-III/LAV to T4⁺ cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule, *Science*, **231**: 382 - 385, 1986.
- [92] MITSUYA H., POPOVIC M., YARCHOAN R., Suramin protects T cells against infectivity and cytopathic effect of HTLV-III, *Science*, **225**: 1484 - 1487, 1984.
- [93] MITSUYA H., WEINHOLD K. J., FURMAN P. A., StCLAIR M. H., NUSSINOFF-LERMAN S., GALLO R. C., BOLOGNESI D., BARRY D. W., BRODER S., 3'-azido-3'-deoxythymidine (BWA509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**: 7096 - 7100, 1985.
- [94] MITSUYA H., BRODER S., Strategies for antiviral therapy in AIDS, *Nature*, **325**: 773 - 778, 1987.
- [95] MONTAGNIER L., GRUEST J., CHAMARET S., DAUGUET C., AXLER C., GUÉTARD D., NUGEYRE M. T., BARRE-SINOUSI F., CHERMANN J.-C., BRUNET J. B., KLATZMANN D., GLUCKMAN J. C., Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines, *Science*, **225**: 63 - 66, 1984.
- [96] MONTAGNIER L., ALIZON M., The human immune deficiency virus (HIV): An update, *Ann. Inst. Pasteur/Virol.*, **138**: 3 - 11, 1987.
- [97] MUESING M. A., SMITH D. M., CABRADILLA C. D., BENTON C. V., LASKY L. A., Capon D. J., Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retroviruses, *Nature*, **313**: 450 - 458, 1985.
- [98] MURPHEY-CORB M., MARTIN L. N., RANGAN S. R. S., BASKIN G. B., GORMUS B. J., WOLF R. H., ANDES W. A., WEST M., MONTEJARO R. C., Isolation of an HTLV-III-related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymptomatic mangabeys, *Nature*, **321**: 435 - 439, 1986.
- [99] MURRAY H. W., RUBIN B. Y., MASUR H., ROBERTS R. B., Impaired production of lymphokines and immune (gamma) interferon in the acquired immunodeficiency syndrome, *New Engl. J. Med.*, **310**: 883 - 889, 1984.
- [100] NAYLOR P. H., GOLDSTEIN A. L., Abnormally elevated thymosin α_1 levels in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), *Clin. Lett.*, **4**: 126 - 128, 1983.
- [101] NAYLOR P. H., FRIEDMAN-LIEN A., HERSH E., ERDOS M., GOLDSTEIN A. L., Thymosin α_1 and thymosin β_1 in serum: Comparison of normal, cord, homosexual and AIDS serum, *Int. J. Immunopharmac.*, **8**: 667 - 676, 1986.
- [102] PALCA J., Controversy over AIDS virus extends to name, *Nature*, **321**: 3 - 3, 1986.
- [103] PETTEWAY S. R., REED D., REAGEN K., MATTHEWS T., TRITCH R., IVANOFF L., TRIBE D., CHAMBERLAIN H., CYBULSKI R., BOLOGNESI D., KENEALY W., Immunological characterization of HTLV-III recombinant proteins: potential as diagnostics and vaccine candidates, [W] *Viruses and Human Cancer*, Alan R. Liss, Inc., 1987, 15 - 28.
- [104] POPOVIC M., SARNGADHARAN M. G., READ E., GALLO R. C., Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre AIDS, *Science*, **224**: 497 - 500, 1984.
- [105] PUTNEY S. D., MATTHEWS T. J., ROBEY W. G., LYNN D. L., ROBERT-GUROFF N., MUELLER W. T., LANGLAIS A. J., GHAYEB J., PETTEWAY S. R., WEINHOLD K. J., FISCHINGER P. J., WONG-STAAAL F.,

- GALLO R. C., BOLOGNESI D. P., HTLV-III/LAV-neutralizing antibodies to an E. coli-produced fragment of the virus envelope, *Science*, **234**: 1392 - 1395, 1986.
- [106] QUINN T. C., MANN J. M., CURRAN J. W., PIOT P., AIDS in Africa. Epidemiologic paradigm, *Science*, **234**: 955 - 963, 1986.
- [107] RABSON A. B., MARTIN M. A., Molecular organization of the AIDS retrovirus, *Cell*, **40**: 478 - 480, 1985.
- [108] RATNER L., HASELTINE W., PATARCA R., LIVAK K. J., STRACICH B., JOSEPHS S. F., DORAN E. R., RAFALSKI J. A., WHITEHORN E. A., BAUMEISTER K., IVANOFF L., PATTEWAY Jr. S. R., PEARSON M. L., LAUTENBERG J. A., PAPAS T. S., GHRAYEB J., CHANG N. T., GALLO R. C., WONG-STAAAL F., Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III, *Nature*, **313**: 277 - 284, 1985.
- [109] REIHER W. E., BLALOCK J. E., BRUNCK T. K., Sequence homology between acquired immunodeficiency syndrome virus envelope protein and interleukin 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 9188 - 9192, 1986.
- [110] ROBERT-GUROFF M., GALLO R. C., HTLV: The family of human T Lymphotropic retroviruses and their role in leukemia and AIDS, [w] *Biochemical and Molecular Epidemiology of Cancer*, Alan R. Liss, Inc., 1986, 293 - 301.
- [111] ROBEY W. G., SAFAI B., OROSZLAN S., ARTHUR L. D., GONDA M. A., GALLO R. C., FISCHINGER P. J., Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients, *Science*, **228**: 593 - 596, 1985.
- [112] ROSEN C. A., SODROSKI J. G., GOH W. C., DAYTON A. J., LIPPKE J., HASELTINE W. A., Post-transcriptional regulation accounts for the trans-activation of the human T-lymphotropic virus type III, *Nature*, **319**: 555 - 559, 1986.
- [113] SANDSTRÖM E. G., KAPLAN J. C., Antiviral therapy in AIDS. Clinical pharmacological properties and therapeutic experience to date, *Drugs*, **34**: 372 - 390, 1987.
- [114] SARIN P. S., KUN D. K., THORNTON A. H., NAYLOR P. H., GOLDSTEIN A. L., Neutralization HTLV-III/LAV replication by antiserum to thymosin α_1 , *Science*, **232**: 1135 - 1137, 1986.
- [115] SARNGADHARAN M. G., POPOVIC M., BRUCH L., SCHÜPBACH J., GALLO R. C., Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS, *Science*, **224**: 506 - 508, 1984.
- [116] SARNGADHARAN M. G., VERONESE F. D., OROSZLAN S., ARYA S., GALLO R. C., Structural proteins of HTLV III/LAV, *Ann. Inst. Pasteur/ Virol.*, **138**: 133 - 136, 1987.
- [117] SATTENTAU Q. J., DALGLEISH A. G., WEISS R. A., BAVERLEY P. C. L., Epitopes of the CD4 antigen and HIV infection, *Science*, **234**: 1120 - 1123, 1986.
- [118] SCHULTZ A. M., OROSZLAN S., In vivo modification of retroviral gag gene-encoded polyproteins by miristic acid, *J. Virol.*, **46**: 355 - 361, 1983.
- [119] SCHÜPBACH M. A., POPOVIC M., GILDEN R. V., GONDA M. A., SARNGADHARAN M. G., GALLO R. C., Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS, *Science*, **224**: 503 - 505, 1984.
- [120] SHAW G. M., HAHN B. H., ARYA S. K., GROOPMAN J. E., GALLO R. C.,

- WONG-STAAAL F., Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome, *Science*, **226**: 1165 - 1171, 1984.
- [121] SKOTNICKI A. B., Immunopatologia i klinika nabytego zespołu niedoboru immunologicznego (AIDS), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **40**: 1 - 44, 1986.
- [122] — AIDS — nabyty zespół zaniku odporności, *Ossolineum*, 1986, 1 - 63.
- [123] SODROSKI J., PATARCA R., ROSEN C., DAYTON A., TERWILLIGER E., HASELTINE W. A., Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III, *Science*, **229**: 74 - 77, 1985.
- [124] SODROSKI J., GOH W. C., ROSEN C., DAYTON A., TERWILLIGER E., HASELTINE W., A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication, *Nature*, **321**: 412 - 417, 1986.
- [125] SODROSKI J., GOH W. C., ROSEN C., CAMPBELL K., HASELTINE W. A., Role of the HTLV III/LAV envelope in syncyium formation and cytopathicity, *Nature*, **322**: 470 - 474, 1986.
- [126] SONIGO P., ALIZON M., STASKUS K., KLATZMANN D., COLE S., DANNOS O., RETZEL E., TIOLLAIS P., HAASE A., WAIN-HOBSON S., Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus, *Cell*, **42**: 369 - 382, 1985.
- [127] STARCICH B. R., HAHN B. H., SHAW G. M., McNEELY P. D., MODROW S., WOLF H., PARKS E. S., PARKS W. P., JOSEPHS S. F., GALLO R. C., WONG-STAAAL F., Identification and characterization of conserved and variable region in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS, *Cell*, **45**: 637 - 648, 1986.
- [128] STARCICH B., HAHN B., SHAW G., GALLO R., WONG-STAAAL F., Characterization of conserved and divergent regions in the envelope genes of HTLV-III/LAV, [W] *Viruses and Human Cancer*, Allan R. Liss Inc., 1987, 151 - 159.
- [129] STEIMER K. S., HIGGINS K. W., POWERS M. A., STEPHANS J. C., GYENES A., GEORGE-NASCIMENTO C., LUCIW P. A., BARR P. J., HALLEWELL R. A., SANCHEZ-PESCADOR R., Recombinant polypeptide from the endonuclease region of the acquired immune deficiency syndrome retrovirus polymerase (pol) gene detects serum antibodies in most infected individuals, *J. Virol.*, **58**: 9 - 16, 1986.
- [130] STEPHANS J. C., LEE D. J., MILLER E. T., Van NEST G. A., LEVY J. A., GEORGE-NASCIMENTO C., PARKERS D., BARR P. J., STABER C., DINO D., LUCIW P. A., STEIMER K. S., Specificities of monoclonal antibodies generated against a genetically engineered envelope gene product of the AIDS retrovirus, [W] *Viruses and Human Cancer*, Alan R. Liss, Inc., 1987, 29 - 41.
- [131] STEPHENS R. M., CASEY J. W., RICE N. R., Equine infectious anemia virus gag and pol genes: relatedness to visna and AIDS virus, *Science*, **231**: 589 - 594, 1986.
- [132] STEWART G. J., TYLER J. P. P., CUNNINGHAM A. L., BARR J. A., DRISCOLL G. L., GOLD J., Transmission of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III) by artificial insemination by donor, *Lancet*, **ii**: 581 - 584, 1985.
- [133] SUSTER B., AKERMAN M., ORENSTEIN M., WAX M. R., Pulmonary manifestation of AIDS, *Radiology*, **161**: 87 - 93, 1986.
- [134] TALAL N., A clinical look at acquired immune-deficiency syndrome (AIDS).

- A validation of immunology's theoretical foundation, *Immunology Today*, **4**: 181 - 183, 1983.
- [135] TEMIN H. M., Evolution of retroviruses and other retrotranscripts, [W] Human retroviruses, cancer and AIDS: Approach to prevention and therapy. ULCA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series, vol. 71, ed. D. Bolognesi, Alan R. Liss, Inc., New York, NY, 1987, 1 - 21.
- [136] TUAZON G. U., LABRIOLA A. M., Management of infectious and immunological complications of acquired immuno-deficiency syndrome (AIDS) Current and future prospects, *Drugs*, **33**: 66 - 84, 1987.
- [137] VOGH M. W., CRAVEN D. E., CRAWFORD D. F., WITT D. J., BYLINGTON R., SCHOOLEY R. T., HIRSCH M., Isolation of HTLV-III/LAV from cervical secretion of women at risk for AIDS, *Lancet*, **1**: 525 - 527, 1986.
- [138] WAIN-HOBSON S., SONIGO S., DANOS O., COLE S., ALIZON M., Nucleotide sequence of the AIDS virus, *Cell*, **40**: 9 - 17, 1985.
- [139] WEBER J. R., DOBBINS W. O., The intestinal and rectal epithelial lymphocyte in AIDS, *Am. J. Surg. Pathol.*, **10**: 627 - 639, 1986.
- [140] WONG-STAAAL F., GALLO R. C., Human T-lymphotropic retroviruses, *Nature*, **317**: 395 - 403, 1985.
- [141] WRIGHT C. M., FELBER B. K., PASKALIS H., PAVLAKIS G. N., Expression and characterization of the trans-activator of HTLV III/LAV virus, *Science*, **234**: 988 - 992, 1986.
- [142] ZAGURY D., BERNARD J., LEONARD R., CHEYNIER R., FELDMAN M., SARIN P. S., GALLO R. C., Long-term cultures of HTLV-III infected T cells: A model of cytopathology of T-cell depletion of AIDS, *Science*, **231**: 850 - 853, 1986.
- [143] ZAMECNIK P. C., GOODCHILD J., TAGUCHI Y., SARIN P. S., Inhibition of replication and expression of human T-cell lymphotropic virus type III in cultured cells by exogenous synthetic oligonucleotides complementary to viral RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 4143 - 4146, 1986.

Serdecznie dziękuję Pani Monice Radwan za wykonanie rysunków oraz Panu mgrowi Janowi Gierakowi za przygotowanie maszynopisu pracy.

Otrzymano: 5 stycznia 1988.

Przyjęto: 12 stycznia 1988.

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

STRUKTURA I FUNKCJA MITOCHONDRIALNYCH GENOMÓW

STRUCTURE AND FUNCTION OF MITOCHONDRIAL GENOMES

Anna KRUSZEWSKA i Magdalena BOGUTA

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Zakład Genetyki, Warszawa

Streszczenie. Mitochondria mają swój własny system genetyczny i własny system translacji. Wszystkie mitochondrialne genomy różnych organizmów kodują niewielką ilość tych samych podstawowych produktów; kilkanaście polipeptydów wchodzących w skład enzymów oddechowych wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz tRNA i rRNA mitochondrialnego aparatu translacji. Można wyróżnić dwa typy organizacji mitochondrialnych genomów: genomy, w których informacja zakodowana jest niezwykle oszczędnie i cały niemal mitochondrialny DNA pełni funkcję kodującą (genomy *Metazoa*) oraz genomy, gdzie mniej niż połowa tego DNA pełni funkcję kodującą (rozrzućnie zorganizowane genomy pozostałych organizmów). Te dwa typy organizacji omówiono szczegółowo na przykładzie mitochondrialnego genomu człowieka oraz drożdży piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae*). Mitochondrialne genomy drugiego typu determinują również dodatkowy zestaw białek zakodowanych w intronach. Scharakteryzowano szczegółowiej te białka i przedstawiono teorię utrzymującą, że są one odpowiedzialne za płynność organizacji „rozrzućnych” genomów. Scharakteryzowano także podstawowe różnice między mitochondrialnym kodem genetycznym a kodem uniwersalnym.

Summary. Mitochondria possess their own genetic system and their own system of translation. All mitochondrial genomes code for a set of the same basic products; a few subunits of the respiratory-enzyme complexes in the inner membrane of the organelle and for the rRNA's and tRNA's of the mitochondrial translation apparatus. Two types of mitochondrial genome organization can be distinguished; tightly packed genomes in which genetic information is encoded very economically and almost whole DNA has coding function (genomes of *Metazoa*) and largely expanded genomes of other organisms in which usually less than 50% of DNA has coding function. These two types of organization were exemplified by mitochondrial human genome and the mitochondrial genome of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The genomes of the second type specify also some additional proteins encoded in introns. These proteins were characterized and the theory

concerning their involvement in the fluidity of organization of mitochondrial largely expanded genomes was presented. The basic differences between the universal genetic code and the mitochondrial code(s) were also shown.

WSTĘP

Mitochondria są organelami komórki eukariotycznej, wyspecjalizowanymi w oddychaniu i oksydacyjnej fosforylacji. Mają one najczęściej kształt owalny a ich wymiary (1-5 μm długości i 0,5 μm szerokości) przypominają wymiary żyjących współcześnie bakterii.

Odkrycie ponad dwadzieścia lat temu występowania DNA w mitochondriach zapoczątkowało intensywny rozwój badań nad strukturą i funkcją mitochondrialnych genomów prowadzonych zarówno metodami genetycznymi, jak też najnowszymi technikami biologii molekularnej.

Badania nad mitochondrialnym DNA i jego ekspresją przyniosły wiele interesujących odkryć o bardziej ogólnym znaczeniu, takich jak niepełna uniwersalność znanego dotąd kodu genetycznego czy też możliwość kodowania białek przez niektóre sekwencje intronowe. Niniejszy artykuł jest więc nie tylko omówieniem struktury i funkcji mitochondrialnych genomów, lecz także szerszych implikacji tych badań.

BIOGENEZA MITOCHONDRIÓW JEST WYNIKIEM WSPÓLDZIAŁANIA MITOCHONDRIALNEGO I JĄDROWEGO GENOMU ORAZ JĄDROWEGO I CYTOSOLOWEGO SYSTEMU TRANSLACJI

Mitochondria mają swój własny system genetyczny oraz własny system translacji. Mitochondrialny DNA (mtDNA) koduje kilkanaście zaledwie białek wchodzących w skład enzymów oddechowych oraz cały rRNA i tRNA mitochondrialnego systemu translacji [24].

Replikacja mtDNA, a także jego transkrypcja zachodzi z udziałem białek kodowanych przez DNA jądrowy. Specyficzny system mitochondrialnej translacji jest także oparty na białkach kodowanych przez DNA jądrowy. Zarówno białka rybosomów mitochondrialnych (mitorybosomów), jak też wszystkie inne białka związane funkcjonalnie z translacją są zakodowane w jądrowym DNA. Podobnie również w jądrowym DNA zakodowane są mitochondrialne białka strukturalne oraz większość mitochondrialnych enzymów [44].

Mitochondria nie są więc samowystarczalne, a ich biogeneza wymaga współdziałania mitochondrialnego i jądrowego systemu genetycznego oraz mitochondrialnego i cytosolowego systemu translacji. Białka wcho-

dzące w skład mitochondriów, kodowane przez DNA jądrowy, są liczniejsze niż kodowane przez DNA mitochondrialny i stanowią ponad 90% wszystkich białek mitochondrialnych.

Informacyjny RNA (mRNA) dla białek biorących udział w biogenezie mitochondriów nie przechodzi przez błony mitochondrialne. Wszystkie białka zakodowane przez mtDNA ulegają translacji na mitorybosomach, a zakodowane przez DNA jądrowy — na rybosomach cytosolowych [24]. Mitochondrialne białka zakodowane w jądrowym DNA są więc transportowane do mitochondriów w postaci gotowych polipeptydów.

Mitochondrialny system translacji jest odmienny zarówno od eukariotycznego cytosolowego systemu translacji, jak i systemu bakteryjnego. Mitochondrialne tRNA mają odmienny skład zasad, sposób ich modyfikacji oraz strukturę przestrzenną od tRNA cytosolowych [38]. Translacja mitochondrialna, w odróżnieniu od cytosolowej, nie jest hamowana przez cykloheksymid, a wykazuje wrażliwość na chloramfenikol i erytromycynę [24]. Stosując więc ten czy inny antybiotyk można wybiórczo blokować mitochondrialny bądź jądrowy system translacji i znakuując powstające w tym czasie białka określać udział każdego z systemów w biogenezie mitochondriów.

MITOCHONDRIALNY DNA, WIADOMOŚCI OGÓLNE

1. LICZBA CZĄSTECZEK, ICH FORMA I REPLIKACJA

W haploidalnej komórce grzybów występuje przeciętnie kilkadziesiąt identycznych cząsteczek mtDNA, a genetyka mitochondriów jest genetyką populacji tych cząsteczek [19]. W komórkach zwierzęcych liczba mitochondriów wynosi kilka tysięcy. We wszystkich mitochondriach danego organizmu mtDNA jest jednakowy. Wyjątek stanowią rośliny wyższe, gdzie populacje cząsteczek mtDNA są heterogenne [34, 45, 49].

Mitochondrialny DNA, podobnie jak bakteryjny, jest podwójną helisą nie związaną z białkami. Jego replikacja jest katalizowana przez specyficzną polimerazę DNA i zachodzi niezależnie od replikacji DNA jądrowego. Mitochondrialny DNA, podobnie jak bakteryjny, jest kolisty. Wyjątek stanowią niektóre pierwotniaki, takie jak *Tetrahymena* czy *Paramecium* oraz drożdże *Hansenula mrakki*, gdzie DNA występuje w postaci linearnej. Liniowe cząsteczki oraz mieszane populacje kolistych i liniowych cząsteczek występują także u niektórych roślin wyższych [25, 45, 49].

2. ROZMIARY GENOMÓW MITOCHONDRIALNYCH

Choć wielkość przeciętnego mitochondrium jest porównywalna z wielkością *E. coli*, wielkość przeciętnego mitochondrialnego genomu jest jednak o dwa rzędy wielkości niższa. Rozmiary mitochondrialnych genomów wahają się jednak w bardzo szerokich granicach (tab. 1) [25, 34,

TABELA 1

Rozmiary mitochondrialnych genomów [45]

Organizm	kz	Metoda
zwierzęta :		
człowiek	16,569	sekwencja
mysz	16,295	sekwencja
wół	16,388	sekwencja
kurczak	16,2	dł. konturu
ukwiał	15,7	dł. konturu
muszka owocowa	16,019	sekwencja
grzyby :		
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	18	restrykcja
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84	restrykcja
<i>Aspergillus nidulans</i>	31	restrykcja
<i>Neurospora crassa</i>	62	restrykcja
<i>Podospora anserina</i>	94	restrykcja
rośliny wyższe :		
pszenica	210	reasocjacja
kukurydza	509	reasocjacja
groch	381	reasocjacja
melon	2544	reasocjacja

45, 49]. Najniższe są u zwierząt, gdzie długości kolistych cząsteczek mtDNA są u wszystkich, nawet odległych gatunków bardzo zbliżone i wynoszą około 16 000 par zasad (pz), co odpowiada ciężarowi cząsteczkowemu około 10 Md [9]. Kilkakrotnie większe rozmiary mają na ogół mitochondrialne genomy grzybów, choć rozmiary te są bardzo zróżnicowane nawet u blisko spokrewnionych gatunków drożdży (genom *S. pombe* ma wielkość zbliżoną do mitochondrialnych genomów zwierząt, a genom *S. cerevisiae* jest 5-krotnie większy). Największe rozmiary mają mitochondrialne genomy roślin wyższych, choć precyzyjne ustalenie tych rozmiarów jest trudniejsze ze względu na heterogenność cząsteczek mtDNA. Są one kilkanaście razy większe niż mitochondrialne genomy zwierząt, a u *Cucurbitaceae* nawet kilkadziesiąt razy większe [34].

W ostatnich latach w pełni zsekwencjonowano mitochondrialny genom człowieka [1], myszy [6], wołu [2] oraz muchy *Drosophila yacuba* [14]. Określono też niemal całkowicie sekwencję mtDNA takich niższych grzybów jak *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Schizosaccharomyces pombe* i *Neurospora crassa* [20]. Jak wynika z tych badań, ogromne różnice w długości mtDNA ssaków i niższych grzybów są związane nie z ilością zawartej w nich informacji, lecz ze sposobem organizacji i ekspresji tego samego podstawowego zestawu genów [49].

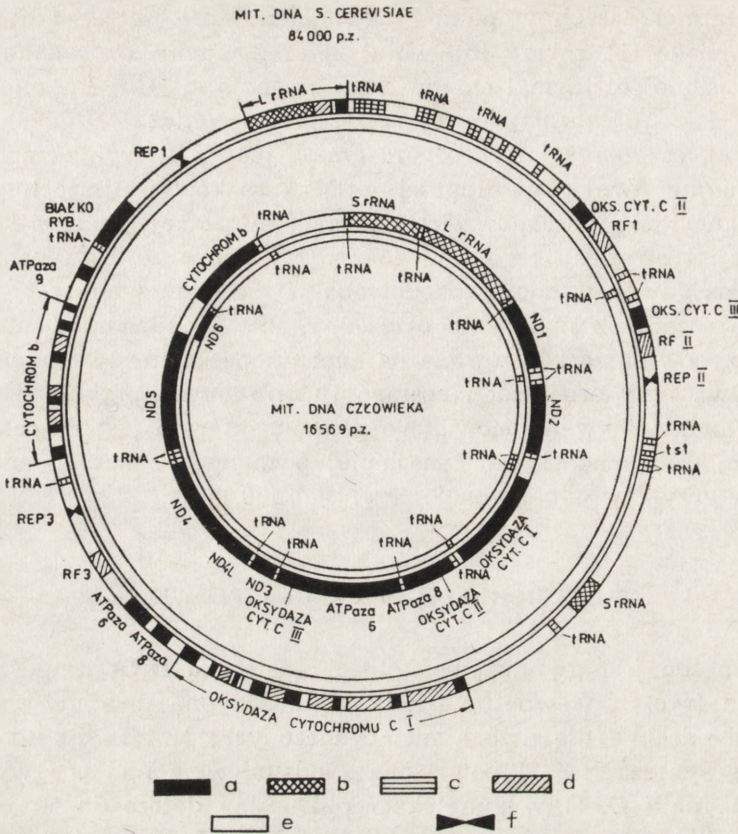
Podczas gdy informacja zakodowana w mtDNA zwierząt jest zorganizowana w sposób niezwykle oszczędny, mitochondrialne genomy niższych grzybów są zorganizowane na ogół w sposób niesłychanie rozrzutny. Te dwa typy organizacji zostaną tu opisane na przykładzie pierwszego, w pełni zsekwencjonowanego genomu, którym jest mitochondrialny genom człowieka [1, 24] i najlepiej poznanego z mitochondrialnych genomów grzybów — genomu *S. cerevisiae* [20, 31].

MITOCHONDRIALNY GENOM CZŁOWIEKA

Genom ten jest dwuniciową kolistą cząsteczką DNA długości 16 569 par zasad (ryc. 1, wewnętrzne kółko) [1]. Ma ona dwa miejsca startu replikacji odrębne dla dwóch nici oznaczonych: H i L. Replikacja zaczyna się syntezą nici H powiązaną z odsunięciem nici L i wytworzeniem tzw. pętli D. Gdy kompleks replikacyjny dotrze do znajdującego się poniżej miejsca startu replikacji nici L, odsłaniając je, rozpoczyna się synteza nici L [15].

Główną nicią kodującą, zawierającą gros informacji, jest nić H. Mimo to obie nici są w pełni transkrybowane w dwóch różnych kierunkach z dwóch różnych punktów startu, znajdujących się w obrębie pętli D [15].

Mitochondrialny genom człowieka zawiera geny determinujące rRNA małej i dużej podjednostki mitorybosomów SrRNA i LrRNA (odpowiednio 12S i 16S rRNA), 22 rodzaje tRNA oraz 13 polipeptydów będących podjednostkami czterech enzymów wchodzących w skład wewnętrznej błony mitochondrialnej. Polipeptydy te to trzy podjednostki oksydazy cytochromowej: apoproteina cytochromu b, podjednostki 6 i 8 oligomycynowrażliwej ATP-azy oraz siedem podjednostek dehydrogenazy NADH [1, 9, 13]. Oksydaza cytochromowa, mitochondrialna ATP-aza oraz wrażliwa na rotenon dehydrogenaza NADH są dużymi kompleksami enzymatycznymi złożonymi z wielu heterologicznych podjednostek zakodowanych częściowo w DNA mitochondrialnym, a częściowo w jądrowym [47]. Pozostałe, kodowane przez DNA jądrowy podjednostki tych enzymów ulegają translacji na rybosomach cytosolowych i w po-



Ryc. 1. Mapy mitochondrialnych genomów człowieka (wewnętrzne kółko) oraz *S. cerevisiae* (zewnętrzne kółko) przedstawione wg [24], uzupełnione zgodnie z [13] i [20]; a — sekwencje kodujące znane białka, b — sekwencje kodujące rRNA, c — sekwencje kodujące tRNA lub kontrolujące ich syntezę, d — pozaintronowe sekwencje RF oraz otwarte ramki odczytu intronów, e — zamknięte ramki odczytu intronów oraz obszary międzygenowe, f — sekwencje rep — inicjacji replikacji DNA

staci gotowych polipeptydów są transportowane do wewnętrznej błony mitochondrialnej.

Okazało się, że sekwencjonowanie genu jest często znacznie łatwiejsze niż jego identyfikacja. Geny ND zidentyfikowano metodami immunologicznymi jako kodujące podjednostki dehydrogenazy NADH dopiero w kilka lat po ich zsekwencjonowaniu [12, 13]. Pozostałe geny kodujące polipeptydy identyfikowano bądź na podstawie homologii ich sekwencji ze znanymi już genami drożdży, gdzie dzięki istnieniu markerów genetycznych identyfikacja genów jest łatwa, bądź też na podstawie porównania sekwencji DNA ze znanymi sekwencjami aminokwasów odpowiednich polipeptydów [1].

Badania te wykazały, że występują różnice w mitochondrialnym i uniwersalnym kodzie genetycznym (tab. 2). W szczególności kodon UGA nie jest kodonem terminacji translacji, lecz koduje tryptofan; ko-

TABELA 2
Różnice między kodem uniwersalnym a kodami mitochondrialnymi różnych organizmów przedstawione wg [46]

Kodon	Kod uniwersalny	Kod mt ssaków	Kod mt drożdży	Kod mt roślin wyż.
UGA	stop	Trp	Trp	stop?
AUA	Ile	Met	Ile	Ile
CUN	Leu	Leu	Thr	Leu
AGA, AGG	Arg	stop	Arg	Arg
CGG	Arg	Arg	Arg	Trp

donem inicjacji translacji może być nie tylko AUG, lecz także AUA lub AUU, które w mitochondriach ssaków kodują nie izoleucynę, lecz metioninę, a kodony argininowe AGA i AGG są kodonami stop [1, 7, 46].

Okazało się, że sposób rozszyfrowywania kodu genetycznego jest też w mitochondriach odrębny. Po poznaniu sekwencji mitochondrialnych tRNA wykazano, że w oddziaływaniach kodon - antykodon mogą powstawać pary U - U i U - C między pierwszą pozycją antykodonu a trzecią kodonu, gdyż większość antykodonów w mitochondrialnych tRNA zaczyna się od U [8, 26]. Powstawanie takich par w systemie cytosolowym wyklucza zasada tolerancji Cricka [17]. Dzięki bardziej elastycznym zasadom parowania kodonu z antykodonem jedna cząsteczka mitochondrialnego tRNA może rozpoznawać 4 różne kodony należące do tej samej rodziny, podczas gdy w przypadku kodu uniwersalnego jedna cząsteczka tRNA może rozpoznawać tylko dwa różne kodony tej samej rodziny. Dlatego też do jednoznacznego odczytania kodu mitochondrialnego nie konieczne są, jak to przewiduje zasada tolerancji, 32 różne rodzaje tRNA, lecz 22 rodzaje. Stąd też 22 rodzaje tRNA zakodowane w mtDNA człowieka stanowią komplet wystarczający do odczytania informacji zawartej w tym DNA [7].

Informacja zawarta w mtDNA człowieka jest zorganizowana w sposób niezwykle ekonomiczny [1]. Jest to przykład, jak można skrócić mitochondrialny genom. Tylko niewielki odcinek długości 1100 par zasad niczego nie koduje. Poza tym (ryc. 1) na skrócenie mitochondrialnego genomu człowieka ma wpływ:

(1) Brak przestrzeni niekodujących między genami w ogóle lub też ograniczenie ich do kilku zaledwie nukleotydów. W kilku przypadkach stwierdzono nawet zachodzenie na siebie niektórych genów.

(2) Brak intronów w genach.

(3) Brak nie podlegających translacji odcinków wiodących i końcowych w genach kodujących białka. mRNA tych genów rozpoczyna się bądź bezpośrednio kodonem inicjacji translacji, bądź też zaledwie kilka par zasad powyżej. W związku z tym nie wiadomo, jak zachodzi wiązanie mRNA z rybosomem (końca 5' z końcem 3' rRNA małej podjednostki) [36].

(4) Brak pełnych kodonów stop na końcu 3' u siedmiu z trzynastu genów kodujących mRNA. Zamiast kodonów stop występują tam sekwencje TA lub T, a prawidłową terminację translacji zapewnia dopiero postranskrypcyjna poliadenylacja. Dosyntetyzowanie poly A w mRNA automatycznie powoduje wytworzenie terminacyjnego kodonu ochre UAA.

Ważnymi elementami skrócenia mitochondrialnego genomu człowieka jest również:

(5) Redukcja liczby cząsteczek tRNA niezbędnych do przeprowadzenia mitochondrialnej translacji, a w związku z tym redukcja liczby genów kodujących mitochondrialne tRNA.

(6) Redukcja długości rRNA mitorybosomów, a w konsekwencji redukcja długości genów kodujących rRNA.

(7) Redukcja liczby promotorów do jednego dla każdej nici, a więc zmniejszenie miejsca zajmowanego przez sekwencje sygnałne dla inicjacji transkrypcji.

Duży pierwotny transkrypt jest następnie dalej cięty przez enzym typu endonukleaza P. Należy podkreślić, że wszystkie geny kodujące mRNA są poddzielane od siebie genami tRNA i nie tworzą tak jak u drożdży skupień. Ma to istotne znaczenie dla obróbki pierwotnego transkryptu, gdyż struktury drugorzędowe sekwencji tRNA służą jako znaki rozpoznawcze dla enzymu typu endonukleazy P obrabiającej pierwotny transkrypt [40].

Omawiane właściwości mitochondrialnego genomu człowieka są wspólne dla wszystkich dotąd sekwencjonowanych genomów ssaków, a także dla genomu muszki owocowej *D. yakuba*.

MITOCHONDRIALNY GENOM DROŻDZY

Mitochondrialny genom *S. cerevisiae* jest kolistą cząsteczką dwuniciowego DNA długości od 78 do 84 000 par zasad w zależności od szczepu [51]. W haploidalnej komórce występuje ona w 20 do 30 kopiach. O jej replikacji wiadomo mało, lecz stwierdzono, że w przeciwieństwie do mtDNA zwierząt jest wiele miejsc startu replikacji, zwanych sekwencjami rep lub ori [3], dla jednej nici.

Jest także wiele miejsc startu transkrypcji (około 20), choć transkrypty są policistronowe i wymagają dalszej obróbki [42, 48]. Transkrypcja jest asymetryczna. Jedna nić, w której zakodowane jest gros informacji, ulega transkrypcji niemal w całości, a druga w niewielkim tylko stopniu [42].

Mapę mitochondrialnego genomu drożdży przedstawia zewnętrzne kółko na ryc. 1. Ustalono ją na podstawie mapowania genetycznego mutantów i mapowania restrykcyjnego, a następnie skonfrontowano z danymi uzyskanymi na podstawie sekwencjonowania genomu. Genom ten jest w ponad 90% zsekwencjonowany tak, że prawdopodobnie wszystkie geny są już poznane, a niewielkie luki występują w sekwencjach obszarów międzygenowych [51].

Identyfikowanie genów drożdżowych było stosunkowo łatwe ze względu na występowanie w nich licznych nieletalnych mutacji. Tak np. w genach kodujących podjednostki oligomycynowrażliwej ATP-azy mapują się mutacje oporności na ten antybiotyk, w genie kodującym dużą podjednostkę rRNA mapuje się wiele mutantów opornych na inhibitory mitochondrialnej translacji, a w genach kodujących podjednostki oksydazy cytochromowej mapują się mutanty oddechowe nie wykazujące w widmie oksydazy cytochromowej itd.

Mitochondrialny genom drożdży, podobnie jak człowieka, koduje dużą (21S) i małą (15S) podjednostkę rRNA, komplet (25) cząsteczek tRNA potrzebny do mitochondrialnej syntezy białek, trzy największe podjednostki oksydazy cytochromowej, apoproteinę cytochromu b oraz podjednostki 6 i 8 ATP-azy [20, 31].

Mitochondrialny genom drożdży koduje jeszcze ponadto podjednostkę 9 ATP-azy, jedno z białek małej podjednostki mityriosomów (gen var 1) oraz 9S RNA wchodzący w skład enzymu typu endonukleazy P odpowiedzialnego za obróbkę końców 5' pierwotnych transkryptów mitochondrialnych tRNA (gen ts1) [20, 31, 39].

W wyniku sekwencjonowania zidentyfikowano także kilka sekwencji rep lub ori (po około 300 pz każda) i trzy sekwencje RF, będące otwartymi ramkami odczytu o nieznanym celu [20, 31].

W przeciwieństwie do mitochondrialnego genomu człowieka mitochondrialny genom drożdży nie koduje podjednostek dehydrogenazy NADH. Niezidentyfikowane trzy geny RF nie mogą być odpowiednikami genów ND człowieka, gdyż nie wykazują w stosunku do nich żadnych homologii sekwencji. Brak genów ND u drożdży jest raczej wyjątkiem niż regułą. W mitochondrialnych genomach innych niższych grzybów, takich jak *N. crassa* i *A. nidulans*, geny te prawdopodobnie występują [10, 48]. Nie jest wykluczone, że u drożdży występują one w jądrze lub też że w związku z pewną odmiennością łańcucha oddechowego drożd-

dży na poziomie kompleksu dehydrogneazy NADH [41] odpowiednie geny i polipeptydy nie występują u tego organizmu w ogóle.

Z przedstawionych tu danych widać, że ilość informacji zakodowanej w mtDNA drożdży nie jest większa, a być może jest nawet mniejsza niż w mtDNA człowieka, mimo że jest ona zawarta w 4 razy większej przestrzeni.

Rozrzutna organizacja mitochondrialnego genomu drożdży wiąże się z:

(1) Istnieniem przestrzeni międzygenowych, które stanowią około 66% cząsteczki. Składają się one w 98% z par AT, wśród których rozrzuconych jest sto kilkadziesiąt skupisk GC, często homologicznych, tworzących struktury palindromowe [51].

(2) Faktem, że trzy z genów — gen kodujący apoproteinę cytochromu b, podjednostkę I oksydazy cytochromowej oraz 21S rRNA zawierają introny (odpowiednio 5, 8 i 1 intron). Długość intronów w dwóch pierwszych genach przewyższa wielokrotnie długość eksonów.

(3) Wyjątkowo długimi sekwencjami wiodącymi i końcowymi w mRNA.

(4) Dwukrotnie dłuższymi genami kodującymi rRNA.

(5) Długimi sekwencjami sygnalnymi dla inicjacji transkrypcji.

Podobnie rozrzutnie zorganizowane są na ogół genomy innych grzybów, choć ich rozmiary, a więc upakowanie informacji genetycznej na jednostkę długości DNA może wykazywać duże różnice [25]. Różnice między genomami różnych niższych grzybów nie ograniczają się jednak tylko do różnych rozmiarów sekwencji niekodujących, lecz także polegają na odmiennym wzajemnym ułożeniu genów. Duże różnice w organizacji mitochondrialnych genomów nawet blisko spokrewnionych gatunków niższych grzybów sugerują istnienie działającego w mitochondriach mechanizmu powodującego duplikacje, transpozycje i insercje części mtDNA [30].

Niestabilność mtDNA niższych grzybów nie ogranicza się jedynie do przemieszczeń w obrębie mitochondrialnych genomów. Wiele danych wskazuje na wymianę materiału genetycznego między DNA mitochondrialnym a jądrowym. Świadczy o tym m. in. fakt, że podjednostka 9 ATP-azy jest zakodowana u *S. cerevisiae* w mtDNA i podlega translacji na mitorybosomach, podczas gdy u *Neurospora* jest zakodowana w jądrze i podlega translacji na rybosomach cytosolowych, choć w mitochondriach znajduje się nieczynna kopia genu podjednostki 9 [25]. Jądrowa i mitochondrialna kopia tego genu występuje także u *Aspergillus*, gdzie — jak się wydaje — jedna lub druga kopia może ulegać translacji w zależności od fazy rozwoju [10]. Podobnie o wymianie DNA między mitochondriami a jądrem u niższych grzybów świadczy fakt znalezienia w jądrowym DNA *S. cerevisiae* sekwencji komplementarnych do frag-

mentów mitochondrialnych genów *var1* oraz *cob-box* [21]. Wymiana materiału genetycznego między jądrem a mitochondriami towarzyszy procesom starzenia się grzybni *Podospora anserina* [50] i *Neurospora crassa* [5].

MITOCHONDRIALNE GENOMY ROŚLIN WYŻSZYCH

Najmniej dotąd wiadomo o mitochondrialnych genomach roślin wyższych. Są one na ogół heterogenne, tj. zawierają kilka różnych cząsteczek mtDNA. U niektórych roślin spotyka się mieszane populacje cząsteczek liniowych i kolistych oraz populacje mniejszych i większych kółek. Często większe kółka są dimerami mniejszych monomerycznych elementów, ale nie jest to regułą. Różnej wielkości kółka nie muszą mieć wspólnych elementów. Wydaje się więc, że mitochondrialne genomy roślin wyższych, podobnie jak jądrowe genomy eukariontów, mogą być rozmieszczone na wielu różnej wielkości elementach [34, 49].

Genomy mitochondrialne roślin wyższych, podobnie jak grzybów czy ssaków, zawierają prawdopodobnie małą liczbę genów. Podobnie jak tamte mitochondrialne genomy kodują one tRNA, rybosomalne rRNA, trzy podjednostki oksydazy cytochromowej, apocytochrom b oraz kilka podjednostek ATP-azy. Stwierdzono, że mitochondria kukurydzy włączają radioaktywne aminokwasy do ponad 20 różnych polipeptydów [22]. Wydaje się więc, że mitochondrialne genomy roślin wyższych mogą kodować trochę większą liczbę produktów. Jedynymi jednak, jak dotąd, zidentyfikowanymi genami występującymi w mitochondrialnych genomach roślin wyższych, a nie występującymi w mitochondrialnych genomach grzybów i ssaków, są geny kodujące podjednostkę niebłonowej części ATP-azy, tzw. F1 alfa oraz gen kodujący 5S rRNA [34].

Choć wydaje się, że mitochondrialne genomy roślin wyższych mogą zawierać więcej genów, to ilość informacji na jednostkę długości DNA jest tu na pewno jeszcze znacznie niższa niż u grzybów. Stwierdzono również występowanie w tych genomach licznych sekwencji repetytywnych. Podobnie jak mitochondrialne geny grzybów, mitochondrialne geny roślin wyższych mogą zawierać introny [48].

BIAŁKA KODOWANE PRZEZ DODATKOWY ZESTAW GENÓW MITOCHONDRIALNYCH

Z przedstawionych dotychczas danych wynika, że istnieją dwa zasadnicze typy mitochondrialnych genomów różniące się w sposób podstawowy organizacją i płynnością tej organizacji. Jeden u *Metazoa*, drugi u pozostałych organizmów [30, 49].

Omówiono dotąd podstawowy zestaw genów mitochondrialnych, występujący u wszystkich eukariontów. Niższe eukarionty i rośliny wyższe mają w mitochondrialnych genach introny, a w co najmniej połowie z nich otwarte ramki odczytu (ORF). Mają też dodatkowo zestaw genów znajdujący się w intronach. Odkrycie to było sensacją, gdyż z definicji introny są częściami genów niekodującymi białek. W genach jądrowych introny nie mają na ogół ORF.

Kodowane przez introny mitochondrialnych genów białka występują normalnie w komórkach w minimalnych ilościach, gdyż ich produkcja ustaje w momencie wycięcia intronu. Wspólną cechą białek kodowanych przez introny jest ich powinowactwo do kwasów nukleinowych DNA i RNA. Białka te mają aktywności enzymów związanych z DNA lub RNA — maturaz, transpozaz, rekombinaz i być może odwrotnych transkryptaz [30].

1. MATURAZY

Podstawowym mechanizmem wycinania intronów w mtDNA jest najprawdopodobniej (podobnie jak w genie jądrowym dla rRNA u *Tetrahymena*) katalizowana przez RNA transestryfikacja, na co wskazuje fakt, że wiele mitochondrialnych intronów może ulegać samoskładaniu in vitro [27, 43]. In vivo jednak, a w wielu wypadkach także i in vitro wycinanie mitochondrialnych intronów wymaga białkowych czynników wspomagających zakodowanych jądrowo bądź mitochondrialnie.

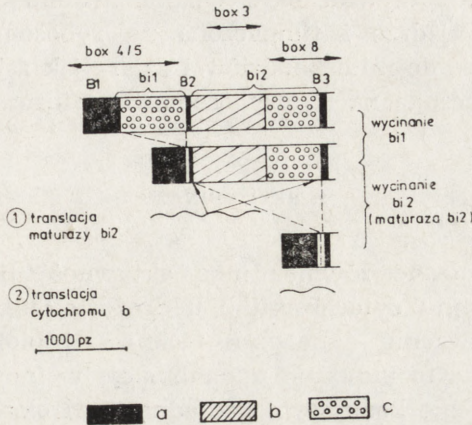
W przypadku intronów zawierających ORF czynniki te są zakodowane najczęściej w tychże ORF. Są to maturazy. Wycinają one introny przez które są kodowane. Ich produkcja w szczepie typu dzikiego podlega więc negatywnej inibicji zwrotnej. Z momentem wyprodukowania maturazy intron ją kodujący jest natychmiast wycięty (ryc. 2) [35]. Dlatego też wykrywanie maturaz metodami elektroforetycznymi na żelach poliakrylamidowych było możliwe tylko w szczepach mutantów zawierających mutacje w intronach, tj. w szczepach, gdzie matryca do produkcji maturazy nie była niszczone i maturaza była produkowana konstytutywnie.

Obecnie udowodniono istnienie dwóch maturaz w genie dla białka cytochromu b u *S. cerevisiae* [28, 35, 48]. Istnieją także dane potwierdzające występowanie trzech maturaz w genie kodującym podjednostkę I oksydazy cytochromowej u tego organizmu [11, 48].

Aktywności maturaz mogą być monotropowe lub pleiotropowe, tj. maturazy mogą wycinać tylko te introny, przez które są kodowane, lub też dwa różne introny w tych samych lub różnych genach.

Maturazy mogą być kodowane wyłącznie przez ORF intronów lub

też mogą być białkami mieszańcowymi, kodowanymi częściowo przez ORF intronów, a częściowo też przez położone powyżej sekwencje eksonowe.



Ryc. 2. Model wycinania intronów bi1 oraz bi2 genu kodującego białko cytochromu b u *S. cerevisiae* według [35], przedstawiony schematycznie za [31]. Pierwszy intron (bi1) jest wycinany bez udziału mitochondrialnych białek (pod kontrolą enzymów jądrowych lub autokatalitycznie). Połączone dwa pierwsze eksony B1 i B2 wraz z otwartą ramką odczytu intronu bi2 kodują eksonowo-intronowe mieszańcове białko, tzw. maturazę bi2, konieczną do wycięcia intronu bi2; a — eksony, b — otwarte ramki odczytu intronów, c — zamknięte ramki odczytu intronów

Na istnienie maturaz wskazywał fakt, że mutacje terminacji translacji w ORF intronów blokowały wycinanie intronów, a zlokalizowane w innych genach mutacje supresorowe, działające w drodze przywracania pełnej translacji ORF intronów, przywracały wycinanie intronów [32, 35]. Na istnienie maturaz wskazywały też wczesne badania genetyczne komplementacji mutantów zawierających mutacje w intronach genu białka cytochromu b oraz badania produktów translacji tych mutantów [31, 33].

Ostatnio wyizolowano i częściowo oczyszczono maturazę intronu bi4 genu kodującego białko cytochromu b u drożdży [18]. W serii eleganckich eksperymentów, ORF intronu bi4 podłączono do części genu lacZ *E. coli* i promotora faga lambda. Tę konstrukcję sklonowano w *E. coli*. Uzyskano tam ekspresję maturazy, wyizolowano ją i otrzymano odpowiednie przeciwciała. Te przeciwciała reagowały specyficznie z odpowiednim polipeptydem będącym hipotetyczną maturazą bi4, nagromadzającą się u mutantów w intronie bi4 [18, 28].

Uzyskanie przeciwciał przeciwko maturazie bi4 pozwoliło na wyizolowanie i częściowe oczyszczenie maturazy z drożdży i stwierdzenie jej powinowactwa do jednoniciowego DNA i RNA [18].

Gen maturazy bi4 wprowadzono ostatnio także do jądra zmutowanych szczepów drożdży niezdolnych do wycinania intronu bi4 wskutek przedwczesnej terminacji translacji mitochondrialnej maturazy [4]. Wprowadzenie tego genu przywracało wycinanie intronu bi4, co świadczyło, że zakodowana w jądrze i tłumaczona na rybosomach cytosolowych maturaża dostaje się do mitochondriów i działa jak zakodowana w mitochondriach i tłumaczona na mitorybosomach maturaża natywna.

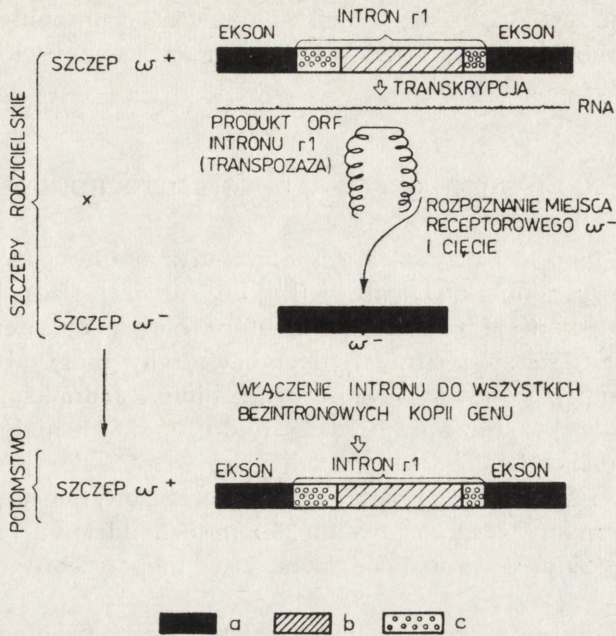
2. REKOMBINAZY

Ostatnio stwierdzono również inną aktywność białka kodowanego przez intron bi4 genu cytochromu b u drożdży [30]. Stosując metody genetyczne w połączeniu z nowymi technikami biologii molekularnej wykazano, że białko to indukuje rekombinację w innym mitochondrialnym genie, tj. w genie kodującym podjednostkę I oksydazy cytochromowej. Indukcja tej rekombinacji, zwiększająca 1000-krotnie jej częstość, następowała u mutantów, u których nagromadzał się produkt intronu bi4. Nie wiadomo, jaka jest zależność między aktywnością maturazy i rekombinazy tego samego białka kodowanego przez intron bi4. Badania są w toku.

3. TRANSPOZAZY

Nie wszystkie jednak ORF mitochondrialnych intronów kodują białka o aktywnościach maturaz. Produkt ORF intronu genu kodującego RNA dużej podjednostki mitorybosomów u drożdży nie jest konieczny do wycinania tego intronu, zwanego intronem r1. Omawiany intron występuje tylko w szczepach ω^+ , podczas gdy w szczepach ω^- gen 21S rRNA jest niepodzielony. W krzyżówkach między szczepami $\omega^+ \times \omega^-$ całe potomstwo jest ω^+ , tzn. zawiera intron (ryc. 3). Intron r1 zachowuje się więc jak infekcyjny transpozowalny element, z tym że jest włączany stale w tym samym miejscu do genu 21S rRNA, tzw. miejscu ω^- , dokładnie na granicy intron - ekson. Analiza mutantów zawierających mutacje w ORF intronu r1 wykazała, że produkt tej ORF jest niezbędny do transpozycji intronu [29]. Indukuje on dwuniciowe pęknięcia in vivo w DNA ω^- , rozpoznając specyficzne sekwencje w miejscu włączenia intronu.

Genetyczną konstrukcją zawierającą ORF intronu r1 transformowano *E. coli*. Ulegała ona tam ekspresji, wykazując aktywność endonukleazy. Białko to nazwano transpozazą [16].



Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie rozprzestrzeniania się intronu r1, genu 21S rRNA w potomstwie krzyżówek szczepów $\omega^+ \times \omega^-$, według mechanizmu postulowanego przez A. Jacquiera i B. Dujona, Cell, 41: 383-394, 1985 (rycina zmodyfikowana)

Włączenie intronu, w którego wyniku szczep ω^- zamienia się w szczep ω^+ , następuje w tzw. punkcie ω^- ; a — eksony, b — otwarta ramka odczytu intronu (ORF), c — zamknięte ramki odczytu intronu

4. ODWROTNE TRANSKRYPTAZY

Stwierdzono, że niektóre ORF intronów wykazują znaczne homologie sekwencji do sekwencji retrowirusów kodujących odwrotne transkryptazy [37]. Wprawdzie nie udowodniono, że białka te mają aktywność odwrotnych transkryptaz, ale jest wiele danych na to, że aktywności takie w mitochondriach drożdży występują i mogą być odpowiedzialne za obserwowane zjawisko stosunkowo częstego spontanicznego wypadania intronów z DNA [23].

Z przedstawionych danych wynika, że w intronach genów mitochondrialnych jest zakodowana specjalna grupa białek pełniących nadrzedną rolę w stosunku do kwasów nukleinowych [30]. Białka te indukując różnego typu rekombinacje w mtDNA odpowiedzialne byłyby za płynność organizacji mitochondrialnych genomów niższych eukariontów i roślin. Metazoa, które w drodze ewolucji wyeliminowały introny,

a więc i drugi zestaw genów, straciły możliwość gruntownych reorganizacji mitochondrialnych genomów i dlatego ich genomy mają podobną organizację [30].

DLACZEGO ISTNIEJE ODREBNY GENOM MITOCHONDRIALNY?

Dlaczego komórka zużywa energię na utrzymanie odrębnego mitochondrialnego genomu do syntezy kilkunastu najwyżej białek mitochondrialnych? Istnieje pogląd, że niektóre białka wewnętrznej błony mitochondrialnej są zbyt silnie hydrofobowe, aby mogły być produkowane na zewnątrz i transportowane przez błony. Jednakże, jak to podkreśla Grivell [24], jedno z najbardziej hydrofobowych białek wewnętrznej błony mitochondrialnej — podjednostka 9 ATP-azy jest u zwierząt i *Neurospora* zakodowana przez jądro, syntetyzowana na rybosomach cytoplazmatycznych i importowana do mitochondriów. Jeśli odrębny system genetyczny w mitochondriach jest niepotrzebny to dlaczego istnieje?

Najbardziej prawdopodobne wyjaśnienie tego problemu proponowane przez Borsta i Grivella oparte jest na endosymbiotycznej teorii pochodzenia mitochondriów, utrzymującej, że mitochondria wywodzą się od przodków współczesnych eubakterii, które, gdy atmosfera wzbogaciła się w tlen, wkroczyły do komórek praeukariontów, umożliwiając im oddychanie tlenowe w zamian za schronienie i pożywienie. Mitochondrialny DNA byłby ewolucyjnym ślepym końcem, reliktem przypuszczalnej symbiotycznej bakterii. We wczesnych etapach ewolucji były słabe bariery do przechodzenia informacji z systemu genetycznego endosymbionta do systemu genetycznego gospodarza tak, że większość genów endosymbionta przeszła do genomu gospodarza. W miarę jak komórka eukariotyczna stawała się coraz bardziej skomplikowana, jej DNA został zlokalizowany w wyodrębnionym jądrze i zorganizowany w chromosomy, a jądrowy i mitochondrialny kod ulegał dywergencji, dalszy przepływ genów malał, a w końcu stał się niemożliwy. Nieliczne geny zostały uwięzione w mitochondriach. Będąc bardzo istotnymi przetrwały [24].

Hipoteza ta dobrze tłumaczy fakt, że niektóre enzymy mitochondrialne zakodowane w jądrze są podobne do bakteryjnych. Przewiduje ponadto, że niektóre geny będą znajdować się w DNA mitochondrialnym jednego organizmu a w DNA jądrowym innego, jak też sytuacje pośrednie, gdy kopie danego genu będą znajdować się zarówno w DNA jądrowym, jak i mitochondrialnym. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku podjednostki 9 ATP-azy.

Hipoteza ta przewiduje również, że niektóre mitochondrialne DNA

mogą zawierać więcej genów niż w zestawie podstawowym niższych eukariontów i zwierząt. Takimi mtDNA są prawdopodobnie mitochondrialne genomy roślin wyższych.

LITERATURA

- [1] ANDERSON S., BANKIER A. T., BARREL B. C., de BRUIJN M. H. L., COULSON A. R., DROUIN J., EPERON I. C., NIERLICH D. P., ROE B. A., SANGER F., SCHREIDER P. H., SMITH A. J. H., STODEN R., YOUNG I. C., Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, **290**: 457 - 465, 1981.
- [2] ANDERSON S., de BRUIJN M. H. L., COULSON A. R., EPERON I. C., SANGER F., YOUNG I. G., The complete sequence of bovine mitochondrial DNA: conserved features of the mammalian mitochondrial genome, *J. Molec. Biol.*, **156**: 683 - 719, 1982.
- [3] BALDACCI G., CHERIF-ZACHAR B., BERNARDI G., The initiation of DNA replication in the mitochondrial genome of yeast, *EMBO J.*, **3**: 2115 - 2120, 1984.
- [4] BANROQUES J., DELAHODDE A., JACQ C., A mitochondrial RNA maturase gene transferred to the yeast nucleus can control mitochondrial mRNA splicing, *Cell*, **46**: 837 - 844, 1986.
- [5] BERTRAND H., CHAN B. S., GRIFFITS A. J. F., Insertion of a foreign nucleotide sequence into mitochondrial DNA causes senescence in *Neurospora intermedia*, *Cell*, **41**: 877 - 883, 1985.
- [6] BIBB M. J., Van ETEN R. A., WRIGHT C. T., WALBERG M. W., CLAYTON D. A., Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA, *Cell*, **26**: 167 - 180, 1981.
- [7] BOGUTA M., PUTRAMENT A., Specyfika genomów mitochondrialnych. Kod genetyczny nie jest uniwersalny, *Kosmos*, **186**: 67 - 88, 1985.
- [8] BONITZ S. G., BERLANI R., CORUZZI G., MACINO G., TZAGOLOFF A., Codon recognition rules in yeast mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 3167 - 3170, 1980.
- [9] BORST P., GRIVELL L., Small is beautiful-portrait of a mitochondrial genome, *Nature*, **290**: 443 - 444, 1981.
- [10] BROWN T. A., WARING R. B., SCAZZOCCHIO C., DAVIES R. W., The *Aspergillus nidulans* mitochondrial genome, *Curr. Genet.*, **9**: 113 - 117, 1985.
- [11] CARIGNIANI G., GROUDINSKY O., FREZZA D., BERGANTINO E., SŁONIMSKI P. P., An mRNA maturase is encoded by the first intron of the mitochondrial gene for the subunit I of cytochrome oxidase in *S. cerevisiae*, *Cell*, **35**: 733 - 742, 1983.
- [12] CHOMYN A., MARIOTINI P., CLEETER M. W. J., RAGAN C. J., MATSUNO-YAGI A., HATEFI Y., DOOLITTLE R. F., ATTARDI G., Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of respiratory-chain NADH dehydrogenase, *Nature*, **314**: 592 - 597, 1985.
- [13] CHOMYN A., MARIOTINI P., CLEETER N. W. J., RAGAN C. J., DOOLITTLE R. F., MATSUNO-YAGI Y., HATEFI Y., ATTARDI G., Functional assignment of the products of the unidentified reading frames of human mitochondrial DNA, [W] Achievements and perspectives in Mitochondrial Research, vol. 2,

- Quagliariello E., Slater E. C., Palmeri F., Saccone C., Kroon A. M., red., Amsterdam, Elsevier, 1985, 277 - 284.
- [14] CLARY D. O., WOLSTENHOLME D. R., The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yacuba*: Nucleotide sequence, gene organization and genetic code, *J. Mol. Evol.*, **22**: 252 - 271, 1985.
- [15] CLAYTON D. A., Replication of animal mitochondrial DNA, *Cell*, **28**: 693 - 705, 1982.
- [16] COLLEAUX L., d'AURIOL L., BETERMIER M., COTTAREL G., JACQUIER A., GALIBERT F., DUJON B., Universal code equivalent of a yeast mitochondrial intron reading frame is expressed into *E. coli* as a specific double strand endonuclease, *Cell*, **44**: 521 - 533, 1986.
- [17] CRICK F. H. C., Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis, *J. Molec. Biol.*, **19**: 548 - 555, 1966.
- [18] DELAHODDE A., BANROQUES J., BECAM A. M., GOGUEL V., PERCA J., SCHROEDER R., JACQ C., Purification of yeast bI4 mRNA maturase from *E. coli* and from yeast. Nucleic acid binding properties, [W] Achievements and perspectives in Mitochondrial Research, vol. 2, Quagliariello E., Slater E. C., Palmeri F., Saccone C., Kroon A. M., red. Amsterdam, Elsevier 1985, 1 - 20.
- [19] DUJON B., SŁONIMSKI P. P., WEIL L., Mitochondrial genetics IX. A model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in *S. cerevisiae*, *Genetics*, **78**: 415 - 435, 1974.
- [20] DUJON B., Mitochondrial genes, mutants, maps, [W] Mitochondria 1983. Nucleo-mitochondrial interactions red. Schweyen R. J., Wolf K., Kaudewitz F., de Greuter, Berlin, 1983, 1 - 24.
- [21] FARRELLY B. G. R., BUTOW R., Rearranged mitochondrial genes in the yeast nuclear genome, *Nature*, **301**: 296 - 301, 1983.
- [22] FORDE B. G. R., OLIVER R. J., LEAVER C. J., Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasms in maize, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 3841 - 3845, 1978.
- [23] GARGOURI A., ŁAZOWSKA J., SŁONIMSKI P. P., DNA splicing of introns in the gene: A general way of reverting intron mutations, [W] Mitochondria 1983. Nucleo-mitochondrial interactions. red. Schweyen R. J., Wolf K., Kaudewitz F. de Gruyter, Berlin 1983, 259 - 268.
- [24] GRIVELL L. A., Mitochondrial DNA, *Sci. Amer.*, **248**: 60 - 64, 1983.
- [25] GROSSMAN L., HUDSPETH M. E. S., Fungal Mitochondrial Genomes, [W] Gene Manipulations in Fungi, Academic Press 1985, 65 - 103.
- [26] HECKMAN J., Novel features in the genetic code and codon reading patterns in *Neurospora crassa* mitochondria based on sequence of six mitochondrial tRNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 3159 - 3163, 1980.
- [27] van der HORST G. T. J., TABAK H. F., Self splicing of yeast mitochondrial ribosomal and messenger RNA precursors, *Cell*, **40**: 759 - 766, 1985.
- [28] JACQ C., BANROQUES J., BECAM A. M., SŁONIMSKI P. P., DANCHIN A., GUISO A., Antibodies against fused lac-Z mitochondrial intron gene product allow identification of the mRNA maturase encoded by the fourth intron of the yeast cob-box gene, *EMBO J.*, **3**: 1567 - 1572, 1984.
- [29] JACQUIER A., DUJON B., An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene, *Cell*, **41**: 383 - 394, 1985.
- [30] KOTYLAK Z., ŁAZOWSKA J., SŁONIMSKI P. P., Intron encoded protein of mitochondria: Key elements of gene expression and genomic evolution,

- [W] Achievements and perspectives in Mitochondrial Research, vol. 2, Quagliariello E., Slater E. C., Palmeri F., Saccone C., Kroon A. M., red. Amsterdam, Elsevier 1985, 1 - 20.
- [31] KRUSZEWSKA A., Struktura i funkcja mitochondrialnego genomu *Saccharomyces cerevisiae*, Post. Microbiol., **26**: 155 - 187, 1987.
- [32] — Supresory mutacji mitochondrialnych u *Saccharomyces cerevisiae*, Post. Mikrobiol., w druku.
- [33] LAMOUREUX A., PAJOT P., KOCHKO A., HALBREICH A., SŁONIMSKI P. P., Cytochrome b messenger RNA maturase encoded in an intron regulates the expression of the mitochondrial split gene, [W] The organization and expression of the mitochondrial genome, red. Kroon A., Saccone C., Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1980, 153 - 163.
- [34] LEAVER C. J., HACK E., DAWSON A. J., ISAAC P. G., JONES V. P., Mitochondrial genes and their expression in higher plants, [W] Mitochondria 1983. Nucleo-mitochondrial interactions, red. Schweyen R., Wolf K., Kaudewitz F. de Gruyter, Berlin 1983, 269 - 283.
- [35] ŁAZOWSKA J., JACQ C., SŁONIMSKI P. P., Sequence of intron and flanking exons in wild type and box mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron, Cell, **22**: 333 - 348, 1980.
- [36] MONTOYA J., OJALA D., ATTARDI G., Distinctive features of the 5' terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs, Nature, **290**: 465 - 470, 1981.
- [37] MICHEL F., LANG B. F., Mitochondrial class II introns encode proteins related to the reverse transcriptases of retroviruses, Nature, **316**: 641 - 643, 1985.
- [38] MILLER D., MARTIN N. C., PHAM H. D., DONELSON J. E., Sequence analysis of two yeast mitochondrial DNA fragments containing the genes for tRNA^{ser} and tRNA^{phe}, J. Biol. Chem., **254**: 11735 - 11740, 1979.
- [39] MILLER D., UNDERBRINK-LYON K., NAJARIAN D. R., KRUPP J., MARTIN N. C., Transcription of yeast mitochondrial tRNAs genes and processing of tRNA gene transcripts, [W] Mitochondria 1983. Nucleo-mitochondrial interactions, red. Schweyen R., Wolf K., Kaudewitz F. de Gruyter, Berlin 1983, 151 - 159.
- [40] OJALA D., MONTOYA J., ATTARDI G., tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria, Nature, **290**: 470 - 475, 1981.
- [41] OHNISHI T., Mechanism of electron transport and energy conservation in the site I of the respiratory chain, Biochem. Biophys. Acta, **301**: 105 - 128, 1973.
- [42] OSINGA K. A., De VRIES E., Van der HORST G. T. J., TABAK H. F., Initiation of transcription in yeast mitochondria: analysis of origins of replication and of genes coding for messenger RNA and transfer RNA, Nucl. Acids Res., **12**: 1889 - 1900, 1984.
- [43] PEEBLES C. L., PERLMAN P. S., MACLENBURG K. L., PERILO M. L., TABOR J. M., JARELL K. A., CHENG M. L., A self-splicing RNA excises an intron lariat, Cell, **44**: 213 - 223, 1986.
- [44] SCHATZ G., MASON T. L., The biogenesis of mitochondrial proteins, Ann. Rev. Biochem., **43**: 51 - 92, 1974.
- [45] SEDEROFF R. R., Structural variations in mitochondrial DNA, Adv. Genet., **22**: 1 - 108, 1984.
- [46] STEPIEŃ P., Ewolucja genomów mitochondrialnych, Post. Mikrobiol., **22**: 2 - 28, 1983.
- [47] TZAGOLOFF A., Mitochondria, Plenum Press, New York, 1982.

- [48] TZAGOLOFF A., MYERS A. M., Genetics of mitochondrial biogenesis, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**: 249 - 285, 1986.
- [49] WALLACE D. C., Structure and evolution of organelle genomes, *Microbiol. Rev.*, **46**: 208 - 240, 1982.
- [50] WRIGHT R. H., CUMMINGS D. J., Integration of mitochondrial gene sequences within the nuclear genome during senescence in a fungus, *Nature*, **302**: 86 - 88, 1983.
- [51] ZAMAROCZY M., BERNARDI G., Sequence organization of the mitochondrial genome of yeast — a review, *Gene*, **37**: 1 - 17, 1985.

Otrzymano: 24 grudnia 1987.

Przyjęto: 1 lutego 1988.

Adres autorek: Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.

MAŁE CZĄSTECZKI DNA WYSTĘPUJĄCE W MITOCHONDRIACH ROŚLIN WYŻSZYCH

THE SMALL DNA MOLECULES PRESENT IN THE MITOCHONDRIA OF HIGHER PLANTS

Rafał GORĄCZNIK, Halina AUGUSTYNIAK

Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Wydział Biologii, Poznań
Zakład Biochemii Biopolimerów

Streszczenie. Mitochondria wielu roślin wyższych zawierają oprócz podstawowego genomu, małe cząsteczki DNA. Cząsteczki te nazwano mitochondrialnymi plazmidami, ponieważ występują one w większej liczbie kopii niż typowo unikatowe segmenty mitochondrialnego DNA. W niniejszej pracy opisano i scharakteryzowano małe, plazmidopodobne cząsteczki DNA wykryte w mitochondriach roślin wyższych. Przedstawiono dane wskazujące na ewentualne zaangażowanie niektórych z nich w powstawaniu cytoplazmatycznej męskiej sterylności oraz w przegrupowaniu sekwencji mitochondrialnego genomu. Dyskutuje się problem pochodzenia tych cząsteczek.

Summary. In addition to the main genome, the mitochondria of many higher plants contain small DNA molecules. These molecules are known as mitochondrial plasmids because they are present at a higher copy number than a typical unique segments of the mitochondrial DNA. In this paper a small, plasmid-like DNAs found in mitochondria of higher plants are described and characterized. The evidence indicating on the possible involvement some of them in the cytoplasmic male sterility and in the rearrangement of the mitochondrial genome is presented. The origin of these DNA species is discussed.

WYKAZ SKRÓTÓW

- mtDNA — mitochondrialny DNA
ctDNA — chloroplastowy DNA
cms — rośliny cytoplazmatycznie męskosterylne
pz — pary zasad
kpz — kilo pary zasad

WSTĘP

Zainteresowanie organizacją genomu mitochondrialnego u roślin wzrosło znacznie od kiedy stwierdzono, że zmiany w obrazie fragmentów restrykcyjnych mitochondrialnego DNA (mtDNA) można skorelować z występowaniem cechy męskiej sterility kukurydzy. Równie stymulujące do dalszych systematycznych badań było odkrycie, że wielkość, forma fizyczna i organizacja genów mtDNA roślin są bardzo zróżnicowane. Obecnie wiadomo, że wielkość mtDNA roślin wyższych waha się od około 200 do 2500 kpz [40]. Duże różnice wielkości cząsteczek mitochondrialnego DNA daje się zauważyć nawet u roślin blisko ze sobą spokrewnionych, np. mtDNA *Cucumis melo* (2500 kpz) jest ponad 7-krotnie większy od mtDNA *Cucurbita citrullus* (343 kpz) [79]. Pomimo tak znacznego zróżnicowania w wielkości mtDNA większego niż u ssaków, drożdży czy grzybów, informacja genetyczna w nich zawarta jest podobna. Dotychczas zidentyfikowano mitochondrialne geny kodujące rRNA, tRNA a także kilka polipeptydów, których większość stanowią silnie hydrofobowe podjednostki enzymów łańcucha oddechowego. Rybosomalne RNA mitochondriów roślinnych są większe, a ich geny zorganizowane odmiennie niż u ssaków, grzybów czy drożdży. Geny dwóch wysokocząsteczkowych rRNA — 18S i 26S są oddalone od siebie, a gen 5S rRNA występuje w pobliżu genu 18S rRNA [4, 28, 68]. Liczba kopii genów rRNA jest zmienna w zależności od rośliny [18, 19, 38, 70]. Geny tRNA są natomiast rozproszone wzdłuż całego genomu, tworząc niewielkie zgrupowania w rejonach genów 18S rRNA i 5S rRNA [4, 30]. Wszystkie poznane dotychczas geny tRNA wykazują bardzo wysoki procent homologii z odpowiednimi genami tRNA chloroplastów [5, 44].

Genom mitochondrialny roślin koduje również, podobnie jak genomy mitochondrialne ssaków, grzybów czy drożdży, podjednostki I, II i III oksydazy cytochromu C, apocytochromu b, podjednostki 6, 8, 9 ATP-azy, podjednostkę alfa F₁ ATP-azy i URF (otwarte ramki odczytu mogące kodować polipeptydy o nieokreślonej funkcji) [27, 46, 67].

Występowanie genów podjednostki alfa F₁ ATP-azy oraz 5S rRNA jest cechą charakterystyczną mitochondriów roślinnych. Niektóre mitochondrialne geny roślin w przeciwieństwie do mitochondrialnych genów ssaków zawierają introny, jak np. gen II podjednostki oksydazy cytochromu c kukurydzy, pszenicy i ryżu [3, 23, 29], chociaż występowania tego intronu nie stwierdzono u innych badanych roślin [26, 45].

Dotychczas posiadamy niewiele danych odnośnie transkrypcji mitochondrialnych genów roślin. Stwierdzono jednak, że często obserwuje się kilka transkryptów o różnej długości dla danego genu, oraz że niektóre z nich są znacznie większe od sekwencji kodujących [15, 46]. Wy-

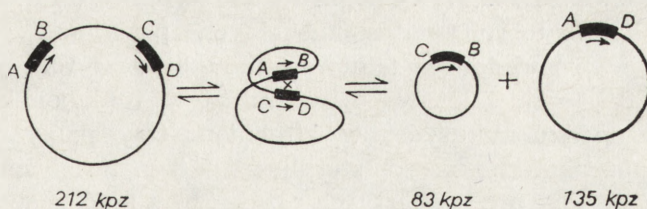
Występowanie kilku kopii genów stwarza możliwość zróżnicowanej ekspresji, która może powodować, że mitochondria z różnych organów i stadiów rozwoju będą syntetyzować tylko specyficzne dla nich produkty. Jak wynika z badań translacji przeprowadzonej *in vitro*, w wyizolowanych mitochondriach roślinnych powstaje około 20 polipeptydów, czyli trochę więcej niż w mitochondriach ssaków czy drożdży [57].

Mało również wiemy, jaki jest kod genetyczny mtDNA roślin. W przypadku kukurydzy, wiesiołka i pszenicy stwierdzono, że kod ten, funkcjonujący w mitochondriach tych roślin, różni się od kodu uniwersalnego. Odrębność ta polega na tym, że kodon UGA nie koduje tryptofanu, jak to ma miejsce w mitochondriach człowieka, wołu czy szczura, a aminokwas ten jest kodowany przez trójkę UGG oraz przez CGG, która w kodzie uniwersalnym oznacza argininę [3, 23, 26].

Roślinny mtDNA różni się od odpowiednich genomów ssaków, drożdży czy grzybów obecnością sekwencji powtórzonych, które są zaangażowane w różnego rodzaju inter- i intramolekularne rekombinacje [7]. Obecność tych sekwencji prowadzi do powstania substechiometrycznych grup cząsteczek o różnym stopniu przegrupowania. Jest to tzw. populacja sublimous mtDNA, która utrzymuje się przez kilka generacji [7]. W powstawaniu tych populacji, oprócz sekwencji powtarzających się, zaangażowany jest również proces replikacji i amplifikacji.

Występowanie wielu różnych cząsteczek DNA w różnym stopniu zrekombinowanych jest przyczyną tzw. heterogenności mtDNA roślin, która objawia się m. in. zaburzeniami w generowaniu stechiometrycznej liczby fragmentów restrykcyjnych.

Intramolekularna rekombinacja wynikająca z obecności sekwencji powtórzonych bezpośrednio (ang. direct repeats) prowadzi do powstania z kolistej, podstawowej cząsteczki mtDNA kilku mniejszych kolistych cząsteczek. Na przykład w obrębie mtDNA kukurydzy występuje 6 par sekwencji powtórzonych i zachodząca między nimi homologiczna rekombinacja doprowadza do powstania kilku mniejszych cząsteczek DNA. Ten typ organizacji mtDNA stwierdzono ponadto u rodzaju *Brassica* i *Spinacia oleracea* [52, 57, 70]. Jest on przedstawiony na ryc. 1.



Ryc. 1. Schemat przedstawiający mechanizm intracząsteczkowej rekombinacji genomowego mtDNA z udziałem sekwencji powtórzonych bezpośrednio (na przykładzie mtDNA *Brassica campestris*) [46]

Procesy rekombinacji, które doprowadzają do wykształcenia nowych mitochondrialnych genomów, zachodzą przeważnie w somatycznych hybrydach i w cytoplazmatycznych mieszańcach, tzw. cybrydach. W przeciwieństwie do genomu plastydowego, genom mitochondrialny somatycznych hybrydów i cybrydów jest reprezentowany zarówno przez niezmiennione cząsteczki DNA obu form rodzicielskich, jak i przez genom, który charakteryzuje się nową mieszaniną fragmentów restrykcyjnych [2, 50, 60].

Cechą charakterystyczną mtDNA roślin jest zdolność inkorporacji DNA pochodzącego z innych źródeł. W obrębie genomu mitochondrialnego wielu roślin stwierdzono występowanie fragmentów homologicznych z sekwencjami chloroplastowego DNA (ctDNA) [71, 72]. Niektóre z nich zostały zidentyfikowane w mtDNA kukurydzy, jak np. część genu dużej podjednostki karboksylazy rybulozodwufosforanowej oraz odcinek o wielkości 12 kbp kodujący m. in. 16S rRNA, tRNA^{Ile} i tRNA^{Val} [42, 69]. Fragmenty ctDNA występujące w mtDNA roślin są uwikłane czasami w strukturę tzw. genów chimerycznych, które prawdopodobnie odgrywają pewną rolę w powstawaniu cechy męskiej sterility [7].

Prowadzone w ostatnich latach badania genomu mitochondrialnego roślin wykazały, że oprócz chromosomalnego mtDNA w mitochondriach pewnych gatunków roślin występują również stosunkowo małe cząsteczki DNA. Ze względu na pozachromosomalną lokalizację oraz możliwość autonomicznej replikacji takie cząsteczki DNA nazwano plazmidami mitochondrialnymi, chociaż niektórzy autorzy nazywają je plazmidopodobnymi cząsteczkami DNA. W niniejszej pracy stosowana będzie nazwa plazmidy.

CHARAKTERYSTYKA MITOCHONDRIALNYCH PLAZMIDÓW WYSTĘPUJĄCYCH W KUKURYDZY

Zgromadzone do tej pory dane wskazują, że mitochondrialne plazmidy mogą występować zarówno w roślinach męskosterylnych, jak i męskopłodnych, ewentualnie równolegle w obu typach roślin. Wyłącznie występowania niektórych mitochondrialnych plazmidów w roślinach męskosterylnych spowodowała zainteresowanie badaczy rolą, jaką mogłyby pełnić te cząsteczki DNA w pojawianiu się niefunkcjonalnych ziaren pyłku. W przypadku kukurydzy wyodrębniono trzy grupy roślin związane z cytoplazmatyczną męską sterylnością, tzw. linie: cms-T, cms-C i cms-S [37]. Podział został oparty na różnicach w fenotypowej ekspresji męskiej sterility i rewersji do płodności.

Grupa roślin cms-S wyróżnia się od pozostałych gametofitycznym

sposobem przywracania płodności, co oznacza, że rewersja do płodności w roślinach heterozygotycznych względem genów przywracania płodności (Rf) zajdzie tylko w tych mikrosporach, które mają dominujące allele Rf. Natomiast w grupach cms-T i cms-C powstanie rewertantów zależy wyłącznie od genotypu rośliny matecznej (genotyp diploidalny), a więc rośliny heterozygotyczne względem genu Rf będą miały wszystkie ziarna pyłku normalnie rozwinięte [66]. Oprócz tych różnic każda z grup roślin ma w mitochondriach specyficzne dla siebie plazmidy DNA (tab. 1) [31, 58].

TABELA 1

Występowanie mitochondrialnych plazmidów w poszczególnych liniach kukurydzy

	Wielkość plazmidu w kpz	N	cms-S	cms-C	cms-T
Cząsteczki koliste	1,94	+	+	+	+
	1,42	-	-	+	-
	1,57	-	-	+	-
Cząsteczki liniowe	2,35 (n)	+	+	+	-
	2,10 (t)	-	-	-	-
	5,45 (S-2)	-	+	-	-
	6,40 (S-1)	-	+	-	-

(+) — występowanie plazmidu w danej linii

(-) — brak doniesień o występowaniu plazmidów

N — linia męskopłodna

S-1, S-2, n, t — oznaczenia plazmidów

cms-S, cms-C, cms-T — grupa roślin związana z cytoplazmatyczną męską sterylnością

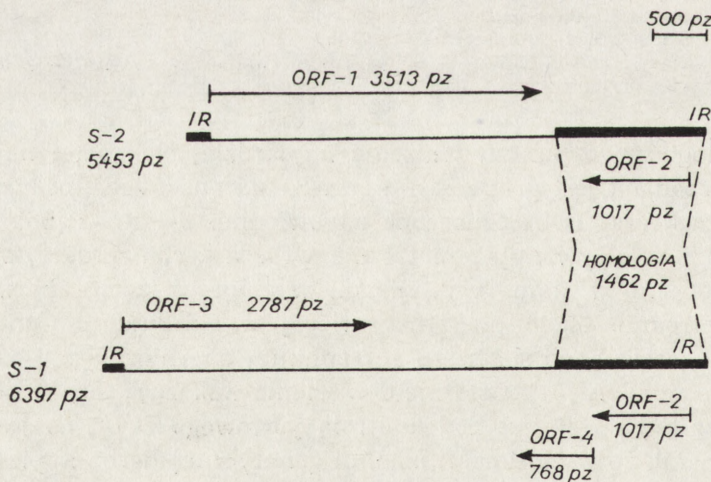
Z biologicznego punktu widzenia najbardziej ciekawą i najlepiej do tej pory zbadaną jest grupa roślin cms-S. Ma ona dwie stosunkowo duże liniowe cząsteczki DNA oznaczone odpowiednio S-1 i S-2 [56]. Plazmidy S-1 i S-2 przekazywane są matecznie wraz z cechą męskiej sterylności i nie są obecne w stanie wolnym ani w chloroplastach, ani w jądrach. Jest ich średnio około pięć razy więcej w stosunku do unikatowych sekwencji mtDNA, co sugeruje, że replikują one niezależnie od chromosomalnego mtDNA [51]. Ostatnie doniesienia wskazują też, że liczba kopii plazmidów S-1 i S-2 jest pod kontrolą jądrowego DNA, co jest poparte obserwacjami, że w zależności od linii genetycznej liczba kopii cząsteczki S-1 DNA jest większa, równa lub mniejsza od liczby kopii plazmidu S-2 [8]. Oba plazmidy mają kowalencyjnie związane białko na końcach 5' DNA, na co wskazuje fakt, że są one odporne na działanie egzonukleazy λ ,

natomiast ulegają całkowitej hydrolizie pod wpływem egzonukleazy III [34]. Funkcja tego białka nie jest obecnie znana, jednakże przypuszcza się, że może ono chronić liniowe plazmidy przed działaniem egzonukleaz lub ewentualnie brać udział w procesie replikacji tych cząsteczek DNA [34]. Podobnie związane z końcami 5'DNA białko zidentyfikowano w adenowirusach, dla których zaproponowano model syntezy DNA z terminalnym polipeptydem jako primerem [74].

Zarówno w przypadku plazmidu S-1, jak i S-2 została ustalona pełna sekwencja nukleotydowa. Plazmid S-1 zawiera 6397 pz, a plazmid S-2 5453 pz. Okazało się, że obie cząsteczki DNA zawierają na swoich końcach 208 pz odcinki o tej samej sekwencji nukleotydów, ułożone w odwróconej orientacji [51].

Jak wiadomo, występowanie na końcach cząsteczki DNA sekwencji powtórzonych w odwróconej orientacji jest również cechą charakterystyczną dla transpozonów.

Plazmidy S-1 i S-2 wykazują między sobą ścisłą homologię w obrębie dwóch regionów: w krótkim segmencie długości 16 pz i na bardzo długim 1462 pz odcinku. Analiza komputerowa oparta na danych sekwencyjnych wykazała, że oba plazmidy S-1 i S-2 zawierają długie otwarte ramki odczytu (ORF) [51] (ryc. 2). Oznacza to, że plazmidy te mogą teoretycznie kodować białka o nie znanej na razie funkcji ze względu na posiadanie w tej samej fazie odczytu kodonu inicjującego i terminującego.



Ryc. 2. Schematyczna mapa plazmidów S-1 i S-2, pokazująca lokalizację i długość otwartych ramek odczytu (ORF) oraz odcinki homologiczne, występujące między plazmidami

Zespół badaczy z Edynburga pod kierownictwem Leavera i Murray [43] zidentyfikował w mitochondriach kukurydzy białko wielkości 125 000 D, które jest zakodowane w plazmidzie S-2, a dokładniej w odcinku DNA, który obejmuje ORF1. Jak wynika z doświadczeń, białko to prawdopodobnie podlega modyfikacji posttranslacyjnej, polegającej na rozcinaniu formy prekursorowej na mniejsze funkcjonalne polipeptydy [43]. Sekwencje nukleotydowe cząsteczek S-1 i S-2 DNA wykazują też wysoką homologię z genomowym mtDNA. Wykazano, że oba mitochondrialne plazmidy S-1 i S-2 mają zdolność integrowania się z chromosomalnym mtDNA [57]. W przypadku plazmidu S-2 określono produkty transkrypcji pochodzące z rejonów ORF-1 i ORF-2. Transkrypty te dotyczyły zarówno plazmidu występującego w stanie wolnym, jak i plazmidu zintegrowanego z genomowym mtDNA. Niektóre dane wskazują, że miejsce promotorowe transkrybowanych ORF-1 i ORF-2 znajduje się wewnątrz terminalnych sekwencji ułożonych w odwróconej orientacji (IR). Ze względu na umiejscowienie przypuszczalnego promotora, sekwencje IR plazmidu S-2 wykazują funkcjonalne podobieństwo z terminalnymi powtórzeniami prokariotycznych sekwencji insercyjnych IS1 oraz transpozonów Ty1 występujących w drożdżach [75].

Stwierdzono również, że niektóre rejony cząsteczki S-1 są homologiczne z jądrowym i chloroplastowym DNA kukurydzy. Homologia między plazmidem S-1 a chloroplastowym DNA została dokładnie zlokalizowana. Dotyczy ona segmentu 420 pz cząsteczki S-1 DNA i plastydowego genu psb A, kodującego białko wiążące się z chinonem w fotosystemie II [65]. Stopień dywergencji sekwencji S-1 DNA w stosunku do sekwencji genu psb A związany jest z wieloma mutacjami punktowymi oraz z tandemowymi duplikacjami odcinków wielkości 4-5 pz. Podobne duplikacje powstają po wycięciu transpozonów w jądrowym DNA kukurydzy [65].

Mitochondrialne plazmidy, nie związane z cechą męskiej sterylności, znaleziono w kukurydzy uprawianej w Ameryce Łacińskiej. W dwunastu odmianach kukurydzy, nazwanych RU, zaobserwowano występowanie dwóch liniowych plazmidów wielkości 5450 i 7460 pz oznaczonych odpowiednio R-1 i R-2. Plazmidy te wykazują uderzającą homologię do plazmidów S-1 i S-2 i mają również na swoich końcach sekwencje powtórzone w odwróconej orientacji składające się z ok. 200 pz [81].

Plazmidy R-2 i S-1 mają identyczną wielkość i wykazują prawie 100% homologii. Plazmid R-1 jest około 1000 pz dłuższy niż plazmid S-1 i ma unikatowy region wielkości 2556 pz, który nie występuje w S-1, natomiast plazmid S-1 zawiera unikatowy segment wielkości 1546 pz [81].

Występowanie wysokiej homologii między plazmidami R i S pozwala

przypuszczać, że plazmid S-1 powstał przez rekombinację między plazmidami R-1 i R-2, co wyjaśniłoby występowanie dużego regionu homologicznego wielkości 1462 pz między S-1 i S-2 [51].

Oprócz plazmidów S-1 i S-2 w mitochondriach kukurydzy występuje jeszcze jeden liniowy plazmid wielkości 2,3 kpz, oznaczony przez n. Plazmid n występuje zarówno w grupie roślin męskosterylnych, jak i męskopłodnych, jednakże w linii cms-T wykazuje on delecję obejmującą około 150 pz. Plazmid n ma taką samą strukturę jak plazmidy S, ma również na końcach sekwencje powtórzone w odwróconej orientacji, połączone z terminalnym białkiem. Ponadto cząsteczka n DNA wykazuje homologię z chloroplastowym i jądrowym DNA, a także z mtDNA *Zea diploperennis* [1]. Cząsteczka ta jest jak na razie jedynym mitochondrialnym plazmidem, w którym stwierdzono występowanie genów kodujących tRNA: tRNA^{Trp} oraz tRNA^{Pro}, który wykazuje 96% homologii z chloroplastowym genem tRNA^{Pro} [61].

Finnegan i Brown [21] zidentyfikowali w mitochondriach kukurydzy cms-S dwie 1-niciowe cząsteczki RNA długości 850 pz i 2150 pz oraz dwie 2-niciowe cząsteczki RNA wielkości 900 pz i 2850 pz. Wykazali oni, że odkryte przez nich cząsteczki RNA powstają w obecności aktynowycyny D. Oznacza to, że nie są one transkryptami mtDNA, a więc można je traktować jako autonomicznie replikujące się plazmidy RNA. Podobne cząsteczki RNA wykryto również w mitochondriach kukurydzy RU uprawianej w Ameryce Łacińskiej [64]. Przypuszcza się, że te autonomicznie występujące cząsteczki RNA w mitochondriach kukurydzy mają wirusowe pochodzenie [41].

UDZIAŁ MITOCHONDRIALNYCH PLAZMIDÓW S-1 I S-2 W POWSTAWANIU PŁODNYCH REWERTANTÓW

Jednym z najbardziej ciekawych zjawisk związanych z grupą roślin linii cms-S jest spontaniczne pojawienie się męskosterylnej populacji roślin. Badania genetyczne wskazują na występowanie dwóch rodzajów mutacji, których wynikiem jest powstanie płodnych rewertantów:

1. Mutacje w obrębie samej cytoplazmy.
2. Mutacje jądrowe.

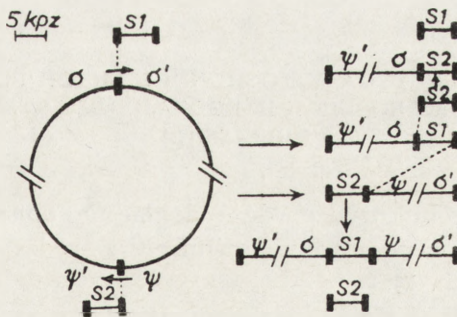
Linia cms-S kukurydzy, mająca w jądrze recesywne geny rf, pod wpływem nieznanymi czynników nabywa genowy system przywracania płodności, gdyż normalne pyłki powstałe w takich rewertantach po zapyleniu żeńskich osobników linii cms-S dają populacje męskopłodne [36, 37]. Obserwacje te pozwoliły Laughnanowi [wg 57] w 1972 r. opracować teoretyczne podstawy występowania „płodnych elementów” cyto-

plazmy roślin cms-S. Elementy te przechodzące z cytoplazmy do jądra wywoływałyby jakościowe zmiany w chromosomalnych loci, dając w rezultacie osobniki męskopłodne.

Kiedy w 1977 roku odkryto plazmidy S-1 i S-2 w mitochondriach kukurydzy męskosterylnych linii cms-S i następnie wykazano homologię sekwencyjną między plazmidem S-1 a jądrowym DNA, hipoteza Laughanana stała się bardziej prawdopodobna. Okazało się jednak, że miejsce i intensywność hybrydyzacji cząsteczki S-1 DNA z jądrowym DNA nie zmienia się zarówno w liniach męskosterylnych, jak i rewertantach (33). Fakt ten w dużym stopniu osłabił hipotezę Laughanana, w której plazmidy S-1 i S-2 mogłyby być postulowanymi „płodnymi elementami”.

W 1984 roku Schardl i wsp. (62) odkryli, że terminalne sekwencje powtórzone w odwróconej orientacji (IR), występujące na końcach wolnych plazmidów S-1 i S-2, są również obecne w genomowym mtDNA. W formie zintegrowanej są one otoczone przez unikatowe sekwencje chromosomalnego mtDNA, nazwane odpowiednio δ , δ' , ψ , ψ' . Sekwencje δ' i ψ' zawsze przylegają do sekwencji IR w pozycji 208, która w wolnym plazmidzie jest wewnętrznym końcem IR, natomiast δ i ψ są połączone z IR w pozycji 1. Rekombinacje zachodzące między zintegrowanymi sekwencjami IR a sekwencjami IR wolnych plazmidów S generują długie liniowe cząsteczki mtDNA, zakończone episomami S-1 lub S-2. Dalsze rekombinacje mogą w efekcie doprowadzić do powstania całkowitej wewnętrznej integracji plazmidów S-1 lub S-2 z genomowym mtDNA (ryc. 3).

Stwierdzono, że osobniki męskosterylne, reprezentujące grupę cms-S, oprócz wolno występujących plazmidów S-1 i S-2 mają genom mitochondrialny w postaci liniowej cząsteczki DNA, zakończonej episomami



Ryc. 3. Postulowany mechanizm generujący liniowe fragmenty mtDNA z udziałem plazmidów S. Sekwencje IR pochodzące z plazmidów S-1 i S-2 mogą rekombinować z homologicznymi sekwencjami IR, zintegrowanymi z genomowym mtDNA. █— sekwencja IR

S-1 lub S-2. Przypuszcza się, że taka forma genomu mitochondrialnego może podlegać procesowi replikacji i ekspresji według podobnych zasad, jakie zachodzą w wolnych plazmidach S. Natomiast płodne rewertanty, charakteryzujące się utratą wolnych plazmidów S, wykazywały jedynie obecność całkowitej wewnętrznej integracji sekwencji S-1 i S-2 DNA z mtDNA [63]. Fakty te dowodzą, że całkowita wewnętrzna integracja plazmidów S z mtDNA jest wynikiem rekombinacji uprawnionej. Istnieje jeszcze inna dopuszczalna możliwość integracji plazmidów S z mtDNA w wyniku rekombinacji nieuprawnionej. Jednakże wówczas plazmidy S musiałyby wykazywać charakter transpozonów. Jak wiadomo, transpozony charakteryzują się terminalnymi sekwencjami powtórzonymi w odwróconej orientacji, a także tym, że powodują przegrupowania sekwencji DNA gospodarza oraz duplikacje w punktach wstawienia insertu. Plazmidy S wykazują dwie pierwsze cechy transpozonów, natomiast występowanie trzeciej cechy jest raczej kwestią sporną. Wprawdzie integracja plazmidu S-2 wywołuje wytworzenie 2-nukleotydowych duplikacji, jednak powstanie tak małych duplikacji może być zupełnie przypadkowe [6].

Poznanie faktu, iż plazmidy S-1 i S-2 mogą integrować z genomowym mtDNA, przyczyniło się do ponownego rozważenia udziału tzw. płodnych elementów w spontanicznej rewersji do płodności. W świetle nowych danych, płodnymi elementami, które przechodziłyby z cytoplazmy do jądra, nie byłyby plazmidy S, lecz określone sekwencje genomowego mtDNA. Sekwencje te zostałyby zmobilizowane w wyniku integracji plazmidów S z mtDNA [57]. Podobna sytuacja, dotycząca wycinania określonych sekwencji mtDNA, a następnie ich transpozycji do jądra, została udokumentowana w przypadku przedwcześnie starzejących się kultur *Podospora anserina* [12, 13].

CHARAKTERYSTYKA MITOCHONDRIALNYCH PLAZMIDÓW WYSTĘPUJĄCYCH W ROŚLINACH RODZAJU BETA, SORGHUM, VICIA I BRASSICA

Jak dotąd, poza kukurydzą, dość dokładnie opisano występowanie mitochondrialnych plazmidów w roślinach z rodzaju *Brassica*, *Beta*, *Sorghum* i *Vicia* (tab. 2).

W mitochondriach *Beta vulgaris* zidentyfikowano cztery koliste mitochondrialne plazmidy. Żaden z tych plazmidów nie wykazuje homologii z genomowym mtDNA [54]. Obecnie znana jest pełna sekwencja nukleotydowa plazmidów: a (1,5 kpz), c (1,4 kpz) i d (1,3 kpz) [47, 73]. Analiza komputerowa, oparta na danych sekwencyjnych, wykazała, że

TABELA 2

Porównanie mitochondrialnych plazmidów występujących w różnych gatunkach roślin

Gatunek	Wielkość plazmidu w kpz	Forma	Linia męskosterylna	Linia męskopłodna	Homologia				Transkrypty plazmidów
					z mt DNA	z ct DNA	z jądrowym DNA	z innymi plazmidami	
<i>Vicia faba</i>	1,7 (F)	K	+	+	?	?	?	?	?
	1,42	K	+	+	?	?	?	1,7 (S), 1,42	?
	1,7 (S)	K	+	-	?	?	?	1,7 (S), 1,7 (F)	?
	1,54	K	+	-	?	?	?	1,7 (F), 1,42, 1,54	?
	1,6 (CCC1A)	K	-	+	+	?	?	1,7 (S)	?
	1,6 (CCC1B)	K	-	+	+	?	?	1,6 (CCC1B) 1,6 (CCC1A)	?
<i>Sorghum bicolor</i>	1,7	K	+	-	-	-	-	?	+
	2,3	K	+	-	-	-	-	1,94 (kukurydza)	+
	1,3	K	+	+	?	?	?	?	?
	5,7 (N-1)	L	+	-	-	-	-	N-2, S-1, S-2	+
	5,3 (N-2)	L	+	-	-	-	-	N-1, S-1, S-2	+
<i>Beta vulgaris</i>	1,5 (a)	K	+	+	-	?	?	1,45 (b)	+
	1,45 (b)	K	-	+	-	?	?	1,5 (a), 1,3 (d)	?
	1,4 (c)	K	-	+	-	?	?	1,3 (d)	+
	1,3 (d)	K	-	+	-	?	?	1,5 (a), 1,4 (c)	+
<i>Brassica</i>	11,3	L	+	+	-	-	-	?	?

K — forma kolistą, L — forma liniową (+) — występuje, (-) — nie występuje, (?) — brak danych

istnieją wspólne sekwencje nukleotydowe dla wszystkich trzech plazmidów. Fakt ten może świadczyć o tym, że są one niezbędne do autonomicznej egzystencji plazmidów.

Na podstawie procentu homologii i stopnia przegrupowań homologicznych sekwencji w plazmidach a i d sugeruje się, że ten drugi mógł powstać w wyniku wewnątrzcząsteczkowej rekombinacji plazmidu a, przy równoczesnej rekombinacji międzycząsteczkowej z udziałem plazmidu c [73]. Wykazano, że wszystkie trzy mitochondrialne plazmidy są transkrybowane, jednak nie ma pewności, czy powstałe transkrypty są wykorzystywane w procesie translacji. Ze względu na licznie występujące kodony stop w sekwencji DNA plazmidów c i d jest mało prawdopodobne, żeby kodowały one jakiegokolwiek funkcjonalne polipeptydy [47, 73]. Realne jest to natomiast w przypadku plazmidu a, który zawiera krótką otwartą ramkę odczytu, zdolną kodować polipeptyd zawierający 111 aminokwasów [73].

W mitochondriach *Vicia faba* Briguet i wsp. [24] wykazali istnienie dwóch różnych kolistych plazmidów DNA wielkości 1,7 kpz, z których jeden (1,7-S) występuje u roślin męskosterylnych, a drugi (1,7-F) u roślin męskopłodnych. Wykazują one dużą homologię, ale różnią się podatnością na działanie enzymów restrykcyjnych, co wskazuje, że plazmid 1,7-S mógł powstać w wyniku przegrupowań sekwencji plazmidu 1,7-F. Oprócz wymienionych plazmidów, w mitochondriach *Vicia faba* występują jeszcze dwie cząsteczki DNA wielkości 1,54 i 1,42 kpz [25]. Na podstawie danych hybrydyzacyjnych przypuszcza się, że plazmid wielkości 1,54 kpz powstał z plazmidu 1,7-S w wyniku delekcji [24].

Poznanie pełnej sekwencji nukleotydowej plazmidów 1,7-S i 1,7-F ujawniło, że plazmidy te zawierają sekwencję, która jest 6-krotnie powtórzona w orientacji prostej, a ponadto w obrębie każdej z takich sekwencji występuje powtórzenie w orientacji odwrotnej. Dzięki takiemu układowi powtórzeń, sekwencje te charakteryzują się drugorzędową strukturą typu spinki do włosów, w której można wyróżnić 3-nukleotydową pętlę końcową oraz 5-nukleotydową pętlę boczną.

Podobne struktury drugorzędowe wykryto także w plazmidzie 1,42 kpz oraz w plazmidzie pO *Beta vulgaris*, jak również w rejonie ori mitochondrialnego DNA drożdży i komórek HeLa [78].

Negruk i Nikifirowa [16, 48] niezależnie od zespołu Briqueta odkryli w mitochondriach *Vicia faba* dwa mitochondrialne plazmidy wielkości 1,6 kpz, oznaczone jako CCC-1A i CCC-1B. Plazmidy te pod względem ilości i względnego położenia miejsc restrykcyjnych są podobne do plazmidów 1,7-S i 1,7-F [59]. Należy jednak zaznaczyć, że plazmidy zidentyfikowane przez Negruka występują w mitochondriach roślin męskopłodnych, co różni je od plazmidu 1,7-S.

Wykazano, że mitochondrialne plazmidy występują również w pokrewnych gatunkach *Vicia faba*, a mianowicie w *Vicia villosa* i *Medicago sativa* [49]. Mitochondrialne plazmidy zaobserwowano również w męskosterylnych roślinach *Sorghum bicolor*. Oprócz trzech kolistych cząsteczek DNA [10] w mitochondriach *Sorgo* występują dwa liniowe plazmidy wielkości 5,7 i 5,3 kbp odpowiednio oznaczone jako N-1 i N-2 [55], które pod względem budowy przypominają plazmidy S występujące w kukurydzy. Jednakże oba plazmidy N nie wykazują homologii z genomowym mtDNA, a także z chloroplastowym i jądrowym DNA [9], podobnie jak liniowy plazmid 11,3 kbp, występujący w mitochondriach *Brassica* [53].

Do tej pory w męskosterylnych populacjach *Sorghum bicolor* nie zauważono spontanicznej rewersji do płodności, dlatego też nie sposób porównać etiologię plazmidów N z S w związku z męską sterylnością roślin. Najnowsze doniesienia wskazują, że obecność plazmidu 11,3 kbp w mitochondriach roślin rodzaju *Brassica* nie jest ściśle związana z cechą męskiej sterylności [32]. Jak wynika z analizy około 100 różnych linii genetycznych roślin rodzaju *Brassica*, plazmid ten występuje zarówno w liniach męskosterylnych, jak i liniach męskopłodnych lub nie wykrywa się jego obecności. Stwierdzono ponadto, że liczba kopii, jak również występowanie lub nieobecność tego plazmidu w mitochondriach roślin rodzaju *Brassica* jest pod kontrolą genów jądrowych [17].

UWAGI KOŃCOWE

Na podstawie dotychczasowych danych, dotyczących mitochondrialnych plazmidów roślin wyższych, trudno wyciągnąć generalne wnioski wskazujące na ich biologiczną funkcję. Należałoby wręcz stwierdzić, że ich funkcja jest nieznaną. Dane zawarte w tab. 1 i 2 wskazują, że niektóre mitochondrialne plazmidy są związane wyłącznie z roślinami męskosterylnymi. Na razie jest to jeden z poważniejszych faktów wskazujących na pewne powiązania mitochondrialnych plazmidów z cechą męskiej sterylności w sensie roli, jaką mogłyby pełnić te cząsteczki DNA.

Poznanie molekularnych podstaw męskiej sterylności roślin zapewne przyczyniłoby się do wyjaśnienia ewentualnej roli, jaką mogłyby odgrywać mitochondrialne plazmidy w powstawaniu tej cechy. Obecnie wyróżnia się trzy rodzaje męskiej sterylności: tzw. aloplazmatyczną męską sterylność, która powstaje w wyniku międzygatunkowego i międzyrodzajowego krzyżowania roślin, homoplazmatyczną męską sterylność, wynikającą z wewnątrzgatunkowych krzyżówek oraz autoplazmatyczną męską sterylność, która powstała w sposób spontaniczny [39].

Przypuszcza się, że w przypadku alo- i autoplazmatycznej męskiej sterility podstawową przyczyną pojawienia się tej cechy są zaburzenia we współdziałaniu produktów genów jądrowych z produktami pewnych genów mitochondrialnych (tzw. niezgodność jądro-mitochondrialna) [39]. W związku z tym aloplazmatyczna męska sterility wynikałaby z niezgodności między genomem jądrowym jednego gatunku a cytoplazmą innego [77]. W przypadku autoplazmatycznej męskiej sterility niezgodność jądro-mitochondrialna byłaby wywołana zmianami zachodzącymi w genomie mitochondrialnym. Zmiany w obrębie genomu mitochondrialnego, które wynikają z inter- i intracząsteczkowych rekombinacji, często mogą być przyczyną powstania nowych otwartych ramek odczytu (ORF) lub tzw. genów chimerycznych [46]. Powstawanie tych ramek odczytu lub genów chimerycznych tłumaczy występowanie dodatkowych mitochondrialnych polipeptydów charakterystycznych dla roślin męskosterylnych, jak np. polipeptyd wielkości 13 kD, kodowany przez mitochondrialny gen chimeryczny w kukurydzy linii cms-T [14, 20] lub polipeptyd wielkości 17 kD, charakterystyczny dla linii cms-C [22].

Na podstawie tych faktów można przypuszczać, iż rola mitochondrialnych plazmidów, związana z cechą męskiej sterility, dotyczyłaby ich udziału w przegrupowaniach sekwencji genomu mitochondrialnego. Mechanizm oddziaływania mitochondrialnych plazmidów na przegrupowania sekwencji mtDNA mógłby polegać na ich bezpośredniej integracji z genomem mitochondrialnym, np. plazmidy S-1 i S-2, lub na kodowaniu czynników biorących udział w rekombinacji mtDNA.

W piśmiennictwie coraz częściej pojawiają się rozważania na temat wirusowego pochodzenia mitochondrialnych plazmidów. Dotyczy to w szczególności liniowych pozachromosomalnych cząsteczek DNA, występujących w mitochondriach niektórych roślin, a także pewnych gatunków grzybów, np. *Claviceps purpurea* [76] i *Ceratocystis fimbriata* [35]. Wszystkie dotąd znane liniowe mitochondrialne plazmidy charakteryzują się kowalencyjnie związanym białkiem z końcami 5'DNA.

Podobną budowę mają adenowirusy i bakteriofag $\phi 29$, których białko związane z końcami 5'DNA uczestniczy jako primer w procesie replikacji [72, 80]. Polipeptyd kodowany przez plazmid S-2 podlega modyfikacji posttranslacyjnej [43] podobnie jak to się dzieje w przypadku poliproteiny kodowanej przez genom wirusa polio [11]. Chociaż nie znaleziono wirusów roślinnych z dwuniciowym liniowym DNA połączonym z terminalnym białkiem, to można jednak założyć, że mitochondrialne plazmidy mogą być reliktem dawnych infekcji wirusowych.

Proces, który obejmowałby okres od momentu infekcji hipotetycznym wirusem do momentu powstania mitochondrialnych plazmidów

składałby się z dwóch etapów. W pierwszym etapie genom hipotetycznego wirusa zostałby zintegrowany z jądrowym DNA zainfekowanej rośliny. Tak zintegrowany genom wirusa przeżyłby dosyć długi okres rozwoju filogenetycznego danego gatunku rośliny, jednocześnie ewoluując w sposób skoordynowany wraz z resztą jądrowego DNA gospodarza. Podobne zjawisko znane jest w przypadku tzw. endogennych retrowirusów. Homologia między niektórymi mitochondrialnymi plazmidami a jądrowym DNA może wskazywać, że taki etap mógł mieć miejsce. Natomiast drugi etap polegałby na uwolnieniu zintegrowanych z genomem gospodarza wirusowych sekwencji DNA i przemieszczeniu ich z jądra do mitochondrium. W środowisku mitochondrialnym te cząsteczki DNA znalazłyby odpowiednie warunki do autonomicznej egzystencji.

Przedstawione tu rozważania na temat wirusowego pochodzenia mitochondrialnych plazmidów tłumaczą występowanie tych cząsteczek DNA w mitochondriach różnych gatunków roślin. Bardziej ogólny mechanizm obejmowałby zainfekowane hipotetycznym wirusem wspólnego protoplasty roślin wyższych. Wówczas zintegrowane sekwencje DNA wirusa ewoluowałyby równoległe z jądrowym DNA roślin, automatycznie przechodząc do nowo powstających gatunków.

Mimo że tak mało wiemy na temat mitochondrialnych plazmidów, myśli się już o potencjalnym wykorzystaniu tych cząsteczek DNA jako narzędzi w inżynierii genetycznej Eukaryota. Pewne cechy, jakie mają mitochondrialne plazmidy, a mianowicie podobieństwo do transpozonów czy możliwość funkcjonowania jako miejsc inicjacji replikacji czynią coraz bardziej prawdopodobne wykorzystanie tych cząsteczek DNA jako wektorów wprowadzających nową informację genetyczną.

LITERATURA

- [1] BEDINGER P., HOSTOS E. L., LEON P., WALBOT V., Cloning and characterization of a linear 2.3 kb mitochondrial plasmid of maize, *Mol. Gen. Genet.*, **205**: 206 - 212, 1986.
- [2] BELLIARD G., VEDEL F., PELLETIER G., Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion, *Nature*, **281**: 401 - 403, 1979.
- [3] BONEN L., BOER P. H., GRAY M. W., The wheat cytochrom oxidase subunit II gene has an intron insert and three radical amino acids changes relative to maize, *EMBO J.*, **3**: 2531 - 2536, 1984.
- [4] BONEN L., GRAY M. W., Organization and expression of the mitochondrial genome of plants. The genes for wheat mitochondrial ribosomal and transfer RNA: evidence for unusual arrangement, *Nucl. Acids Res.*, **8**: 319 - 335, 1980.
- [5] BORSUK P., SIRKO A., BARTNIK E., A methionine tRNA gene from lupine mitochondria, *Nucl. Acids Res.*, **14**: 7508, 1986.

- [6] BRAUN C. J., SISCO P. H., SEDEROFF R. R., LEVINGS C. S. III, Characterization of inverted repeats from plasmid-like DNAs and the maize mitochondrial genome, *Curr. Genet.*, **10**: 625 - 630, 1986.
- [7] BUTOW R. A., Mitochondrial DNA. Rearranging the plant genome, *Nature*, **324**: 620, 1986.
- [8] CARLSON J. E., BROWN G. L., KEMBLE J. R., In organelo mitochondrial DNA and RNA synthesis in fertile and cytoplasmic male sterile *Zea mays* L., *Curr. Genet.*, **11**: 151 - 160, 1986.
- [9] CHASE C. D., PRING D. R., Properties of the linear N1 and N2 plasmid-like DNAs from mitochondria of cytoplasmic male sterile *Sorghum bicolor*, *Plant Mol. Biol.*, **6**: 53 - 64, 1986.
- [10] CHASE C. D., PRING D. R., Circular plasmid DNAs from mitochondria of *Sorghum bicolor*, *Plant Mol. Biol.*, **5**: 303 - 311, 1986.
- [11] CHROBOCZEK J., ZAGORSKI W., *Wirusologia molekularna*, 1983.
- [12] CUMMINGS D. J., MacNEIL I. A., DOMENIKO J., MATSUURA E. T., Excision-amplification of mitochondrial DNA during senescence in *Podospora anserina*, *J. Mol. Biol.*, **185**: 659 - 680, 1985.
- [13] CUMMINGS D. J., WRIGHT R. M., DNA sequence of excision sites of a mitochondrial plasmid senescent *Podospora anserina*, *Nucl. Acids Res.*, **11**: 2111 - 2119, 1983.
- [14] DEWEY R. E., LEVINGS C. S. III, TIMOTHY D. M., Novel recombination in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm, *Cell*, **44**: 439 - 449, 1986.
- [15] DEWEY R. E., SCHUSTER A. M., LEVINGS C. S. III, TIMOTHY D. H., Nucleotide sequence of F_0 -ATPase proteolytic (subunit 9) gene of maize mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 1015 - 1019, 1985.
- [16] EISNER G. I., NEGRUK V. I., CHERNY D. I., ALEKSANDROV A. A., SHEMYAKIN M. F., BUTENKO R. G., Circular DNAs in mitochondria of *Vicia faba*, *FEBS Lett*, **172**: 67 - 69, 1984.
- [17] ERICKSON L., GRANT I., BEVERSDORF W., Cytoplasmic male sterility in rapessed (*Brassica napus* L.). The role of a mitochondrial plasmid, *Theor. Appl. Genet.*, **72**: 151 - 157, 1986.
- [18] FALCONET D., DELORME S., LEJEUNE B., SEVIGNAC M., DELCHER E., BAZETOUX S., QUETIER F., Wheat mitochondrial 26S ribosomal gene has no intron and is present in multiple copies arising by recombination, *Curr. Genet.*, **9**: 169 - 174, 1985.
- [19] FALCONET S., LEJEUNE F., QUETIER F., GRAY M. W., Evidence for homologous recombination between repeated sequences containing 18S and 5S ribosomal RNA genes in wheat mitochondrial DNA, *EMBO J.*, **3**: 297 - 302, 1984.
- [20] FAURON CH. M.-R., ABBOTT A. G., BRETTEL R. I. S., GESTELAND R. F., Maize mitochondrial DNA rearrangements between the normal type, the Texas male sterile cytoplasm, and a fertile revertant cms-T regenerated plant, *Curr. Genet.*, **11**: 339 - 346, 1987.
- [21] FINNEGAN P. M., BROWN G. G., Autonomously replicating RNA in mitochondria of maize plants with S-type cytoplasm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 5175, 1986.
- [22] FORDE B. G., LEAVER C. J., Nuclear and cytoplasmic genes controlling synthesis of variant mitochondrial polipeptides in male-sterile maize, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 418 - 422, 1980.

- [23] FOX T. D., LEAVER C. J., The *Zea mays* mitochondrial gene coding cytochrome oxidase subunit II has an intervening sequence and does not contain TGA codons, *Cell*, **26**: 315 - 323, 1981.
- [24] GOBLET J. P., FLAMAND M. C., BRIQUET M., A mitochondrial plasmid specifically associated with male sterility and its relation with other mitochondrial plasmid in *Vicia faba* L., *Curr. Genet.*, **9**: 423 - 426, 1985.
- [25] GOBLET J. P., BOUTRY M., DUC G., BRIQUET M., Mitochondrial plasmid-like molecules in fertile and sterile *Vicia faba* L., *Plant Mol. Biol.*, **2**: 305 - 309, 1983.
- [26] HIESEL R., BRENNICKE A., Cytochrome oxidase subunit II gene in mitochondria of *Oenothera* has no intron., *EMBO J.*, **2**: 2173 - 2178, 1984.
- [27] HIESEL R., SCHOBEL W., SCHUSTER W., BRENNICKE A., Cytochrome oxidase subunit I and III genes are transcribed from identical promoter sequences, *EMBO J.*, **6**: 29 - 34, 1987.
- [28] HUH T. Y., GRAY M. W., Conservation of ribosome RNA gene arrangement in the mitochondrial DNA of angiosperms, *Plant Mol. Biol.*, **1**: 245 - 249, 1982.
- [29] KAO T., MOON E., WU R., Cytochrome oxidase subunit II gene of rice has an insertion sequence within the intron, *Nucl. Acids. Res.*, **12**: 7305 - 7315, 1984.
- [30] KARPINSKA B., JUNGERMAN M., AUGUSTYNIAK H., Mitochondrial DNAs of three lupine species, *Plant Science (przygotowane do druku)*.
- [31] KEMBLE R. J., BEDBROOK J. R., Low molecular weight and linear DNA in mitochondria from normal and male-sterile *Zea mays* cytoplasm, *Nature*, **284**: 565 - 566, 1980.
- [32] KEMBLE R. J., CARLSON J. E., ERICKSON L. R., SERNYK J. L., THOMPSON D. R., The *Brassica mitochondrial* DNA plasmid and large RNAs are not exclusively associated with cytoplasmic male sterility, *Mol. Gen. Genet.*, **205**: 183 - 185, 1986.
- [33] KEMBLE R. J., MANS R. J., GABAY S., LAUGHNAN J. R., Sequences homologous to episomal mitochondrial DNAs in the maize nuclear genome, *Nature*, **304**: 744 - 747, 1983.
- [34] KEMBLE R. J., THOMPSON D. R., S1 and S2, the linear mitochondrial DNAs present in a male sterile line of maize, possess terminally attached proteins, *Nucl. Acids Res.*, **10**: 8181 - 8190, 1982.
- [35] LALONDE M., GIASSON L., Analysis of a linear plasmid isolated from the pathogenic fungus *Ceratocystis fimbriata*, *Curr. Genet.*, **11**: 331 - 334, 1987.
- [36] LAUGHNAN J. R., GABAY S., Mutations leading to nuclear restoration of fertility in S male-sterile cytoplasm in maize, *Theor. Appl. Genet.*, **43**: 109 - 116, 1973.
- [37] LAUGHNAN J. R., GABAY S., Cytoplasmic male sterility in maize, *Ann. Rev. Genet.*, **17**: 27 - 48, 1983.
- [38] LEJEUNE B., DELORME S., DELCHER E., QUETIER F., Recombination in wheat mitochondrial DNA: occurrence of nine different genomic contexts for the 18S-5S genes, *Plant Physiol. Biochem.*, **25** (3): 227 - 233, 1987.
- [39] LONSDALE D. M., Cytoplasmic male sterility: a molecular perspective, *Plant Physiol. Biochem.*, **25** (3): 265 - 271, 1987.
- [40] — A review of the structure and organization of the mitochondrial genome of higher plants, *Plant Mol. Biol.*, **1**: 201 - 206, 1984.
- [41] — Viral RNA in mitochondria? *Nature*, **323**: 299, 1986.
- [42] LONSDALE D. M., HODGE T. P., HOWE C. J., STERN D. B., Maize mito-

- chondrial DNA contains a sequence homologous to the ribulose-1,5-biphosphate carboxylase large subunit gene of chloroplast DNA, *Cell*, **34**: 1007 - 1014, 1983
- [43] MANSON J. C., LIDDEL A. D., LEAVER C. J., MURRAY K., A protein specific to mitochondria from S-type male-sterile cytoplasm of maize is encoded by an episomal DNA, *EMBO J.*, **5**: 2775 - 2780, 1986.
- [44] MARECHAL H., GUILLEMAUT P., GRIENENBERGER J. M., JEANNIN G., WEIL J. M., Sequences of initiator and elongator methionine tRNA in bean mitochondria, *Plant Mol. Biol.*, **7**: 245 - 253, 1986.
- [45] MOON E., KAO T., WU R., Cytochrome oxidase subunit II gene of pea has no intron and generates two mRNA transcripts with different 5 termini, *Nucl. Acids Res.*, **13**: 3195 - 3212, 1985.
- [46] MULLIGAN R. M., WALBOT V., Gene expression and recombination in plant mitochondrial genomes, *Trends in Genetics*, **2**: 263 - 266, 1986.
- [47] MUNK-HANSEN B., MARCKER K. A., DNA sequence and transcription of a DNA minicircle isolated from male-fertile sugar beet mitochondria, *Nucl. Acids Res.*, **12**: 4747 - 4756, 1984.
- [48] NEGRUK V. I., CHERNY D. I., NIKIFOROWA I. D., ALEKSANDROW A. A., BUTENKO R. G., Isolation and characterization of minicircular DNAs found in mitochondrial fraction of *Vicia faba*, *FEBS Letters*, **142**: 115 - 117, 1982.
- [49] NIKIFOROVA I. D., NEGRUK V. I., Comparative electrophoretical analysis of plasmid-like mitochondrial DNAs in *Vicia faba* and in some other legumes, *Planta*, **157**: 81 - 84, 1983.
- [50] OZIAS-AKINS P., PRING D. R., VASIL J. K., Rearrangements in the mitochondrial genome of somatic hybrid cell lines of *Pennisetum americanum* k. Schum. + *Panicum maximum* Jacq., *Theor. Appl. Genet.*, **74**: 15 - 20, 1987.
- [51] PAILLARD M., SEDEROFF R. R., LEVINGS C. S. III, Nucleotide sequence of the S-1 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize, *EMBO J.*, **4**: 1125 - 1128, 1985.
- [52] PALMER J. D., SHIELDS C. R., Tripartite structure of the Brassica campestris mitochondrial genome, *Nature*, **307**: 437 - 440, 1984.
- [53] PALMER J. D., SHIELDS C. R., COHEN D. B., ORTON T. J., An unusual mitochondrial DNA plasmid in the genus Brassica, *Nature*, **301**: 725 - 728, 1983.
- [54] POWLING A., ELLIS T. H. N., Studies on the organelle genomes of sugarbeet with male-fertile and male-sterile cytoplasm, *Theor. Appl. Genet.*, **65**: 323 - 328, 1983.
- [55] PRING D. R., CONDE M. F., SCHERTZ K. F., LEVINGS C. S. III, Plasmid-like DNAs associated with mitochondria of cytoplasmic male-sterile Sorghum, *Mol. Gen. Genet.*, **186**: 180 - 184, 1982.
- [56] PRING D. R., LEVINGS C. S. III, HU W. W. L., TIMOTHY D. H., Unique DNA associated with mitochondria in the S-type cytoplasm of male-sterile maize, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 2904 - 2908, 1977.
- [57] PRING D. R., LONSDALE D. M., Molecular biology of higher plant mitochondrial DNA, *Int. Rev. Cytol.*, **97**: 1 - 46, 1985.
- [58] PRING D. R., LONSDALE D. M., GRACEN V. E., SMITH A. G., Mitochondrial DNA duplication/deletion events and polymorphism of the C group of male sterile maize cytoplasm, *Theor. Appl. Genet.*, **73**: 646 - 653, 1987.
- [59] RIZIK M. W., NEGRUK V. I., Klonirowanie i charakteristika minikolciowych DNK *Vicia faba* C1A i C1B, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **273**: 237 - 241, 1983.
- [60] ROTHENBERG M., BOESHORE M. L., HANSON M. R., IZHAR S., Inter-genomic recombination of mitochondrial genomes in a somatic hybrid plant, *Curr. Genet.*, **9**: 615 - 618, 1985.

- [61] RUNEBERG P., MARECHA L., WINTZ H., GUILLEMAUT P., JEANNIN G., GRIENENBERGER J. M., WEIL J. H., Studies on tRNAs and tRNA genes from higher plant mitochondria, 12-th International Workshop On tRNA, Umea Sweden 1987, Session IIa-4.
- [62] SCHARDL C. L., LONSDALE D. M., PRING D. R., ROSE K. R., Linearization of maize mitochondrial chromosomes by recombination with linear episomes, *Nature*, **310**: 292 - 296, 1984.
- [63] SCHARDL C. L., PRING D. R., LONSDALE D. M., Mitochondrial DNA rearrangements associated with fertile revertants of S-type male-sterile maize, *Cell*, **43**: 361 - 368, 1985.
- [64] SCHUSTER A. M., SISCO P. H., LEVINGS C. S. III, The unique RNAs in cms-S and RU maize mitochondria, *Plant Mol. Biol.*, Alan R. Liss, New York, UCLA Symp. Molec. Cell. Biol., **12**: 437 - 444, 1983.
- [65] SEDEROFF R. R., RONALD P., BEDINGER P., RIVIN C., WALBOT V., BLAND M., LEVINGS C. S. III, Maize mitochondrial plasmid S-1 sequences share homology with chloroplast gene psbA, *Genetics*, **113**: 469 - 482, 1986.
- [66] SISCO P. H., GRACEN V. E., EVERETT H. L., EARLE E. D., PRING D. R., McNAY J. W., LEVINGS C. S. III, Fertility restoration and mitochondrial nucleic acids distinguish at least five subgroups among cms-S cytoplasm of maize (*Zea mays*), *Theor. Appl. Genet.*, **71**: 5 - 19, 1985.
- [67] STERN D. B., BANG A. G., THOMPSON W. F., The watermelon mitochondrial URF-1 gene: evidence for a complex structure, *Curr. Genet.*, **10**: 857 - 869, 1986.
- [68] STERN D. B., DYER T. A., LONSDALE D. M., Organization of the mitochondrial ribosomal RNA genes of maize, *Nucl. Acids Res.*, **10**: 3333 - 3340, 1982.
- [69] STERN D. B., LONSDALE D. M., Mitochondrial and chloroplast genomes of maize have a 12 kilobase DNA sequence in common, *Nature*, **299**: 698 - 702, 1982.
- [70] STERN D. B., PALMER J. D., Tripartite mitochondrial genome of spinach: physical structure, mitochondrial gene mapping and location of transposed chloroplast DNA sequences, *Nucl. Acids Res.*, **14**: 5651 - 5666, 1986.
- [71] — Extensive and widespread homologies between mitochondrial DNA and chloroplast DNA in plants *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 1946 - 1950, 1984.
- [72] STERN D. B., PALMER J. D., THOMPSON W. F., LONSDALE D. M., Mitochondrial DNA sequence evolution and homology to chloroplast DNA in angiosperms, *Plant Mol. Biol.*, **2**: 467 - 477, 1983.
- [73] THOMAS C. M., The nucleotide sequence and transcription of minicircular mitochondrial DNAs associated with male-fertile and cytoplasmic male-sterile lines of sugarbeet, *Nucl. Acids Res.*, **14**: 9353 - 9370, 1986.
- [74] TIMANOI F., STILLMAN B. W., Function of adenovirus terminal protein in the initiation of DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 2221 - 2225, 1982.
- [75] TRAYNOR P. L., LEVINGS C. S. III, Transcription of the S-2 maize mitochondrial plasmid, *Plant Mol. Biol.*, **7**: 255 - 263, 1986.
- [76] TUDZYNSKI P., ESSER K., Extrachromosomal genetics of *Claviceps purpurea*, *Curr. Genet.*, **10**: 463 - 467, 1986.
- [77] VEDEL F., MATHIEU C., CHETRIT P., PELLETIER G., PRIMARD C., Mitochondrial DNA variation in cytoplasmic male sterile somatic hybrids of *Brassica napus*, *Plant Physiol. Biochem.*, **25** (3): 249 - 257, 1987.
- [78] WAHLEITHNER J. A., WOLSTENHOLME D. R., Mitochondrial plasmid

- DNAs of broad bean: nucleotide sequences, complex secondary structures, and transcription, *Curr. Genet.*, **12**: 55 - 67, 1987.
- [79] WARD B. L., ANDERSON R. S., BENDICH A. J., The size of the mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (Cucurbitaceae), *Cell*, **25**: 793 - 803, 1981.
- [80] WATABE K., LEUSCH M., ITO I., Replication of bacteriophage ϕ 29 DNA in vitro: the roles of terminal protein and DNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 5374 - 5378, 1984.
- [81] WEISSINGER A. K., TIMOTHY D. H., LEVINGS C. S. III, HU W. W. L., GOODMAN M. M., Unique plasmid-like mitochondrial DNAs from indigenous maize races of Latin America, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 1 - 5, 1982.

Otrzymano: 14 września 1987.

Przyjęto: 8 lutego 1988.

Adres autorów: ul. Fredry 10, 61-701 Poznań.

WPŁYW STARZENIA NA STRUKTURĘ MIĄSZKOWYCH KOMÓREK WĄTROBY

THE EFFECT OF AGING ON THE STRUCTURE OF LIVER PARENCHYMAL CELLS

Zbigniew KMIEĆ

Katedra i Zakład Histologii, Akademia Medyczna, Gdańsk

Streszczenie. W trakcie rozwoju i starzenia się ssaków w wątrobie rośnie odsetek hepatocytów zawierających ponaddiploidalną ilość DNA, czemu towarzyszy zmniejszenie liczby hepatocytów w jednostce objętości wątroby. Na poziomie ultrastrukturalnym wpływ starzenia w hepatocytach uwidacznia się znacznym wzrostem liczby i średniej wielkości lizosomów, przy czym aktywność niektórych enzymów lizosomalnych rośnie, innych zaś maleje. Związane z wiekiem zmiany objętości gładkiej siateczki śródplazmatycznej zależą od rasy szczura, natomiast wielkość siateczki szorstkiej i aparatu Golgiego pozostaje na stałym poziomie. Starzeniu towarzyszy spadek liczby mitochondriów w hepatocytach. Wraz z wiekiem w wątrobie szczura dochodzi do zmian w rozmieszczeniu w obrębie płacika wątrobowego aktywności fosfatazy zasadowej i kilku enzymów lizosomalnych.

Summary. The development and aging of mammalian liver is characterized by an increase in the number of polyploid hepatocytes, which is associated with a decrease in the number of hepatocytes in a unit of liver volume. The ultrastructural changes in hepatocytes include a substantial increase in the amount and average size of lysosomes, however, the activities of some lysosomal enzymes in hepatocytes increase, and of the others decline during aging. In rat the age-associated alterations of the volume of smooth endoplasmic reticulum are strain-dependent. The volume densities of rough endoplasmic reticulum and of Golgi body do not change with age. The number of mitochondria in hepatocytes decreases during aging. The distribution of the activities of alkaline phosphatase and of some lysosomal enzymes within the liver lobule also changes with age.

W komórkach mięszkowych wątroby, określanych również mianem hepatocytów, przebiega większość charakterystycznych dla tego narządu

procesów metabolicznych. Ze względu na podstawową rolę wątroby w regulacji metabolicznej homeostazy, zmiany zachodzące w tym narządzie w trakcie rozwoju i starzenia się organizmów stały się stosunkowo wcześniej przedmiotem badań [12, 81]. W pracach tych zajmowano się narządem jako całością, mimo że wątroba zbudowana jest z kilku populacji komórek. Hepatocyty stanowią 60% liczby wszystkich komórek wątrobowych szczura [26], zajmując 78% całkowitej objętości narządu i 85% objętości wszystkich komórek w wątrobie szczura [8]. Inne rodzaje komórek wątrobowych, które zlokalizowane są poza beleczkami mięszu wątroby, określane są jako niemięszkowe komórki wątroby. Należą do nich komórki gwiaździste, czyli komórki Browicza-Kupfera, nazywane także komórkami siateczkowo-śródbłonkowymi, komórki śródbłonka zatok, czyli komórki endotelialne, komórki gromadzące tłuszcze, czyli lipocyty, oraz tzw. komórki pit. Niemięszkowe komórki wątroby stanowią ok. 35% liczby wszystkich komórek w wątrobie szczura [8], zajmując tylko ok. 6% całkowitej objętości narządu [26], przy czym spełniają one funkcje zasadniczo odmienne od czynności pełnionych przez hepatocyty [11]. Opracowanie technik otrzymywania odrębnych populacji izolowanych komórek wątrobowych, tj. hepatocytów [5, 66, 85], komórek gwiaździstych i endotelialnych [44] oraz lipocytów [45] pozwoliło na przeprowadzenie dokładniejszej charakterystyki czynnościowej tych rodzajów komórek. W hepatocytach przebiega większość przemian metabolicznych właściwych wątrobie ssaków. W komórkach gwiaździstych (Kupfera) zachodzi intensywna fagocytoza różnych komórek i substancji (m.in. bakterii, ercycytów o zmienionym składzie błony komórkowej, znajdujących się w krwiobieg komórek nowotworowych, pozostałości po uszkodzonych komórkach), przy czym w procesach wychwytywania przez komórki Kupfera antygenów i kompleksów immunologicznych uczestniczą receptory dla fragmentu Fc przeciwciał oraz receptory dla C3b — produktu aktywacji trzeciego składnika układu dopełniacza [34]. Zarówno komórki gwiaździste, jak i komórki śródbłonka zatok wchłaniają na drodze pinocytozy wiele cząsteczek i makrocząsteczek, m.in. albuminę i heparynę [59]. Endoteliocyty pełnią przede wszystkim funkcję bariery filtracyjnej między światłem naczyń zatokowych a powierzchnią hepatocytów, a ponadto aktywnie uczestniczą w procesie usuwania z krwi lipoprotein [6] i proteoglikanów [72]. Natomiast w lipocytach, które stanowią miejsce magazynowania witaminy A w wątrobie ssaków [7, 87], przebiega także synteza włókien kolagenowych, znajdujących się w przestrzeni okołozatokowej i wzmacniających ścianę naczyń zatokowych [23, 67]. Komórki pit mają brać udział w bliżej jeszcze nie określonych funkcjach neuroendokrynych [26].

Ponieważ mięszkowe komórki wątroby należące do populacji komórek

postmitotycznych żyją prawie tak długo, jak długo żyje dany osobnik, dlatego można sądzić, iż przebiegające w nich wraz z wiekiem zmiany są rezultatem przemian rzeczywiście związanych ze starzeniem się organizmów, a nie np. związanych z różnicowaniem się komórek [39]. Z tego powodu, a także ze względu na budowę i funkcje zasadniczo odmienne od struktury i czynności niemięszowych komórek wątroby, wpływ wieku na morfologię hepatocytów wymaga szerszego omówienia. Należy zaznaczyć, że „okres starości” jest różnie określany przez różnych badaczy. Sytuacja taka spowodowana jest m.in. faktem występowania istotnych różnic w czasie trwania maksymalnej i średniej długości życia osobników należących do poszczególnych ras w obrębie danego gatunku. W przypadku szczura maksymalny czas przeżycia samic rasy WAG/Rij wynosi 40 miesięcy, a samców tej rasy — 34 miesiące, samic rasy BN/Bi — 38 miesięcy, a samców tej rasy — 36 miesięcy [30], samców rasy Fischer 344 — 34 miesiące [64], a samców rasy Sprague-Dawley 40 miesięcy [9]. Średnia maksymalna długość życia myszy szczepu C57BL/KaLwRij wynosi 35 miesięcy, a myszy rasy CBA/BrRij — 38 miesięcy [30]. Stosowane w odniesieniu do wieku gryzoni określenia młody, dojrzały lub stary oznaczają zwykle osobników w wieku 3-7, 12-18 lub 24-32 miesięcy.

1. ZJAWISKO POLIPLOIDYZACJI HEPATOCYTÓW

Wraz w rosnącym wiekiem organizmów w wątrobie ssaków zwiększa się liczba hepatocytów zawierających ponaddiploidalną ilość DNA [13]. Tempo przebiegu tego procesu oraz jego zakres są charakterystyczne dla danego gatunku, przynajmniej w odniesieniu do szczura, i zależą także od rasy zwierząt. Hepatocyty jednojądrzaste, zawierające tetraploidalną ilość DNA, powstają z komórek jednojądrzastych-diploidalnych poprzez pośrednie stadium komórek dwujądrzastych-diploidalnych, a hepatocyty jednojądrzaste-oktaploidalne powstają z komórek dwujądrzastych-tetraploidalnych [20, 32, 56, 89, 91]. W przypadku szczura największą szybkość powstawania hepatocytów zawierających ponaddiploidalną ilość DNA obserwowano w pierwszym roku życia zwierząt [1, 20, 55, 83, 84, 91], chociaż dalszy znamieny wzrost liczby komórek tetra- i oktaploidalnych obserwowano również u zwierząt starych i bardzo starych [15, 54, 84]. W zależności od rasy w wątrobie starych szczurów zawartość hepatocytów diploidalnych wynosi 10-15%, tetraploidalnych — 50-70%, a oktaploidalnych — 15-30% [40]. Największy zakres związanej ze starzeniem poliploidyzacji wątroby wykazano u myszy: u zwierząt w wieku 28 miesięcy komórki zawierające 2C DNA sta-

nowiły 9⁰%, komórki 4C — 20⁰%, komórki 8C — 49⁰%, komórki 16C — 17⁰%, a komórki 32C — 4⁰% [70]. Zbliżone dane podają też inne prace [21, 22, 57].

W wątrobie ludzkiej poliploidyzacja hepatocytów jest słabiej wyrażona. Watanabe i Takanaka przeprowadzili cytofotometryczne pomiary wielkości jąder komórkowych hepatocytów oraz ilości zawartego w nich DNA w skrawkach wątroby uzyskanych podczas sekcji uprzednio zdrowych ludzi, którzy nagle zmarli. Wykazali oni stopniowy wzrost ilości hepatocytów dwujądrazstych oraz hepatocytów tetra- i oktaploidalnych między drugą a trzecią dekadą życia ludzi oraz wolniej postępujące zwiększanie się liczby tych komórek w późniejszych dekadach życia [88 - 90]. Na podstawie wyników badań tych oraz innych autorów [4, 17, 61] można stwierdzić, iż wraz z wiekiem w wątrobie ludzi powoli, ale stale rośnie odsetek komórek mięszszowych zawierających ponaddiploidalną ilość DNA; w ósmej dekadzie życia komórki diploidalne stanowią już ok. 80⁰%, komórki tetraploidalne ok. 16⁰%, a komórki oktaploidalne ok. 4⁰% liczby wszystkich hepatocytów. Najwyższa zawartość DNA, którą zaobserwowano w hepatocytach człowieka, wynosiła 16C [90]. Znaczenie zachodzącego fizjologicznie wraz z postępującym wiekiem organizmów procesu poliploidyzacji mięszszowych komórek wątroby nie jest jasne. Ponieważ w organizmach ssaków procesy biotransformacji najróżnorodniejszych substancji egzo- i endogennych przebiegają głównie w hepatocytach, komórki te w znacznie więc większym stopniu od komórek innych narządów narażone są na szkodliwy wpływ ubocznych produktów reakcji detoksyfikacyjnych, m.in. nadtlenuków i wolnych rodników. Dlatego uważa się, że towarzyszące starzeniu zwielokrotnienie ilości DNA w hepatocytach może być ważnym sposobem zabezpieczenia materiału genetycznego tych komórek przed nasilającymi się wraz z wiekiem jego uszkodzeniami przez czynniki fizyczne i chemiczne [51].

2. ZWIĄZANE Z WIEKIEM ZMIANY LICZBY I WIELKOŚCI HEPATOCYTÓW

Wątroba ssaków należy do narządów o bardzo niskiej aktywności mitotycznej. Już u jednomiesięcznych szczurów częstość występowania podziałów hepatocytów jest niższa niż 0,01⁰% [26, 56]. Oznacza to, że w warunkach fizjologicznych hepatocyty ssaków praktycznie nie ulegają podziałom i żyją tak długo, jak długo żyje dany osobnik [40]. W wyniku uszkodzenia czynnej masy komórkowej skutek zadziałania różnych czynników wątroba ssaków wykazuje daleko posuniętą zdolność odtwarzania wyjściowej masy narządu. Wykazano, iż wątroba starych

szczurów regeneruje swoją masę po przeprowadzonej hepatektomii w czasie 2-krotnie dłuższym niż wątroba zwierząt dojrzałych [68].

Po 50 roku życia masa wątroby ulega u ludzi stopniowemu zmniejszeniu [48, 69, 74], czemu towarzyszy spadek liczby hepatocytów w jednostce objętości narządu [62, 77, 78]. Jednocześnie dochodzi do wzrostu wielkości hepatocytów oraz ich jąder; zjawisko to przebiega równolegle ze stopniowym zwiększaniem się wraz z wiekiem liczby komórek zawierających ponaddiploidalną ilość DNA [77, 88 - 90].

U szczura [37, 40, 79, 83, 96] i myszy [46] stosunek masy (ciężaru) wątroby do ciężaru całego ciała wynosi w zależności od rasy od 2,5 do 5% i w miarę starzenia się zwierząt nie ulega zmianie. Wraz z wiekiem w wątrobie szczura ulega zmniejszeniu ilość hepatocytów zawarta w jednostce objętości narządu [64, 97]. Natomiast średnia wielkość hepatocytów szczura w trakcie starzenia albo stale rośnie [52, 83], albo też zwiększa się do okresu późnej dojrzałości (ok. 18 miesięcy), a następnie wyraźnie maleje, osiągając u zwierząt 30-miesięcznych wielkość komórek młodych zwierząt [16, 64, 97].

3. ULTRASTRUKTURA HEPATOCYTÓW

Liczni autorzy przedstawili dane dotyczące submikroskopowej budowy mięsnych komórek wątroby ludzi [48, 77, 78] i zwierząt [25, 52, 63, 64, 73, 83, 97]. Najbardziej charakterystyczną cechą ultrastrukturalną hepatocytów starych gryzoni stanowi zwiększona ilość lizosomów, wakuoli autofagocytarnych oraz tzw. ciał resztkowych, zawierających lipofuscynę lub ciała lipidowe [25, 31, 43, 64, 83, 86]. Niektórzy badacze obserwowali w hepatocytach starych szczurów [38] i myszy [94] zwiększony polimorfizm mitochondriów oraz skrócenie grzebieni mitochondrialnych [75, 79, 94]. Obserwacje te zostały potwierdzone i rozszerzone przez porównawcze — w aspekcie wieku — badania morfometryczne. Najważniejsze rezultaty tych badań przytoczono w tab. 1.

W trakcie starzenia w hepatocytach ludzi i zwierząt występuje zmniejszenie liczby mitochondriów w jednostce objętości mięszu wątroby, przebiegające ze wzrostem lub zmniejszeniem ich średniej wielkości, a także znaczny wzrost ilości i objętości lizosomów pierwotnych i wtórnych. Natomiast towarzyszące starzeniu zmiany gładkiej lub szorstkiej siateczki śródplazmatycznej przebiegały, w zależności od rasy szczurów, w kierunku wzrostu lub spadku powierzchni zajmowanej w hepatocytach. Te ilościowe modyfikacje siateczki śródplazmatycznej mogą stanowić morfologiczny wyraz zmian o charakterze czynnościowym

TABELA 1

Badania morfometryczne ultrastruktury hepatocytów w trakcie starzenia

Gatunek, rasa, płeć	Wiek (m-ce)	Rodzaj zmiany	Piśm.
Mitochondria			
człowiek ^a	30-90 lat	(↓) liczby, (↑) śred. objętości	[76, 78]
szczur			
A	6 vs 27	(↓) liczby, (↓) śred. objętości	[16]
B	12 vs 27	(↓) liczby, (↑) śred. powierzchni (↑) długości grzebieni	[79]
C	12 vs 27	bz liczby i objętości	[97]
D	1-30 ^b	(↓) całkowitej objętości	[64]
E	3 vs 35	bz całkowitej objętości	[52]
mysz			
F	6 vs 30	bz liczby, (↑) śred. wielkości	[94]
G	4 vs 24	(↓) liczby, (↑) śred. powierzchni, (↓) długości grzebieni	[75]
Gładka siateczka śródplazmatyczna			
C	jw.	bz powierzchni	[97]
D	jw.	(↑) powierzchni od 1. do 16. m-ca, następnie (↓) powierzchni	[63, 64]
E	jw.	(↑) powierzchni	[52]
Szorstka siateczka śródplazmatyczna			
C	jw.	(↓) powierzchni	[97]
D, E	jw.	bz powierzchni	[52, 63, 64]
Aparat Golgiego			
D, E	jw.	bz powierzchni	[52, 64]
Lizosomy			
D	jw.	(↑) liczby ciał gęstych o 65%, (↑) ich objętości o 100% ^c	[64]
E	jw.	(↑) całkowitej objętości o 100%	[43, 52]

Oznaczenia skrótów: vs versus, bz — brak zmiany, (↓) oznacza spadek, a (↑) — wzrost w wielkości parametru wraz z wiekiem; Rasa i płeć zwierząt: A — Wistar, ♂, B — Donryu (Wistar), ♀, C — Wistar, ♀, D — Fischer 344, ♂, E — WAG/Rij (Wistar), ♀, F — C57BL/ICRF at, ♂, G — C57BL, ♀; ^a mężczyźni i kobiety, ^b badano szczury w wieku 1, 6, 10, 16, 20, 25 i 30 miesięcy, ^c porównywano zwierzęta w wieku 6 i 30 miesięcy.

(np. w zakresie biotransformacji leków i innych substancji lub w zakresie biosyntezy białka), które zachodzą podczas starzenia w hepatocytach ssaków.

4. AKTYWNOŚĆ UKŁADU LIZOSOMALNEGO W HEPATOCYTACH SZCZURA W TRAKCIE STARZENIA

Wzrost ilości oraz wielkości lizosomów w komórkach wielu tkanek i narządów należy do najlepiej udokumentowanych morfologicznych wykładników starzenia na poziomie komórki [31]. W hepatocytach starych szczurów lizosomy stanowią populację znacznie bardziej heterogenną niż w komórkach młodych osobników [43]. Dzięki zastosowaniu metod izolacji poszczególnych rodzajów komórek wątrobowych, wykazano, że aktywność dziewięciu głównych enzymów lizosomalnych określana w stosunku do zawartości białka komórkowego jest kilkakrotnie wyższa w mięsaszowych komórkach wątroby niż w hepatocytach [40, 42]. Potwierdzono w ten sposób przypuszczenie o przewadze układu lizosomalnego w komórkach mięsaszowych, które zawierają aż 40% objętości struktur lizosomalnych obecnych we wszystkich komórkach wątroby [8].

W tab. 2 przedstawiono wpływ wieku na aktywność niektórych en-

TABELA 2

Wpływ wieku na aktywność enzymów lizosomalnych w wątrobie szczura

Rasa i płeć	Wiek (m-ce)	kateps. D	k. fosfat.*	k. lipaza	k. DNA-za	k. RNA-za	glukam.	β -glukur.	β -galak.	AS-B	AM-B	Piśm.
Izolowane hepatocyty												
BN/Bi ♀	3-24 ^a	+127	+26	+119	bz		-43	bz	bz	bz	bz	[10]
Homogenaty wątroby												
BN/Bi ♀	3-24 ^a	bz	bz							+30	-46	[41]
F-344 ♂	1/27		bz					+31				[65]
Donryu ♂	1.5/26		-34			bz	-28					[3]
SIV ♀	1.5/18	bz					bz	+40				[58]
Wistar ♀	2/29	+45										[92]

„+” i „-” oznaczają odpowiednio wzrost i spadek aktywności enzymu w grupie zwierząt starych o odsetek jego aktywności w grupie młodych zwierząt,

Oznaczenia skrótów: bz — brak zmiany, F-344 — Fischer 344, kateps. D — katepsyna D, k. — kwaśna, k. fosfat. — kwaśna fosfataza, glukam. — N-acetylo-glukozaminidaza, β -glukur. — β -glukuronidaza, β -galak. — β -galaktozydaza, AS-B — arylosulfataza B, AM-B — aminopeptydaza B,

^a badano szczury w wieku 3, 12 i 24 miesięcy

* w hepatocytach starych szczurów rasy BN/Bi wykazano znaczną heterogenność izoenzymów kwaśnej fosfatazy [53, 71]

zymów lizosomalnych w izolowanych hepatocytach lub w homogenatach wątroby. Wyniki, które otrzymano, badając homogenaty wątroby, stanowią oczywiście wypadkową przemian przebiegających we wszystkich populacjach komórek wątroby. Z przedstawionych w tab. 2 danych wynika, że nie istnieje jeden kierunek związanych z wiekiem zmian aktywności enzymów lizosomalnych w hepatocytach szczura. Z badań tych wynika też, że wpływ wieku na aktywność wielu enzymów, nie tylko lizosomalnych, powinien być oddzielnie oceniany dla każdej populacji komórek wątrobowych.

5. HETEROGENNOŚĆ HEPATOCYTÓW W OBREBIE PŁACIKA WĄTROBOWEGO

W zależności od umiejscowienia w obrębie płacika wątrobowego, hepatocyty można określić jako środkowopłacikowe (centrolobularne) i obwodowe (periportalne), a między nimi wyróżnić można najtrudniejszą do opisanego strefę pośrednią płacika [49, 60]. Za pomocą różnych technik badawczych (histochemia, mikroskopia elektronowa, mikrodyssekcja, perfuzja i mikroperfuzja wątroby) wykazano w obrębie płacika heterogenność przestrzenną w przebiegu takich procesów, jak glikogeneza i glikogenoliza [35], glikoliza [19, 50], glukoneogeneza [2], synteza albuminy [47], cykl mocznikowy [29], metabolizm leków [27, 82] oraz różnice w lokalizacji niektórych enzymów [80, 95]. Różnice między hepatocytami należącymi do różnych stref płacika stwierdzono także w badaniach morfometrycznych [33, 49].

W cytowanych tu pracach autorzy oddzielnie analizowali wpływ wieku i starzenia na zmiany ultrastruktury hepatocytów środkowopłacikowych i periportalnych [52, 63, 64] oraz komórek strefy pośredniej [52]. Niezależnie od wieku szczurów hepatocyty środkowopłacikowe były zawsze większe od komórek periportalnych oraz zawierały więcej gładkiej siateczki śródplazmatycznej, natomiast w hepatocytach periportalnych więcej było błon siateczki szorstkiej [52, 64].

Wpływ starzenia na objętość mitochondriów i lizosomów w komórkach należących do różnych stref płacika wątrobowego szczura przedstawiono w tab. 3. Wraz z wiekiem dochodzi też do zmian w obrębie płacika w ekspresji niektórych enzymów, których aktywność oceniano za pomocą metod histochemicznych (tab. 3). Aktywność np. zasadowej fosfatazy, enzymu związanego z kanalikową domeną błony komórkowej hepatocytów, była w wątrobie starych szczurów i myszy silniej wyrażona w komórkach periportalnych niż w środkowopłacikowych, natomiast w wątrobie młodych zwierząt była równomiernie rozmieszczona w obrębie płacika [93]. Wyniki badań przytoczonych w tab. 3 wska-

TABELA 3

Wpływ wieku na heterogenność hepatocytów w obrębie płacika wątroby szczura

BADANIA MORFOMETRYCZNE

	Wielkość	SER ^a	RER ^b	Objętość lizosomów	Objętość mitochondriów
Szczury młode	hcl > hpp	hcl > hpp	hcl < hpp	hcl = hpp	hcl < hpp
Szczury stare	jw.	jw.	jw.	hcl ≥ hpp	jw.
Piśmiennictwo	[43, 52, 64]	[52, 63, 64]	[52, 64]	[43, 52, 64]	[52, 64]

BADANIA HISTOCHEMICZNE

	Enzymy lizosomalne ^c	Fosfataza zasadowa	γ-GT ^d
Szczury młode	hcl < hpp	hcl > hpp	brak aktywności
Szczury stare	jw.	hcl < hpp	hcl < hpp
Piśmiennictwo	[86]	[93]	36

^a ^b — powierzchnia zajmowana przez błony gładkiej ^a lub szorstkiej ^b siateczki śródplazmatycznej, ^c — kwasna fosfataza, β-glukuronidaza, N-acetylo-β-D-glukozaminidaza, ^d — γ-glutamylotranspeptydaza, hcl — hepatocyty centralobularne, hpp — hepatocyty periportalne, ≥ — znaczny wzrost objętości

zują na to, że procesy starzenia w niejednakowym stopniu — przynajmniej w odniesieniu do niektórych przemian — wpływają na strukturę i funkcje hepatocytów położonych w różnych strefach płacika wątrobowego.

6. PODSUMOWANIE

Wątroba ssaków zbudowana jest z kilku rodzajów komórek. Komórki mięszone wątroby, czyli hepatocyty, stanowią 60% liczby wszystkich komórek wątroby i zajmują 85% objętości wszystkich komórek wątroby szczura. Do niemięszonej komórek wątroby należą komórki siateczkowo-śródbłonkowe gwiaździste, czyli komórki Kupfera, endoteliocyty zatok wątrobowych, komórki gromadzące tłuszcze, czyli lipocyty, oraz komórki pit. W miarę starzenia się ludzi waga wątroby ulega zmniejszeniu, natomiast w trakcie rozwoju i starzenia się gryzoni ciężar wątroby stanowi niemal nie zmienioną część ciężaru ciała, wynoszącą od 2,5 do 5%. Wraz z wiekiem, a szczególnie w pierwszym roku życia w wątrobie myszy i szczura znacznie rośnie odsetek hepatocytów zawierających ponaddiploidalną ilość DNA, w wątrobie starych ludzi

udział tych komórek wynosi ok. 20%. Związane z wiekiem zwiększeniu stopnia ploidalności komórek mięsaszowych towarzyszy wzrost ich wielkości oraz zmniejszenie ich liczby w jednostce objętości mięszu wątroby. Występujące w trakcie starzenia zmiany w ultrastrukturze hepatocytów polegają przede wszystkim na blisko 2-krotnym wzroście liczby i objętości lizosomów pierwotnych i wtórnych oraz na zmniejszeniu ilości mitochondriów. W zależności od rasy szczura w hepatocytach starych zwierząt występuje spadek lub wzrost powierzchni zajmowanej przez błony gładkiej siateczki śródplazmatycznej. Mimo znacznego wzrostu ilości lizosomów wraz z wiekiem w izolowanych hepatocytach szczura rośnie aktywność jedynie niektórych enzymów lizosomalnych, aktywności zaś innych enzymów maleją lub nie ulegają zmianie. W wątrobie młodych i starych szczurów wykazano różną lokalizację kilku enzymów w obrębie płacika. Związane ze starzeniem zmiany w budowie hepatocytów mają charakter nie jakościowy, lecz ilościowy. Wydaje się, że mogą one być powodem zmian w niektórych czynnościach tych komórek.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALFERT M., GESCHWIND I. I., The development of polysomaty in rat liver, *Exp. Cell Res.*, **15**: 230 - 232, 1958.
- [2] ANUNDI I., KAUFMANN F. C., THURMAN R. G., Gluconeogenesis from fructose predominates in periportal regions of the liver lobule, *J. Biol. Chem.*, **262**: 9529 - 9534, 1987.
- [3] ASANO S., KOMORIYA H., HAYASHI E., SAWADA H., Changes in intracellular activities of lysosomal enzymes in tissues of rats during aging, *Mech. Age Dev.*, **10**: 81 - 92, 1979.
- [4] BARZ H., KUNZE K. D., VOSS K., SIMON H., Altersabhängige Veränderungen morphologischer Parameter der Leberzellkerne im Biopsiematerial, *Exp. Pathol.*, **14**: 55 - 64, 1977.
- [5] BERRY M. N., FRIEND D. S., High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells, *J. Cell Biol.*, **43**: 506 - 520, 1969.
- [6] BLOMHOFF R., DREVON C. A., ESKLID W., HELGERUD P., NORUM K. R., BERG T., Clearance of acetyl low density lipoprotein by rat liver endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, **259**: 8898 - 8903, 1984.
- [7] BLOMHOFF R., HOLTZE K., NAESS L., BERG T., Newly administered (³H) retinol is transferred from hepatocytes to stellate cells in liver for storage, *Exp. Cell Res.*, **150**: 186 - 193, 1984.
- [8] BLOUIN A., BOLENDER R. P., WEIBEL E. R., Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma, *J. Cell Biol.*, **72**: 441 - 455, 1972.
- [9] BRITTON G. W., BRITTON V. J., GOLD G., ADELMAN R. C., The capability for hormone-stimulated enzyme adaptation in liver cells isolated from aging rats, *Exp. Gerontol.*, **11**: 1 - 4, 1976.

- [10] BROUWER A., HORAN M. A., BARELDS R. J., KNOOK D. L., Cellular aging of the reticuloendothelial system, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **5**: 317 - 324, 1986.
- [11] BROUWER A., WISSE E., KNOOK D. L., Sinusoidal endothelial cells and perisinusoidal fat-storing cells, [W] *The Liver: Biology and Pathobiology*, wyd. 2, red. I. M. Arias, W. B. Jakoby, H. Popper, D. Schachter, D. A. Schafritz, Raven Press, New York 1988, 665 - 682.
- [12] BÜRGER M., Biomorfoza i jej znaczenie w procesie starzenia oraz dla przebiegu chorób, PZWL, Warszawa 1965.
- [13] CARRIERE R., The growth of liver parenchymal nuclei and its endocrine regulation, *Inst. Rev. Cytol.*, **28**: 201 - 227, 1969.
- [14] COLEMAN G. L., BARTHOLD S. W., OSBALDISTON S. W., FOSTER S. J., JONAS A. M., Pathological changes during aging in barrier-reared Fischer 344 male rats, *J. Gerontol.*, **32**: 258 - 278, 1977.
- [15] COLLINS J. M., RNA synthesis in rat liver cells with different DNA content, *J. Biol. Chem.*, **253**: 5769 - 5773, 1978.
- [16] DAVID H., Quantitative characterization of ageing hepatocytes, *Acta Stereol.*, **2**: 408 - 412, 1983.
- [17] DENKHAUS W., Kerngroesse, DNS-Gehalt und Ploidie-Klassen menschlicher Leberzellen in Abhängigkeit von Lebensalter, *Z. Gerontol.*, **3**: 88 - 96, 1970.
- [18] De PRIESTER W., Van MANEN R., KNOOK D. L., Lysosomal activity in the aging rat liver: II. Morphometry of acid phosphatase positive dense bodies, *Mech. Age. Dev.*, **26**: 205 - 216, 1984.
- [19] DROCHMANS P., WANSON J.-C., MOSSELMANS R., Isolation and sub-fractionation on Ficoll gradients of adult rat hepatocytes, *J. Cell Biol.*, **66**: 1 - 22, 1975.
- [20] ENESCO H. E., A cytophotometric analysis of DNA content of rat liver nuclei in aging, *J. Gerontol.*, **22**: 445 - 448, 1967.
- [21] ENESCO H. E., SAMBORSKY J., Liver polyploidy: influence of age and of dietary restriction, *Exp. Gerontol.*, **18**: 79 - 87, 1983.
- [22] EPSTEIN C. J., Cell size, nuclear content and the development of polyploidy in the mammalian liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**: 327 - 334, 1967.
- [23] FRIEDMAN S. L., ROLL F. J., BOYLES J., BISSELL D. M., Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**: 8681 - 8685, 1985.
- [24] GAHAN P. B., Increased level of euploidy as a strategy against rapid aging in diploid mammalian systems: an hypothesis, *Exp. Gerontol.*, **12**: 133 - 136, 1977.
- [25] GARG B. D., KOUROUNAKIS P., TUCHWEBER P., Fine structural changes in the liver of young and old rats as influenced by microsomal enzyme inducers, *Gerontology*, **25**: 315 - 321, 1979.
- [26] GREENGARD O., FEDERMAN N., KNOX W. E., Cytophotometry of developing rat liver and its application to enzymic differentiation, *J. Cell Biol.*, **52**: 261 - 272, 1972.
- [27] GUMUCIO J. J., MAY M., DVORAK C., CHIANALE J., MASSEY V., The isolation of functionally heterogenous hepatocytes of the proximal and distal half of the liver acinus in the rat, *Hepatology*, **6**: 932 - 944, 1986.
- [28] HAM A. W., CORMACK D. H., *Histology*, Wyd. 8, Lippincott, Philadelphia 1979.
- [29] HÄUSSINGER D., GEROK W., Hepatocyte heterogeneity in glutamate uptake by isolated perfused rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **136**: 421 - 425, 1983.

- [30] HOLLANDER C. F., SOLLEVELD H. A., ZUCHER C., NOOTEBOOM A. L., Van ZWIETEN J., Biological and clinical consequences of longitudinal studies in rodents: their possibilities and limitations. An overview, *Mech. Age. Dev.*, **28**: 249 - 260, 1984.
- [31] IKEDA H., TAUCHI H., SATO T., Fine structural analysis of lipofuscin in various tissues of rats of different ages, *Mech. Age. Dev.*, **33**: 77 - 93, 1985.
- [32] JAMES J., The genesis of polyploidy in rat liver parenchymal cells, *Cytophysiologie*, **15**: 410 - 419, 1977.
- [33] JONES A. L., SCHMUCKER D. L., MOONEY J. S., ADLER R. D., OCKNER R. K., Morphometric analysis of rat hepatocytes after total biliary obstruction, *Gastroenterology*, **71**: 1050 - 1060, 1976.
- [34] JONES E. A., SOMMERFIELD J. A., Functional aspects of hepatic sinusoidal cells, *Seminars Liver Disease*, **5**: 157 - 174, 1985.
- [35] JUNGERMAN K., Functional heterogeneity of periportal and perivenous hepatocytes, *Enzyme*, **35**: 161 - 180, 1986.
- [36] KITAGAWA T., IMAI F., SATO K., Re-elevation of gamma-glutamyl transpeptidase activity in periportal hepatocytes of rat with age, *Gann*, **71**: 362 - 366, 1980.
- [37] KITANI K., Functional aspects of the aging liver, [W] *Liver and Aging*, red. D. Platt, Schattauer Verlag, Stuttgart 1977, 5 - 17.
- [38] KMENT A., HOFECKER G., Electron microscopical gerontological studies on rat liver mitochondria, [W] *Liver and Aging*, red. D. Platt, Schattauer Verlag, Stuttgart 1977, 65 - 71.
- [39] KNOOK D. L., The isolated hepatocyte: a cellular model for aging studies, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **165**: 170 - 177, 1980.
- [40] KNOOK D. L., Organ aging in relation to cellular aging, [W] *Lectures on Gerontology*, red. A. A. Viidik, Academic Press, London 1982, 213 - 251.
- [41] KNOOK D. L., SLEYSTER E. C., Lysosomal enzyme activities in parenchymal and nonparenchymal liver cells isolated from young, adult and old rats, *Mech. Age. Dev.*, **5**: 389 - 397, 1976.
- [42] — Isolated parenchymal, Kupfer and endothelial cells characterized by their lysosomal enzyme content, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**: 250 - 257, 1980.
- [43] KNOOK D. L., SLEYSTER E. C., Van NOORD M. J., Changes in lysosomes during ageing of parenchymal and non-parenchymal liver cells, [W] *Impairment in Aging and Development*, red. V. J. Cristofalo, E. Holéckova, Plenum Press, London 1975, 155 - 170.
- [44] KNOOK D. L., BLANSJAAR N., SLEYSTER E. C., Isolation and characterization of Kupfer and endothelial cells from the rat liver *Exp. Cell Res.*, **109**: 317 - 329, 1977.
- [45] KNOOK D. L., SEFFELAAR A. M., De LEEUW A. M., Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and characterization, *Exp. Cell Res.*, **139**: 468 - 471, 1982.
- [46] KOIZUMI A., WEINDRUCH R., WALFORD R. L., Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice, *J. Nutr.*, **117**: 361 - 367, 1987.
- [47] Le BOUTTON A. V., Routine overnight starvation and immunocytochemistry of hepatocyte albumin content, *Cell Tissue Res.*, **227**: 423 - 431, 1982.
- [48] LINDNER J., GASEDYCK K., BITTMAN S., MANGOLD I., SCHUETTE B., UEBERBERG H., Some morphological and biochemical results on liver aging, [W] *Liver and Aging*, red. D. Platt, Schattauer Verlag, Stuttgart 1977, 23 - 38.

- [49] LOUD A. V., A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells, *J. Cell Biol.*, **37**: 27 - 46, 1969.
- [50] MATSUMURA T., THURMAN R. G., Predominance of glycolysis in pericentral regions of liver lobule, *Eur. J. Biochem.*, **140**: 229 - 234, 1984.
- [51] MEDVEDEV Z. A., Age-related polyploidization of hepatocytes: the cause and possible role. A mini-review, *Exp. Gerontol.*, **21**: 277 - 282, 1986.
- [52] MEIHUIZEN S. P., BLANSJAAR N., Stereological analysis of liver parenchymal cells from young and old rats, *Mech. Age. Dev.*, **13**: 111 - 118, 1980.
- [53] MIDDLETON J., GAHAN P. B., A quantitative cytochemical study of acid phosphatases in hepatocytes of different ploidy classes from aging rats, *Exp. Gerontol.*, **19**: 355 - 358, 1984.
- [54] MYŚLIWSKI A., MYŚLIWSKA J., KMIEĆ Z., Age-related changes in liver cell nuclei of different ploidity, *Histochemistry*, **52**: 91 - 96, 1977.
- [55] MYŚLIWSKI A., MYŚLIWSKA J., FRĄCKOWIAK J., KMIEĆ Z., Hormonal effects on the number of binuclear cells in the growing rat liver, *Folia Morphol. (Warsz.)*, **39**: 355 - 362, 1980.
- [56] NADAL C., ZAJDELA F., Polyploidie somatique dans le foie de rat, *Exp. Cell Res.*, **42**: 99 - 116, 1966.
- [57] OHTSUBO K., NOMAGUCHI T. A., A flow cytofluorometric study on age-dependent ploidy class changes in mouse hepatocyte nuclei, *Mech. Age. Dev.*, **36**: 125 - 131, 1986.
- [58] PLATT D., GROSS-FENGELS F., Influence of age and spironolactone on lysosomal activities, DNA and the protein content of the rat liver after partial hepatectomy, *Gerontology*, **25**: 87 - 93, 1979.
- [59] PRAANING-VAN-DALEN D. P., BROUWER A., KNOOK D. L., Clearance capacity of rat liver Kupfer, endothelial and parenchymal cells, *Gastroenterology*, **81**: 1036 - 1044, 1981.
- [60] RAPPAPORT A. M., The microcirculatory concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitr. Pathol.*, **157**: 215 - 243, 1976.
- [61] ROTHER P., BEETZ G., BOETTGER O., Die Kerngroessenklassen menschlicher Hepatozyten in Altersgang, *Z. mikroskop.-anatom. Forschung (Leipzig)*, **94**: 3 - 20, 1980.
- [62] SATO T., CESPEDES R. F., GOYENAGA P. H., TAUCHI H., Age changes in livers of Costa Ricans, *Mech. Age. Dev.*, **11**: 171 - 178, 1979.
- [63] SCHMUCKER D. L., Age-related changes in hepatic endoplasmic reticulum: a quantitative analysis, *Science*, **197**: 1005 - 1008, 1977.
- [64] SCHMUCKER D. L., MOONEY J. S., JONES A. L., Stereological analysis of hepatic fine structure in the Fischer 344 rat. Influence of sublobular location and animal age, *J. Cell Biol.*, **78**: 319 - 337, 1978.
- [65] SCHMUCKER D. L., WANG R. K., Rat liver lysosomal enzymes: effects of animal age and phenobarbital, *Age*, **2**: 93 - 96, 1979.
- [66] SEGLEN P. O., Preparation of isolated rat liver cells, *Meth. Cell Biol.*, **13**: 29 - 83, 1976.
- [67] SENOO H., HATA R.-I., NAGAI Y., WAKE K., Stellate cells (vitamin A-storing cells) are the primary site of collagen synthesis in non-parenchymal cells in the liver, *Biomed. Res.*, **5**: 451 - 458, 1984.
- [68] SHAPIRO H., HOTTA S. S., OUTEN W. E., KLEIN A. W., The effect of aging on rat liver regeneration, *Experientia*, **38**: 1075 - 1076, 1982.
- [69] SHERLOCK S., *Diseases of the liver and biliary system*, Blackwell, Oxford 1975.
- [70] SHIMA A., SHUGARA T., Age dependent ploidy classes changes in mouse

- hepatocyte nuclei as revealed by Feulgen cytofluorimetry, *Exp. Gerontol.*, **11**: 193 - 203, 1976.
- [71] SLEYSTER E. C., KNOOK D. L., Aging and multiple forms of acid phosphatase in isolated rat liver cells, *Mech. Age. Dev.*, **14**: 443 - 452, 1980.
- [72] SMEDSROD B., KJELLEN L., PERTOFT H., Endocytosis and degradation of chondroitin sulfate by liver endothelial cells, *Biochem. J.*, **229**: 63 - 71, 1985.
- [73] STOCO D. M., HUDTON J. C., Quantitation of mitochondrial DNA and protein in the liver of Fischer 344 rats during aging, *J. Gerontol.*, **33**: 802 - 809, 1978.
- [74] THOMPSON E. N., WILLIAMS R., Effect of age on liver function with particular reference to bromosulphalein excretion, *Gut*, **6**: 266 - 269, 1965.
- [75] TATE E. L., HERBENER G. H., A morphometric study of the density of mitochondrial cristae in heart and liver of aging mice, *J. Gerontol.*, **31**: 129 - 134, 1976.
- [76] TAUCHI H., SATO T., Age changes in size and number of mitochondria of human hepatic cells, *J. Gerontol.*, **23**: 454 - 461, 1968.
- [77] — Effect of environmental conditions upon age changes in human liver, *Mech. Age. Dev.*, **4**: 71 - 80, 1975.
- [78] — Hepatic cells of the aged, [W] *Liver and Aging — 1978*, red. K. Kitani, Elsevier, Amsterdam 1978, 3 - 19.
- [79] — Changes in hepatic cell mitochondria during parabiosis between young and old rats, *Mech. Age. Dev.*, **12**: 7 - 14, 1980.
- [80] TEUTSCH H. F., Chemomorphology of liver parenchyma, *Progr. Histochem. Cytochem.*, **14**: 1 - 88, 1981.
- [81] THEIMER W., *Altern und Alter*, Thieme, Stuttgart 1973.
- [82] THURMAN R. G., KAUFFMAN F. C., Sublobular compartmentation of pharmacological events (SCOPE): metabolic fluxes in periportal and pericentral regions of the liver lobule, *Hepatology*, **5**: 144 - 151, 1985.
- [83] Van BEZOOIJEN C. F. A., Cellular basis of liver aging studied with isolated hepatocytes, Thesis, Utrecht 1978.
- [84] Van BEZOOIJEN C. F. A., De LEEUW-ISRAEL F. R., HOLLANDER C. F., On the role of hepatic cell ploidy in changes in liver function with age and following partial hepatectomy, *Mech. Age. Dev.*, **1**: 351 - 356, 1972/73.
- [85] Van BEZOOIJEN C. F. A., Van NOORD M. J., KNOOK D. L., The viability of parenchymal liver cells isolated from young and old rats, *Mech. Age. Dev.*, **3**: 107 - 119, 1974.
- [86] Van MANEN R., De PREISTER W., KNOOK D. L., Lysosomal activities in aging rat liver: I. Variation in enzyme activity within the liver lobule, *Mech. Age. Dev.*, **22**: 159 - 165, 1983.
- [87] WAKE K., Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs, *Int. Rev. Cytol.*, **66**: 303 - 353, 1980.
- [88] WATANABE T., SHIMADA H., TANAKA Y., Human hepatocytes and aging: a cytophotometrical analysis in 35 sudden death cases, *Virchows Arch (Cell Pathol.)*, **27**: 307 - 316, 1978.
- [89] WATANABE T., TANAKA Y., Age-related alterations in the size of human hepatocytes. A study of mononuclear and binucleate cells, *Virchows Arch (Cell Pathol.)*, **39**: 9 - 20, 1982.

- [90] WATANABE T., TANAKA Y., KIMULA Y., A cytophotometric study on the centenarian hepatocyte, *Virchows Arch. (Cell Pathol.)*, **46**: 265 - 268, 1984.
- [91] WHEATLEY D. N., Binucleation of mammalian liver, *Exp. Cell Res.*, **74**: 455 - 465, 1972.
- [92] WIEDERANDERS B., OELKE B., Accumulation of inactive cathepsin D in old rats, *Mech. Age. Dev.*, **24**: 265 - 271, 1984.
- [93] WILSON P. D., Differential enzyme distribution in lobules of livers from young and old mice and rats, *Gerontology*, **24**: 348 - 357, 1978.
- [94] WILSON P. D., FRANKS L. M., The effect of age on mitochondrial ultra-structure, *Gerontologia*, **21**: 81 - 94, 1975.
- [95] WILSON P. D., WATSON R., KNOOK D. L., The effect of age on rat liver enzymes: a study using isolated hepatocytes, *Gerontology*, **28**: 32 - 43, 1982.
- [96] YU B. P., WONG G., LEE H. C., BERTRAND H., MASORO E. J., Age changes in hepatic metabolic characteristics and their modulation by dietary manipulation by dietary manipulation, *Mech. Age. Dev.*, **24**: 67 - 81, 1984.
- [97] ZS.-NAGY I., PIERI C., The aging of rat liver as revealed by electron microscopic morphometry and other quantitative cytological methods under normal conditions and subsequent to partial hepatectomy, [W] *Liver and Aging*, red. D. Platt, Schattauer Verlag, Stuttgart 1977, 43 - 58.

Otrzymano: 30 września 1986.

Przyjęto: 15 stycznia 1988.

Adres autora: ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk.

WPŁYW STARZENIA NA AKTYWNOŚĆ METABOLICZNĄ HEPATOCYTÓW

METABOLIC ACTIVITIES OF HEPATOCYTES DURING AGING

Zbigniew Kmieć

Katedra i Zakład Histologii, Akademia Medyczna w Gdańsku

Streszczenie. Towarzyszące starzeniu zmiany w przemianach metabolicznych wątroby najczęściej oceniane były w homogenatach narządu lub w izolowanych hepatocytach. Wraz z wiekiem w wątrobie gryzoni maleje całkowita synteza białka i transferyny, rośnie natomiast synteza albuminy. Obniżeniu ulega także wielkość transkrypcji RNA oraz zdolność hepatocytów do naprawy uszkodzeń w DNA. W trakcie starzenia maleje wątrobowa synteza cholesterolu i kwasów żółciowych. Wpływ wieku na przemianę węglowodanową w wątrobie oraz na interakcje hormonów z błoną komórkową hepatocytów jest słabo poznany. Procesy starzenia w niewielkim tylko stopniu wpływają na funkcje mitochondriów wątroby. Wraz z wiekiem w wątrobie szczura maleje tempo metabolizmu hemu, synteza zaś prostaglandyn PGE₂ i PGF₂ ulega obniżeniu.

Summary. The effect of aging on metabolic characteristics of mammalian liver has mostly been studied in liver homogenates or in isolated hepatocytes. Generally total protein and transferrin synthesis, RNA transcription and DNA repair in rodent liver decrease, whereas albumin synthesis increases during aging. The liver cholesterol and bile acid synthesis decline with age. The age-associated modifications of liver carbohydrate metabolism and of hormone-cell membrane interactions have so far been purely characterized. It seems that the function of liver mitochondria change to only a minor extent with age. The rate of heme metabolism and the prostaglandin synthesis in rat liver decline during aging.

Do charakterystycznych cech procesów starzenia należy obniżenie zdolności adaptacyjnych organizmów do zmieniających się warunków środowiska zewnętrznego i wewnętrznego. Przyczyny tego zjawiska obejmują zarówno zmiany przebiegające na poziomie komórek i narządów, jak i w obrębie układu endokrynnego i nerwowego. Wątroba jest

narzędem odgrywającym główną rolę w regulacji homeostazy metabolicznej organizmów, stąd też poznanie wpływu wieku na jej funkcje należy uznać za ważne zadanie badawcze. Ponieważ większość spośród sepek reakcji biochemicznych, które przebiegają w wątrobie ssaków, zlokalizowana jest w mięszszowych komórkach wątroby, czyli hepatocytach, komórki te, po wyizolowaniu, stanowią doskonały materiał badawczy. W wielu jednak pracach jako materiał doświadczalny używano homogenaty wątroby lub frakcje subkomórkowe homogenatów; w tych przypadkach wyniki badań można z dość dużym prawdopodobieństwem odnosić do hepatocytów, ponieważ niemięszszowe komórki wątroby zajmują zaledwie 6⁰%, hepatocyty zaś aż 78⁰% objętości narządu [15]. W pracy tej przedstawiono związane z procesami starzenia zmiany w czynnościach komórek mięszszowych wątroby ssaków.

1. METABOLIZM BIAŁEK

Wątroba jest głównym, oprócz mięśni szkieletowych, źródłem nowo syntetyzowanych białek ustroju, stanowiąc jednocześnie miejsce intensywnej degradacji białek własnych i białek docierających drogą krwi [167]. Wyłącznie w wątrobie produkowany jest fibrynogen i inne białka układu krzepnięcia oraz albuminy. Również większość α - i β -globulin wytwarzana jest w wątrobie [55]. Z tego względu wkrótce po opublikowaniu współczesnych technik badawczych wpływ starzenia na syntezę białka w warunkach *in vitro* stał się przedmiotem licznych i trwających do chwili obecnej badań.

1.1. WPŁYW STARZENIA NA WIELKOŚĆ SYNTEZY BIAŁKA

Na podstawie opublikowanych wyników badań można przyjąć, iż w zależności od rasy i płci zwierząt wpływ wieku na syntezę białka w izolowanych hepatocytach oraz w układach bezkomórkowych przejawia się dwoma typami zmian (tab. 1). W pierwszym przypadku zaobserwowano stałe, postępujące z wiekiem obniżenie syntezy białka [31, 43, 159]. W drugim typie zmian stwierdzono spadek produkcji białka w wątrobie starych zwierząt w porównaniu ze zwierzętami młodymi i dojrzalymi oraz istotny wzrost syntezy białka w wątrobie najstarszych szczurów w porównaniu z osobnikami starymi [17, 28, 30, 154, 155, 164]. Przyczyny zwiększonej produkcji białka w hepatocytach bardzo starych szczurów nie są bliżej poznane. Przypuszcza się, że zjawisko to jest wtórną odpowiedzią kompensacyjną wobec zwiększonej u tych zwierząt

utrąty białka z moczem; u starych szczurów rasy Fischer 344 obserwowano znaczny stopień niedomogi nerek [29]. W przypadku zaś szczurów rasy WAG/Rij wzrost produkcji białka w hepatocytach najstarszych zwierząt spowodowany jest podwyższoną syntezą albumin [153]. Istnieje też możliwość, iż bardzo stare szczury stanowią wyselekcjonowaną

TABELA 1
Wpływ starzenia na syntezę białka w wątrobie gryzoni

Rasa i płeć	Wiek (miesiące)	Rodzaj układu doświadczalnego	Wielkość zmiany	Piśmienictwo
Szczury:				
Sp.-D. ♂	2-3, 13, 27	hepatocyty	↘ 62%	[159]
WAG/Rij ♂	3, 12, 20, 27	hepatocyty	↘ 18% ↗ 70%	[155] [155]
WAG/Rij ♀	3, 12, 24, 24, 36	hepatocyty	↘ 52% ↗ 70%	[154] [154]
BN/Bi ♀	3, 31	hepatocyty	↗ 160%	[155]
F-344 ♂	3, 6, 12, 18, 18, 30	hepatocyty	↘ 44% ↗ 18%	[30] [30]
DA/Han ♂	1, 24-28	bezkomórkowy	↘ 56%	(43)
Wistar ♀	10-13, 24-30	bezkomórkowy	↘ 45%	[31]
Sp.-D. ♂	6, 12, 18, 24, 24, 36	bezkomórkowy	↘ 75% ↗ 210%	[17] [17]
Sp.-D. ♂	6, 12, 24, 24, 36	bezkomórkowy	↘ 30% ↗ 18%	[164] [164]
F-344 ♂	6, 12, 24, 24, 32	bezkomórkowy	↘ 37% ↗ 21%	[164] [164]
WAG/Rij ♀	3, 12, 24, 24, 36	bezkomórkowy	↘ 45% ↘ 50%	[28] [28]
Wistar ♂	15, 17	bezkomórkowy	bez zmian	[27]
Myszy:				
C57BL/6J ♂	9, 30	bezkomórkowy	↘ 47%	[90]
C57BL/6J ♂	14, 27	bezkomórkowy	↘ 24%	[81]
C57BL/6J ♂	1-3, 18-24	bezkomórkowy	↘ 60%	[96]
ddY ♂	3, 26	bezkomórkowy	↘ 30%	[98]
ddY ♂	2-5, 20-27	bezkomórkowy	↘ 35%	[105]
C57BL ♂	3, 25	bezkomórkowy	↗ 10%	[102]
C57BL/6J ♀	3, 6, 27	mitochondria — bezkomórkowy	↘ 45%	[3]

Izolowane hepatocyty lub układy bezkomórkowe, zawierające mikro-somy lub polisomy i rozpuszczalne składniki aparatu translacji obecne w cytozolu, inkubowano w obecności ¹⁴C-leucyny, a następnie oceniano wielkość piętna w kwaśnych ekstraktach lub w rozpuszczonym materiale komórkowym.

↘ oznacza spadek, a ↗ wzrost w syntezie białka między skrajnie położonymi w danej linii grupami wiekowymi o odsetek wielkości syntezy białka stwierdzonej w grupie młodych zwierząt.

Oznaczenia skrótów: Sp.-D. — Sprague-Dawley, F-344 — Fischer 344.

grupę zwierząt o szczególnych „długowiecznych” właściwościach, wskutek czego bezpodstawne byłoby zaliczanie ich do populacji osobników normalnie się starzejących (jedynie 10% samic szczura rasy WAG/Rij dożywa wieku 36 miesięcy [152]).

1.1.1 Synteza specyficznych białek w wątrobie gryzoni

Rezultaty badań dotyczących wytwarzania charakterystycznych dla wątroby rodzajów białek przedstawiono w tab. 2. Z przytoczonych danych wynika, że wraz z rosnącym wiekiem w wątrobie szczura docho-

TABELA 2

Synteza specyficznych dla wątroby rodzajów białek w trakcie starzenia szczura

Rodzaj białka	Rasa i płeć	Wiek (miesiące)	Charakter zmiany	Piśmienictwo
Izolowane hepatocyty				
albumina	WAG/Rij ♀	3, 12	↙ 40%	[153]
		12, 36	↗ 133%	[153]
Układy bezkomórkowe				
albumina	WAG/Rij ♀	3, 12	bez zmian	[61]
		12, 24	↙ 34%	[61]
albumina	F-344 ♂	1,5, 24	↙ 50%	[27]
transferyna	Sp.-D. ♂	6, 12 ^a	↙ 83%	[17]
		12, 30	↙ 76%	[17]
α_{2u} -globulina	F-344 ♂	3, 20	↙ 50%	[128]
		20, 30	↙ 90%	[128]

dzi do wzrostu [61, 153] lub do spadku syntezy pewnych rodzajów białka [17, 126, 159]. Ze względu na fizjologiczną rolę albumin oraz na ich znaczny ilościowy udział w ogólnoustrojowej produkcji białka [55] szczególnie interesujące wydaje się wykazanie ich podwyższonej syntezy w wątrobie starych szczurów [27, 153]. Stwierdzono, że zjawisko to spowodowane jest zwiększeniem zawartości w wątrobie specyficznego dla albuminy mRNA [61, 110]; wzrost ten miał miejsce we frakcji poli (A)⁻-RNA oraz we frakcji polirybosomów związanych z błonami. Ponieważ w organizmach starych szczurów rasy WAG/Rij nie zaobserwowano ani wzmożonej proteinurii, ani wzrostu utraty albumin przez ściany przewodu pokarmowego [60], nasilenie więc wątrobowej syntezy albumin wydaje się odpowiedzią kompensacyjną wobec rosnącej z wiekiem niespecyficznej endocytozy albuminy w wątrobie, nerkach, śledzionie i jelitach [62].

1.1.2. Mechanizmy odpowiedzialne za obniżenie produkcji białka w trakcie starzenia

Modyfikacje aparatu translacji. Dane zawarte w tab. 1 przedstawiają wpływ starzenia na wielkość syntezy białka nie tylko w izolowanych hepatocytach szczura, ale również w układach bezkomórkowych, które zawierały wyizolowane z wątroby polirybosomy i inne elementy układu translacji. Mimo że produkcję białka w tych syntezach cechuje niewielka wydajność w porównaniu z syntezą *in vivo* (ok. 1%, wg [167]), to

TABELA 3

Wpływ starzenia na układ translacji w wątrobie myszy i szczura

Rodzaj zmiany	Piśmiennictwo
Rybosomy:	
wzrost liczby pojedynczych rybosomów	[28 ^s , 85 ^s , 156 ^m]
wzrost liczby małych polisomów i spadek liczby dużych polisomów	[91 ^m , 156 ^m]
spadek lub brak zmian liczby rybosomów aktywnych w procesie translacji	[82 ^m , 102 ^s]
brak zmian termostabilności rybosomów	[98 ^m]
zmiana struktury wysokooczyszczonych polisomów	[135 ^s , 156 ^m]
wzrost liczby wolnych podjednostek 40S w cytoplazmie	[98 ^m]
zmniejszenie agregacji polisomów z mRNA	[85 ^s]
Kwasy rybonukleinowe:	
zmiany w strukturze rRNA	[156 ^m]
spadek zawartości tRNA	[31 ^s , 156 ^m , 157 ^s]
zmniejszone wiązanie aminokwasów przez większość rodzajów tRNA	[31 ^s , 43 ^s , 44 ^s , 92 ^s , 157 ^s]
spadek aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA	[31 ^s , 44 ^s , 146 ^s]
wzrost o 20–30% liczby nieaktywnych cząsteczek syntetaz aminoacylo-tRNA	[145 ^m , 8, 146 ^s]
zmniejszenie metylacji tRNA	[92 ^s]
Inne elementy i aktywności układu translacji:	
spadek o 30–40% aktywności EF-1 ^a	[96 ^s]
brak zmian w aktywności EF-2 ^a	[96 ^s]
wzrost o 10–25% cząsteczek nieaktywnego EF-2	[147 ^m , 8]
spadek o 15–20% szybkości tworzenia kompleksu inicjacji	[105 ^m]
spadek o 40–80% szybkości wydłużenia łańcucha polipeptydowego przy braku zmian szybkości inicjacji i terminacji	[14 ^m , 43 ^s]

^a EF-1, EF-2 — czynnik elongacji —1 i —2, m, s oznacza, że badania przeprowadzono na myszach lub szczurach.

jednak badania tego typu dostarczyły cennych informacji o charakterze zmian zachodzących w układzie biosyntezy białka w trakcie starzenia się organizmów. Towarzyszące starzeniu modyfikacje aparatu translacji w wątrobie myszy i szczura przedstawiono w tab. 3.

Na podstawie nowszych badań [91, 135, 146] przypuszcza się, że obserwowane modyfikacje struktury i funkcji rybosomów oraz tRNA i syntetaz aminoacylo-tRNA są jedynie w niewielkim stopniu odpowiedzialne za związany ze starzeniem spadek syntezy białka w wątrobie gryzoni. Większe znaczenie przypisuje się znacznemu zmniejszeniu szybkości wydłużania łańcucha polipeptydowego w układzie translacyjnym pochodzącym z wątroby starych myszy [14] i szczurów [43].

Wpływ wieku na transkrypcję RNA i strukturę chromatyny. Spadek produkcji białka w wątrobie starych zwierząt może być również spowodowany zmianami na poziomie transkrypcji RNA. Najczęściej stosowaną w badaniach gerontologicznych metodą określania wielkości transkrypcji był pomiar włączania znakowanych radioaktywnie prekursorów do RNA izolowanych jąder komórkowych, mimo iż zdawano sobie sprawę z tego, że pomiary takie niekoniecznie musiały odzwierciedlać rzeczywistą szybkość syntezy RNA. (Wiadomo bowiem, że wielkość inkorporowanej do RNA radioaktywności zależeć może także od procesu wychwytywania prekursorów ze środowiska.) Dane przedstawione w tab. 4

TABELA 4

Wpływ starzenia na syntezę RNA w wątrobie myszy i szczurów

Układ doświadczalny, gatunek, rasa i płć	Wiek (miesiące)	Wielkość zmiany	Piśmien- nictwo
Jądra komórkowe			
Szczury: Fischer 344 ♀	13, 31	↙ 36%	[25]
Fischer 344 ♂	0,5, 4, 11, 27	↙ 46%	[88]
Sprague-Dawley ♀	4, 6, 12, 16, 18, 24	↙ 75%	[16]
Myszy: C57BL/6J ♀	6, 30	↙ 33%	[89]
nie podano	1, 25	↙ 43%	[36]
C57BL/6J ♀	3, 25	↙ 50%	[18]
Skrawki wątroby			
Szczur: Wistar ♂	12, 31	↙ 12%	[8]
Mysz: C57BL/6J ♂	3, 28	↙ 11%	[8]
Izolowane hepatocyty			
Szczur: Fischer 344 ♀	12, 30	↙ 37%	[78]
Fischer 344 ♀	12, 19, 30	↙ 40%	[122]

↙ oznacza spadek o wartość stanowiącą odsetek wielkości transkrypcji u zwierząt młodych lub dojrzałych; ♂ płci zwierząt nie podano.

wskazują, iż aktywność transkrypcyjna w wątrobie starych gryzoni jest o ok. 40 - 50% niższa niż zwierząt młodych lub dojrzałych. Przyczyny tego zjawiska poszukiwano w zachodzących wraz z wiekiem zmianach w syntezie poszczególnych rodzajów RNA, w strukturze mRNA, zawartości specyficznych rodzajów mRNA i aktywności enzymów uczestniczących w metabolizmie RNA (tab. 5).

TABELA 5

Zmiany w aparacie transkrypcji RNA w trakcie starzenia

Charakter zmiany	Piśmien- nictwo
Szczur:	
spadek syntezy hnRNA większy niż spadek syntezy rRNA, 5SrRNA, tRNA	[88]
spadek o 40% syntezy całkowitego RNA i poliadenylowanego RNA	[122]
4-krotne zwolnienie degradacji poliadenylowanego RNA	[97]
brak zmian w strukturze i aktywności translacyjnej poli(A) ⁺ RNA	[11]
obecność pewnych rodzajów mRNA w wątrobie wyłącznie młodych, innych rodzajów mRNA — wyłącznie starych szczurów	[26]
zawartość specyficznych rodzajów mRNA:	
wzrost mRNA albuminy	[61]
spadek mRNA $\alpha_{2\mu}$ -globuliny	[126]
brak zmian mRNA trzech czynników układu dopełniacza i mRNA α_1 -kwaśnej glikoproteiny	[127]
zwolnienie tempa inicjacji syntezy RNA	[95]
Mysz:	
brak zmian aktywności rybonukleazy	[18]
brak zmian aktywności polimerazy I i II	[9]
spadek aktywności polimerazy III	[9]

Wydaje się, że występujące w wątrobie starych zwierząt obniżenie aktywności transkrypcyjnej nie jest bezpośrednio spowodowane zmianami w aparacie transkrypcji przedstawionymi w tab. 5, natomiast mogłoby być wywołane procesami zachodzącymi na poziomie chromatyny. Istotnie, w odniesieniu do chromatyny wyizolowanej z wątroby szczura opisano zależny od wieku spadek jej aktywności matrycowej [10], natomiast chromatyna wątroby starych myszy syntetyzowała RNA z taką samą wydajnością jak u młodych zwierząt [111]. W trakcie starzenia się szczurów dochodzi do spadku wrażliwości chromatyny wątroby na denaturację cieplną [10, 117, 161] oraz na kwaśną hydrolizę [104]. Mimo że wzajemny stosunek ilościowy większości rodzajów histonów

jest podobny w chromatynie starych gryzoni [93, 94], to jednak wraz z wiekiem rośnie w ich wątrobie zawartość histonu H1 [93, 94, 108]. Enzymatyczna degradacja chromatyny wątroby myszy za pomocą DNA-azy I i DNA-azy II [45, 59], nukleazy mikrokokowej [45, 46] i nukleazy S1 [35] nie wykazała różnic między młodymi i starymi zwierzętami. Chociaż przedstawione dane świadczą o stosunkowo niewielkim wpływie starzenia na strukturę chromatyny w wątrobie gryzoni, to jednak występowanie pewnych zmian może być jednym z czynników odpowiedzialnych za związane z wiekiem obniżenie wątrobowej syntezy RNA. Jak wiadomo, jedynie niewielka część genomu w komórkach Eucaryota jest aktywna w procesie transkrypcji [171] i zależne od wieku zmiany w strukturze chromatyny zawierającej aktywne fragmenty genomu mogą być niemożliwe do wykrycia za pomocą dostępnych metod analitycznych.

Innym czynnikiem, który może powodować spadek syntezy RNA, mogłoby być występujące w trakcie starzenia zmniejszenie zdolności hepatocytów do zachowania integralności ich genomu. Wykazano, że w naświetlanych promieniami ultrafioletowymi izolowanych komórkach wątrobowych szczura naprawa DNA przebiegała najbardziej efektywnie w hepatocytach osobników w wieku 12 miesięcy, znacznie słabiej w komórkach szczurów w wieku 6 lub 19 miesięcy, w hepatocytach zaś 32-miesięcznych zwierząt naprawa uszkodzeń DNA była minimalna [118]. Również inni autorzy wykazali towarzyszące starzeniu obniżenie efektywności naprawy uszkodzeń DNA w hepatocytach [70] i wątrobie szczura [108]. Brak jest danych o wpływie starzenia na replikację DNA w komórkach wątrobowych, chociaż stwierdzono, że polimerazy DNA α i β , wyizolowane w oczyszczonej postaci z wątroby młodych i starych myszy, wykazywały wiele identycznych właściwości fizykochemicznych i kinetycznych [133].

1.2. DEGRADACJA BIAŁEK W WĄTROBIE

1. 2. 1. Katabolizm białek i cykl mocznikowy

Jak już wspomniano, w hepatocytach przebiegają nie tylko procesy syntezy białek, ale również procesy ich intensywnej degradacji. Stan odżywienia organizmu jest głównym czynnikiem, który reguluje wielkość tych przeciwstawnych przemian [101]. Wielkość rozpadu endo- i egzogennych białek w 3-dniowych hodowlach hepatocytów młodych, dojrzałych i starych myszy była jednakowa we wszystkich grupach wiekowych; wraz z wiekiem nie zmieniał się także zakres stymulacji katabolizmu białka przez glukagon oraz stopień jego supresji przez insulinę [21].

Lavie i wsp. [84] porównywali szybkość degradacji białek w wątrobie młodych i starych myszy poprzez określanie piętna zawartego w białkach wyekstrahowanych z poszczególnych frakcji homogenatu wątroby po 4 godz. lub po 1, 3 lub 5 dniu po podaniu dootrzewnowo radioaktywnego dwuwęglanu. Wykazane przez tych badaczy wydłużenie okresów półtrwania tych białek oraz stwierdzone przez nich wydłużenie o 100% okresu półtrwania dekarboksylazy ornitynowej w wątrobie starych myszy w porównaniu z młodymi zwierzętami [65] sugeruje, iż w trakcie starzenia w wątrobie myszy znacznemu obniżeniu ulega aktywność proteolityczna.

W organizmach ssaków hepatocyty są jedynymi komórkami, w których przebiegają wszystkie reakcje cyklu mocznikowego. W swoich badaniach [74] wykazaliśmy, że wielkość syntezy mocznika ze źródeł endo- i egzogennych była zbliżona w izolowanych hepatocytach młodych i starych szczurów. Ponieważ glukagon i adrenalina w jednakowym stopniu stymulowały produkcję mocznika w komórkach wątrobowych młodych i starych zwierząt, uważamy więc, że w wątrobie szczura zdolność hepatocytów do efektywnej syntezy mocznika nie zmienia się w trakcie starzenia.

1.2.2. Udział hepatocytów w zjawiskach endocytozy

Procesy związane z wychwytywaniem przez komórki z otoczenia różnych makrocząsteczek oraz z ich dalszymi przemianami stały się w ostatnim dziesięcioleciu przedmiotem intensywnych badań. Wykazano, że w komórkach gwiaździstych (Kupfera) wątroby ssaków zachodzi lizosomalna degradacja wielu substancji, które w większości wchłaniane są przez nie na drodze endocytozy biernej [66]. Hepatocyty zaś wchłaniają wiele białek za pośrednictwem receptorów powierzchniowych [20]. Do białek, które transportowane są przez cytoplazmę hepatocytów z osocza krwi do żółci, należy także immunoglobulina A, która pełni istotną rolę w neutralizacji antygenów wnikających do organizmu drogą przewodu pokarmowego [86, 151]. W warunkach *in vivo* wykazano, że szybkość wydzielania do żółci znakowanej radioaktywnie IgA była 6-krotnie niższa w grupie szczurów dojrzałych lub starych niż u osobników młodych [131]. Przyczyna tego zjawiska związana jest z upośledzeniem wewnątrzkomórkowej translokacji IgA z bieguna naczyniowego hepatocytów do ich bieguna żółciowego [131]. Znaczenie tej zmiany dla funkcjonowania układu immunologicznego w starzeniu nie jest jeszcze wyjaśnione.

Heil i wsp. [57] oceniali procesy wychwytywania i wewnątrzkomórkowej degradacji przez populacje hepatocytów, komórek Kupfera i komórek śródbłonka znakowanej radioaktywnym piętnem albuminy, którą

upřednio podano dożylnie młodym, dojrzalym i starym szczurom. Wyniki ich badań świadczą o tym, że w trakcie starzenia się dochodzi do zmniejszenia zdolności tych komórek do wychwytywania z krwi przynajmniej niektórych antygenów i do ich rozkładu do substancji aktywnie uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej.

2. WPŁYW STARZENIA NA METABOLIZM LIPIDÓW

Wątroba spełnia centralną funkcję w metabolizmie lipidów stanowiąc główny narząd, w którym przebiega synteza cholesterolu i kwasów żółciowych oraz synteza i utlenianie kwasów tłuszczowych. Ponad to wątroba syntetyzuje lipoproteiny i wydziela je do krwi, a także usuwa je z krwiobiegu. Z tych względów wpływ wieku na przebieg przemiany lipidowej stał się przedmiotem licznych badań. Już na wstępie należy jednak podkreślić znaczenie czynników genetycznych dla występowania istotnych różnic tak w nasileniu zmian w przemianach lipidów, jak i w fazie życia zwierząt, w której się te zależne od wieku zmiany rozpoczynają.

W tab. 6 zestawiono dane dotyczące wpływu starzenia na zawartość i metabolizm lipidów w wątrobie szczura. Wraz z wiekiem dochodzi do zmniejszenia wątrobowej syntezy cholesterolu, przy czym nie zawsze spowodowane jest to spadkiem aktywności kluczowego enzymu w procesie syntezy cholesterolu — reduktazy HMGCoA. Ponieważ w trakcie starzenia szczurów dochodzi do wzrostu stężenia cholesterolu w surowicy krwi [23, 24, 38, 140, 177], można więc przypuszczać, że zjawisko to spowodowane jest zależnymi od wieku modyfikacjami metabolizmu cholesterolu w pozawątrobowych tkankach i narządach. Wydaje się także, że obniżone wydzielanie kwasów żółciowych, mimo braku związanych ze starzeniem zmian w aktywności 7 α -monooksygenazy cholesterolu, jest zjawiskiem wtórnym w stosunku do zmniejszonej, u starych zwierząt, wątrobowej syntezy cholesterolu [83, 142].

Inna sytuacja ma miejsce w trakcie starzenia się ludzi. Einarsson i wsp. wykazali, że z wiekiem dochodzi u ludzi do wzrostu wątrobowej syntezy cholesterolu, do spadku produkcji kwasów żółciowych i do zmniejszenia puli kwasu cholowego [40], przy czym aktywność wątrobowej reduktazy HMGCoA nie ulegała zmianie [2]. Procesy te doprowadzają do zwiększonego wysycenia żółci cholesterolu i, zdaniem autorów, mogą być przyczyną częstszego występowania kamieni cholesterolowych w organizmach starych ludzi [40].

Mimo że zmiany w metabolizmie lipidów są jednym z ważnych tzw. czynników ryzyka rozwoju miażdżycy naczyń, dane dotyczące wpły-

TABELA 6

Wpływ starzenia na zawartość i na metabolizm lipidów w wątrobie szczura

Rodzaj zmiany	Piśmiennictwo
A. Zawartość w wątrobie	
1. Cholesterol:	
wzrost wraz z wiekiem (Wistar)	[148]
brak zmian po osiągnięciu okresu dojrzałości (Sp.-D. ^a , F-344 ^a , Wistar)	[63, 79, 138]
2. Trójglicerydy	
znaczny wzrost (Wistar, F-344)	[63, 177]
3. Fosfolipidy	
brak zmian z wiekiem, ale w każdym okresie życia różnice wewnątrzgatunkowe (Sp.-D., F-344)	[149, 177]
B. Przemiana cholesterolu	
spadek syntezy cholesterolu (Sp.-D., F-344, Wistar)	[39, 79, 142]
znaczna redukcja cholesterologenezy głównie w pierwszym roku życia zwierząt (F-344)	[138, 140]
spadek aktywności reduktazy HMGCoA ^b (F-344)	[140, 177]
wzrost aktywności reduktazy HMGCoA (Sp.-D.)	[138]
brak zmian aktywności reduktazy HMGCoA (Wistar)	[63]
C. Przemiana kwasów żółciowych	
spadek wydzielania kwasów żółciowych do żółci (Wistar, Sp.-D.)	[80, 148, 149]
spadek wątrobowej syntezy kwasów żółciowych (Wistar)	[80]
spadek aktywności 7 α -monooksygenazy cholesterolu (Wistar) lub brak zmian aktywności (Sp.-D., F-344)	[139] [138, 142]
brak zmian w proporcjach molarnych głównych składników żółci (Wistar)	[80]
D. Trójglicerydy	
wzrost syntezy w izolowanych hepatocytach (Sp.-D.) oraz w wątrobie (F-344)	[103] [140, 141]
aktywność karboksylazy acetylokoenzymu A oraz syntetazy kwasów tłuszczowych: brak zmian (Sp.-D.)	[39]
stały wzrost wraz z wiekiem (F-344)	[140]
obniżona synteza ciał ketonowych z kwasów tłuszczowych	[32]
E. Fosfolipidy	
brak zmian aktywności sfingomielinazy i kinazy cholinowej (Sp.-D., F-344)	[144]
brak zmian w wielkości syntezy dwuhydrosfingozyny	[144]

W nawiasach podano rasę zwierząt; oznaczenia skrótów: ^a Sp.-D. — Sprague-Dawley, F-344 — Fischer 344, ^b HMGCoA — hydroksymetyloglutarylokoenzym A; ^c myszy szczepu C57BL.

wu wieku na przemianę tłuszczowców tak w wątrobie, jak i w tkankach pozawątrobowych mają ciągle charakter fragmentaryczny. Wydaje się, że problematyka ta wymaga podjęcia bardziej intensywnych i systematycznych badań, szczególnie w odniesieniu do ludzi.

3. METABOLIZM WĘGLOWODANÓW

Wątroba odgrywa kluczową rolę w przemianach węglowodanów, ponieważ od przebiegających w hepatocytach procesów metabolicznych zależy w fizjologicznych warunkach utrzymywanie prawidłowego stę-

TABELA 7

Wpływ starzenia na aktywność niektórych enzymów związanych z metabolizmem węglowodanów w wątrobie gryzoni

Rasa i płeć zwierząt	Wiek (miesiące)	Nazwa enzymu	Rodzaj zmiany	Piśmiennictwo
Szczur				
Sp.-D. ^a ♂	6, 24	syntetaza a glikogenu	↘ 40%	[72]
Sp.-D. ♂	6, 24	fosforylaza b glikogenu	↘ 28%	[72]
Wistar ♂ i ♀	10, 17	karboksykinaza PEP ^b	↔	[160]
Sp.-D. ♂	3, 24	dehydrogenaza G-6-P ^c	↘ 50%	[165]
F-344 ^a ♂	3, 24	dehydrogenaza G-6-P ^c	↗ 100%	[165]
Sp.-D. ♂	2, 34	fosfataza G-6-P	↘ 31%	[50, 52, 53]
Wistar ♂	3, 24	fosfataza G-6-P	↔	[42]
F-344 ♂	3, 24	fosfataza G-6-P	↘ 35%	[37]
BN/Bi ♀	3, 24	fosfataza G-6-P ^d	↘ 55%	[176]
F-344 ♂	5, 28	aldolaza B	↘ 28%	[4]
Wistar ♂ i ♀	4, 28	aldolaza B	↔	[168]
Wistar ♂	3, 24	dehydrogenaza sorbitolowa	↔	[22]
Wistar ♀	5, 27	dehydrogenaza mleczanowa	↘ 21%	[119]
Sp.-D. ♂	8, 18	aminotransferaza tyrozyny	↘ 53%	[158]
Sp.-D. ♂	10, 24	aminotransferaza tyrozyny	↘ 27%	[172]
Mysz				
C57BL ♀	6, 24	karboksykinaza PEP	↔	[137]
C57BL/6J ♀	5, 28	aldolaza B	↘ 48%	[121]
C57BL/6J ♀	8, 30	aldolaza B	↘ 20%	[5]
C57BL/6 ♂	3, 30	aldolaza B	↔	[116]
B ₆ D ₂ F ₁ ♂	14, 29	aldolaza B	↘ 20%	[6]
C57BL/6J ♂	6, 36	izomeraza glukozofosforanowa	↔	[166]

Aktywności enzymatyczne oceniano w homogenatach wątroby; ^a Sp.-D. — Sprague-Dawley, F-344 — Fischer 344, ^b PEP — fosfoenolopirogronian, ^c G-6-P — glukoza-6-fosforan, ^d aktywność enzymu oceniano w homogenatach izolowanych hepatocytów; ↘ — spadek lub ↗ — wzrost o setek wielkości w grupie młodych zwierząt, ↔ — brak zmian aktywności z wiekiem.

żenia glukozy we krwi — cukru niezbędnego do funkcjonowania wielu tkanek [55]. Wpływ starzenia na te przemiany poznany jest w niewielkim stopniu [33, 41]. Zawartość glikogenu w wątrobie starych szczurów [48, 75, 77, 177] i myszy [137] zbliżona jest do obecnej u dojrzałych lub młodych zwierząt. Wpływ starzenia na aktywność niektórych enzymów uczestniczących w metabolizmie cukrowców przedstawiono w tab. 7.

W badaniach nad wydajnością procesu glukoneogenezy w izolowanych hepatocytach młodych i starych szczurów wykazaliśmy, że w warunkach podstawowych synteza glukozy przebiega z jednakową szybkością w obydwu grupach wiekowych. W warunkach inkubowania hepatocytów w obecności glukagonu lub adrenaliny zaobserwowaliśmy zmniejszoną stymulację glukoneogenezy przez glukagon (ale nie przez adrenalinę) w hepatocytach starych szczurów; defekt ten spowodowany był prawdopodobnie zmianami na poziomie mitochondriów [73]. W dalszych badaniach stwierdziliśmy natomiast, że rozkład glikogenu był silniej stymulowany przez adrenalinę (ale nie przez glukagon) w izolowanych hepatocytach starych szczurów niż w komórkach młodych zwierząt [75]. Wyniki naszych prac wskazują więc na to, że zachodzące w trakcie starzenia zmiany we wpływie hormonów na różne procesy metaboliczne mogą mieć różny charakter, co jest zapewne związane z mechanizmami stymulacji danej drogi metabolicznej.

Wydaje się, że uwidocznione w tab. 7 rozbieżności w ocenie wpływu starzenia na aktywność niektórych enzymów (wzrost lub spadek z wiekiem) spowodowane są różnicami genetycznymi w obrębie gatunku, a niekiedy także różnicami metodycznymi.

4. WPLYW STARZENIA NA STRUKTURĘ BŁONY KOMÓRKOWEJ ORAZ NA RECEPTORY HORMONALNE HEPATOCYTÓW

Zmiany fizykochemicznego stanu błon komórkowych mogą w istotny sposób wpływać na funkcje komórek [130, 136]. Przypuszczenie, iż komórki starych organizmów w niedostateczny sposób zabezpieczone są przed szkodliwym działaniem wolnych rodników stało się podstawą zaproponowanej przez Zsy-Nagy tzw. błonowej hipotezy starzenia [179]. W trakcie doświadczalnej weryfikacji tej koncepcji wykazano, że starzeniu szczura towarzyszy spadek biernej przepuszczalności dla potasu izolowanych z wątroby błon komórkowych, co doprowadza do wzrostu wewnątrzkomórkowej zawartości tego jonu [178]. O usztywnieniu struktury błon komórkowych wątroby starych zwierząt świadczą dane uzyskane za pomocą różnych technik badawczych: obniżenie stałej dyfuzji bia-

łek w błonie komórkowej hepatocytów [180], wzrost tzw. parametru uporządkowania [109, 115], podwyższenie stosunku cholesterol/fosfolipidy oraz białko/fosfolipidy [115]. Można przypuszczać, że towarzyszące starzeniu zmiany właściwości błon komórkowych hepatocytów mogą mieć ważne znaczenia dla stanu receptorów hormonalnych, zlokalizowanych w tych błonach. Badania dotyczące wpływu wieku na jeden z najlepiej scharakteryzowanych systemów receptorowych, receptor beta-adrenergiczny, i na ściśle z nim związany układ cykazy adenylowej, generalnie wskazują na obniżenie efektywności stymulacji beta-adrenergicznej w wielu narządach [49, 58, 125, 129]. Interesującą sytuację zaobserwowano w wątrobie szczura: wraz z wiekiem stale rosła ilość receptorów beta-adrenergicznych, ale równoległy wzrost stymulowanej przez adrenalinę aktywności cykazy adenylowej towarzyszył mu jedynie do późnej dojrzałości — u starych zwierząt aktywność cykazy pozostawała na tym samym poziomie co u szczurów w wieku 18 miesięcy [34]. Przyczyną tego zjawiska jest zmienione w wątrobie starych zwierząt oddziaływanie między cząsteczkami receptora beta-adrenergicznego a regulatorowym białkiem N, uczestniczącym w aktywacji cykazy adenylowej. Zmiana tego oddziaływania spowodowana jest, zdaniem autorów, związanymi ze starzeniem modyfikacjami w strukturze błon komórkowych [34], natomiast stymulowana przez glukagon aktywność wątrobowej cykazy adenylowej nie ulegała zmianom w trakcie starzenia się szczura [34, 69].

W błonach komórek wątrobowych zlokalizowane są m.in. receptory hormonów polipeptydowych. W wątrobie szczura ilość receptorów glukagonu [34, 56] i insuliny [56] nie ulega wraz z wiekiem zmianom. Wpływ zaś starzenia na cytoplazmatyczne receptory hormonów sterydowych przejawia się w zróżnicowany sposób: stwierdzono wzrost ilości receptorów deksametazonu w wątrobie szczura [68, 124] i myszy [137] oraz znaczny spadek ilości cytoplazmatycznego białka wiążącego androgen w wątrobie samców szczura [128]. Wątrobowe receptory glukokortykoidów młodych i starych szczurów charakteryzują się podobnym powinowactwem oraz zbliżonymi właściwościami fizykochemicznymi [68, 76, 124]. Wraz z wiekiem natomiast ulega stopniowemu zmniejszeniu ilość kompleksów hormonsterydowych-receptor cytoplazmatyczny, które ulegają wiązaniu z izolowanymi jądrami komórek wątrobowych; zjawisko to mogło wskazywać na obniżoną aktywację genomu przez hormony sterydowe w wątrobie starych szczurów [76]. Ponieważ hormony regulują przebieg wielu podstawowych procesów fizjologicznych, wyjaśnienie mechanizmów ich działania w organizmach starych ludzi i zwierząt wymaga więc dalszych badań zarówno na poziomie molekularnym i subkomórkowym, jak i na poziomie narządów i całego ustroju.

5. WPLYW WIEKU NA FUNKCJE MITOCHONDRIÓW WĄTROBY

Wpływ starzenia na wytwarzanie energii w komórkach wątrobowych określano początkowo przez pomiary zużycia tlenu przez skrawki wątroby umieszczone w aparacie Warburga. Te wczesne prace przyniosły sprzeczne wyniki; stwierdzono bowiem zarówno brak zmian [7], jak i spadek aktywności oddechowej skrawków wątroby starych szczurów w stosunku do młodych zwierząt [123]. Począwszy od pionierskiej w dziedzinie badań gerontologicznych pracy Weinbacha i Garbusa [169], wielu innych autorów badało wpływ wieku na zużycie tlenu przez izolowane mitochondria różnych narządów [54]. W badaniach tych określano szybkość oddychania w stanie 3 (tj. w sytuacji, kiedy substraty, ADP i tlen obecne są w środowisku inkubacyjnym w wystarczającej ilości) oraz w stanie 4 (wówczas stężenie ADP jest czynnikiem, który ogranicza szybkość oddychania). Ponadto ze stosunku zużycia tlenu w stanie 3 do wielkości zużycia tlenu w stanie 4 wyznaczano tzw. współczynnik kontroli oddechowej.

Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że zużycie tlenu w stanie

TABELA 8

Wpływ starzenia na utlenianie substratów w stanie 3 w izolowanych mitochondriach wątroby gryzoni

Rasa i płeć zwierząt	Wiek (miesiące)	Rodzaj substratu						Piśmiennictwo
		glutaminian	bursztynian	palmitoylokarbonylna	hydroksyma lan	pirogonian + jabłczan	glutaminian + jabłczan	
Szczur								
Sp.-D. n.p.	3, 24				↘ 39%			[169]
Wistar ♂	13, 26				↔			[47]
Wistar ♂	5, 25		↔	↘ 19%				[143]
Wistar n.p.						↔	↘ 31%	[54]
Chomik n.p.	♂ 13, 20		↔		↘ 7%			[64]
Mysz								
C57BL/6J ♂	10, 25	↔	↔		↘ 18%			[170]
C57BL ♂	6, 30		↔					[175]

Sp.-D. — szczury rasy Sprague-Dawley; n.p. — rasy lub płci zwierząt nie podano; ↘ oznacza spadek, ↔ brak zmian w zużyciu tlenu wraz z wiekiem.

4 przez izolowane mitochondria wątroby starych szczurów [47, 169] i myszy [170] jest takie same jak w mitochondriach dojrzałych i młodych zwierząt. Występowanie zależnych od wieku różnic w szybkości oddychania w stanie 3 zależało — jak obrazują to dane przedstawione w tab. 8 — od rodzaju substratu. Wielkość współczynnika oddechowego dla większości substratów utlenianych przez izolowane mitochondria wątroby gryzoni nie ulega w trakcie starzenia zmianom, poza takimi sytuacjami, gdzie dla pewnych substratów stwierdzono spadek zużycia tlenu w stanie 3. Za pomocą elektrody tlenowej wykazano, że zawiesiny hepatocytów izolowanych z wątroby młodych, dojrzałych i starych szczurów oddychają z podobną intensywnością [19, 150], co wskazuje na zachowanie wraz z wiekiem czynnościowej integralności mitochondriów w komórkach mięsnych wątroby.

Tabela 9 przedstawia dane dotyczące wpływu starzenia na aktywność niektórych enzymów mitochondrialnych. Mimo fragmentarycznego zakresu przeprowadzonych dotąd badań również i tutaj uwidaczniają się

TABELA 9

Wpływ starzenia na aktywność niektórych enzymów mitochondrialnych w wątrobie gryzoni

Rasa ^a i płeć zwierząt		Wiek (miesiące)	rodzaj preparatu	oksydaza cytochromowa	dehydrogenaza bursztynianowa	dehydrogenaza glutaminianowa	dehydrogenaza izocytrynianowa NAD-zależna	dehydrogenaza jabłczanowa	Piśmienictwo
Szczur									
Wistar	♂ i ♀	6, 21	M		↗ 140%		↔		[160]
Wistar	♂	8, 20	M				↙ 39%		[134]
Wistar	♂	12, 24	M	↔					[47]
Wistar	♂	12, 24	M					↙ 33%	[67]
Sp.-D.	♂	6, 24	M		↗ 36%				[51]
CFN	♀	3, 24	H	↔		↗ 94%			[71]
F-344	♀	8, 29	M	↔					[162]
			H	↙ 40%					[162]
Mysz									
C57	♂ i ♀	6, 30	H	↙ 70%					[174]
C57BL	♂	6, 30	M	↔					[175]
			H	↔					[175]
C57BL/6J	♀	10, 24	M	↙ 19%					[170]
			H	↙ 20%					[170]

Aktywności enzymatyczne oceniano w izolowanych mitochondriach wątroby — M, albo w homogenatach wątroby — H; ^a Sp.-D. — Sprague-Dawley, F-344 — Fischer 344; ↗ oznacza wzrost, ↙ — spadek, ↔ — brak zmian aktywności z wiekiem.

zarówno wewnątrz-, jak i międzygatunkowe różnice w kierunku związanych z wiekiem zmian aktywności enzymatycznych (oksydaza cytochromowa, dehydrogenaza izocytrynianowa NAD^+ -zależna). Spadek w trakcie starzenia aktywności oksydazy cytochromowej obserwowany wówczas, gdy aktywność oceniano w homogenatach wątroby, oraz jednakowy poziom aktywności w izolowanych mitochondriach młodych, dojrzałych i starych szczurów są, zdaniem autorów, wyrazem obniżenia wraz z wiekiem ilości mitochondriów zawartych w jednostce masy wątroby [162].

Badania składu lipidów w izolowanych mitochondriach wątroby szczura wykazały, że w trakcie starzenia dochodzi w nich do wyraźnego wzrostu zawartości cholesterolu [51, 87, 163] oraz do spadku całkowitej zawartości fosfolipidów [51]. Zależne od wieku zmiany w poszczególnych klasach fosfolipidów wyrażone były przez znaczne obniżenie zawartości kardiolipiny [51, 163] oraz fosfatydyloetanolaminy [51], w porównaniu zaś z młodymi zwierzętami udział fosfatydylocholiney w mitochondriach wątroby starych szczurów rasy Sprague-Dawley był wyższy [51], a szczurów rasy Fischer 344 — niższy [163]. Wzrost stosunku cholesterol/fosfolipidy w mitochondriach starych szczurów może wskazywać na występujący z wiekiem spadek płynności błon mitochondrialnych; zmianę taką istotnie wykazano za pomocą techniki polaryzacji fluorescencji [87, 163].

Wydaje się, iż na podstawie przytoczonych danych można stwierdzić, że procesy starzenia w stosunkowo niewielkim stopniu upośledzają funkcje mitochondriów w wątrobie gryzoni.

6. WPLYW STARZENIA NA INNE PROCESY METABOLICZNE

6.1. METABOLIZM HEMU

Tempo biosyntezy hemu jest w wątrobie regulowane przez aktywność enzymu katalizującego pierwszą reakcję tego szlaku metabolicznego — syntetazy kwasu delta-aminolewulinowego (ALAS). Kilka grup badaczy wykazało, że w trakcie starzenia w wątrobie szczura znacznemu obniżeniu ulega zarówno spoczynkowa [1, 12, 114, 132], jak i indukowana [114, 132] aktywność tego enzymu. Oceniana równocześnie aktywność oksygenazy hemowej, kluczowego enzymu w procesie degradacji hemu, była wyższa w wątrobie starych niż u młodych osobników [1, 12]. Jednocześnie zawartość hemu w mikrosomalnej frakcji homogenatu wątroby była obniżona w grupie starych samic szczurów rasy Fischer 344 [12] lub podobna w wątrobie starych i młodych szczurów

rasy Sprague-Dawley [1]. Przytoczone dane wskazują, że w trakcie starzenia w wątrobie szczura dochodzi do istotnych zmian w regulacji wielkości wewnątrzkomórkowej puli hemu, co może być przyczyną obniżonej zawartości cytochromu P-450 w wątrobie starych zwierząt [12] oraz zredukowanej aktywności enzymów układu mikrosomalnej mono-oksigenazy [1, 12].

6.2. SYNTEZA PROSTAGLANDYN

Wątroba jest jednym z wielu narządów, w których zachodzi synteza biologicznie czynnych pochodnych kwasu arachidonowego. W trakcie rozwoju i starzenia się szczurów rasy Sprague-Dawley wielkość syntezy prostaglandyny PGE₂ i PGF_{2α} w mikrosomach wątroby pozostawała na stałym poziomie między 1 a 15 miesiącem życia, a u zwierząt w wieku 24 miesięcy była niższa o 40% [99, 100], natomiast w wątrobie szczurów rasy Wistar synteza ta rosła między 3 a 18 miesiącem życia, a potem już nie ulegała zmianom [113]. Synteza PGD₂ zachodziła prawie wyłącznie w niemięszkowych komórkach wątroby, a wielkość syntezy tego związku nie zmieniała się wraz z wiekiem [113]. Fizjologiczne znaczenie zachodzących z wiekiem zmian w wielkości produkcji prostaglandyn w wątrobie szczura nie jest jasne, ponieważ w niedostatecznym stopniu poznano ich rolę w czynnościach komórek wątrobowych.

7. PODSUMOWANIE

W hepatocytach przebiega olbrzymia większość procesów metabolicznych właściwych wątrobie ssaków. Synteza białka w izolowanych komórkach wątrobowych szczura jest o ok. 50% niższa u zwierząt starych niż u młodych lub dojrzałych. Mikrosomy izolowane z wątroby starych szczurów lub myszy syntetyzują średnio o 40 - 60% białka mniej niż mikrosomy zwierząt młodych lub dojrzałych. Mimo iż procesom starzenia towarzyszą liczne zmiany w wewnątrzkomórkowym aparacie biosyntezy białka, wydaje się, że głównym czynnikiem, który upośledza wydajność procesu translacji w hepatocytach starych gryzoni, jest znaczne obniżenie szybkości wydłużania łańcucha polipeptydowego, spowodowane spadkiem aktywności pierwszego czynnika elongacji EF-1. W trakcie starzenia szczurów rasy Wistar dochodzi do wzrostu syntezy albuminy w izolowanych hepatocytach z powodu zwiększenia ilości specyficznego dla albuminy mRNA, natomiast wątrobowa synteza transferyny kilkakrotnie maleje w trakcie rozwoju i starzenia się szczurów rasy Sprague-Dawley. Obniżenie wielkości syntezy białka w wątrobie

starych zwierząt może być częściowo spowodowane przez związany ze starzeniem znaczny spadek aktywności transkrypcyjnej hepatocytów. Wraz z wiekiem redukcji ulega zdolność hepatocytów szczura do efektywnej naprawy uszkodzeń DNA.

W trakcie starzenia się szczurów w komórkach gwiaździstych (Kupfera), w komórkach śródbłonna zatok oraz w hepatocytach dochodzi do spadku zdolności wychwytywania niektórych antygenów białkowych z krwiobiegu i do metabolizowania ich do substancji czynnych biologicznie. Wielkość zaś syntezy mocznika jest jednakowa w izolowanych hepatocytach młodych i starych szczurów tak w warunkach podstawowych, jak i w trakcie stymulacji hormonalnej. Aktywność proteolityczna w stosunku do endo- i egzogennych białek w wątrobie myszy ulega wraz z wiekiem znacznemu obniżeniu.

W zakresie przemiany lipidowej zaobserwowano zmniejszenie syntezy cholesterolu w wątrobie starych szczurów i jej nasilenie w wątrobie starych ludzi, przy czym wraz z wiekiem nie zawsze występuje obniżenie aktywności reduktazy HMGCoA. Starzeniu ludzi i szczurów towarzyszy zjawisko zmniejszonej produkcji kwasów żółciowych. Wraz z wiekiem w wątrobie szczura znacznie rośnie zawartość trójglicerydów, natomiast zawartość i skład fosfolipidów nie ulega zmianom. Wpływ wieku na różne aspekty metabolizmu lipidów w wątrobie gryzoni w dużej mierze uzależniony jest od czynników genetycznych.

Zawartość glikogenu w wątrobie młodych i starych gryzoni jest zbliżona. Glukagon słabiej stymuluje glukoneogenezę w hepatocytach starych szczurów w porównaniu z młodymi zwierzętami, natomiast adrenalina silniej stymuluje glikogenezę w hepatocytach starych szczurów. W trakcie starzenia dochodzi do modyfikacji w strukturze błon komórkowych wątroby. W wątrobie starych szczurów znacznie rośnie ilość związanych z błoną komórkową receptorów beta-adrenergicznych, przy czym aktywność cykazy adenylowej stymulowanej przez adrenalinę nie ulega proporcjonalnemu podwyższeniu.

Wydaje się, że w miarę starzenia się gryzoni funkcja izolowanych mitochondriów wątroby nie ulega poważniejszym zmianom, mimo że zaobserwowano różnice w zawartości i w składzie fosfolipidów oraz w zawartości cholesterolu. Wraz z wiekiem w wątrobie szczura maleje podstawowa i indukowana aktywność syntetazy kwasu delta-aminolewulinowego oraz rośnie aktywność oksygenazy hemowej — głównych enzymów biosyntezy i degradacji hemu. W wątrobie szczura wraz z wiekiem zmienia się wielkość syntezy prostaglandyny PGE₂ i PGF_{2α}.

Na podstawie przedstawionych wyników badań można uważać, że związane ze starzeniem zmiany procesów metabolicznych mogą w poważnym stopniu wpływać na funkcjonowanie wątroby ssaków, szcze-

gólnie w takich stanach i sytuacjach, w których dochodzi do stymulacji czynności tego narządu.

Zagadnienia związane z wpływem wieku na funkcje biotransformacyjne hepatocytów będą przedmiotem odrębnej pracy.

Za wszechstronną pomoc, cenne rady i wskazówki, a przede wszystkim za pomysł napisania obu artykułów gorąco dziękuję Panu doc. drowi hab. med. Andrzejowi Myśliwskiemu.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABRAHAM N. A., LEVERE R. D., FREEDMAN M. L., Effect of age on rat liver heme and drug metabolism, *Exp. Gerontol.*, **20**: 277 - 284, 1985.
- [2] AHLBERG J., ANGELIN B., EINARSSON K., Hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity and biliary lipid composition in man: relation to cholesterol gallstone disease and effects of cholic and chenodeoxycholic acid treatment, *J. Lipid Res.*, **22**: 410 - 422, 1981.
- [3] BAILEY, P. J., WEBSTER, G. C., Lowered rates of protein synthesis by mitochondria isolated from organisms of increasing age, *Mech. Age. Dev.*, **24**: 233 - 241, 1984.
- [4] BARROWS, C. H., KOKKONEN, G. C., The effect of age on aldolase in the livers of rats, *Age*, **3**: 53 - 58, 1980.
- [5] — Inconstistences in the presence of age-associated altered adolase in the livers of mice, *Age*, **4**: 123 - 125, 1981.
- [6] — The effect of age and diet on biochemical characteristics of the tissues of mice, *Age*, **8**: 101 - 112, 1985.
- [7] BARROWS C. H., YIENGST M. J., SHOCK N. W., Senescence and the metabolism of various tissues of rats, *J. Geront.*, **13**: 351 - 355, 1958.
- [8] BEAUCHENNE R. E., ROEDER L. M., BARROWS C. H., Jr., The effect of age and ethionine feeding on the RNA and protein synthesis of rats, *J. Geront.*, **22**: 318 - 324, 1967.
- [9] BENSON R. W., HARKER C. W., RNA polymerase activities in liver and brain tissue of aging mice, *J. Gerontol.*, **33**: 323 - 328, 1978.
- [10] BERDYSHEV G., ZHELABOVSKAYA S., Composition, template properties and thermostability of chromatin from rats of various age at deproteinization by NaCl solutions, *Exp. Gerontol.*, **7**: 321 - 330, 1972.
- [11] BIRCHENALL-SPARKS M. C., ROBERTS M. S., RUTHERFORD M. S., RICHARDSON A., The effect of aging on the structure and function of liver messenger RNA, *Mech. Age. Dev.*, **32**: 99 - 111, 1985.
- [12] BITAR M. S., SHAPIRO B. H., Aberration of heme and hemoprotein in aged female rats, *Mech. Age. Dev.*, **38**: 189 - 197, 1987.
- [13] BLAŻEJOWSKI C. A., WEBSTER G. C., Decreased rates of protein synthesis by cell-free preparations from different organs of aging mice, *Mech. Age. Dev.*, **21**: 345 - 356, 1983.
- [14] — Effect of age on peptide chain initiation and elongation in preparations from brain, liver, kidney and skeletal muscle of the C57BL/6J mouse, *Mech. Age. Dev.*, **25**: 323 - 333, 1984.

- [15] BLOUIN A., BOLENDER R. P., WEIBEL E. R., Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma, *J. Cell Biol.*, **72**: 441 - 455, 1972.
- [16] BOLLA R., Effect of hypophysectomy on liver nuclear RNA synthesis in aging rats, *J.*, **184**: 669 - 674, 1979.
- [17] BOLLA R., GREENBLATT C., Age related changes in rat liver total protein and transferrin synthesis, *Age.*, **5**: 72 - 79, 1982.
- [18] BRITTON V. J., SHERMAN F. H., FREDERICH G. C., FLORINI J. R., Effect of age on RNA synthesis by nuclei and soluble RNA polymerases from liver and muscle of C57BL/6J mice, *J. Gerontol.*, **27**: 188 - 192, 1972.
- [19] BROUWER A., Van BEZOOIJEN C. F. A., KNOOK D. L., Respiratory activities of hepatocytes isolated from rats of various ages, *Mech. Age. Dev.*, **6**: 265 - 268, 1977.
- [20] BROWN M. S., ANDERSON R. G. W., GOLDSTEIN J. L., Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins, *Cell*, **32**: 663 - 667, 1983.
- [21] BURROWS R. B., DAVIDSON P. F., Protein catabolism in cultures of hepatocytes derived from mice of various ages, *Mech. Age. Dev.*, **19**: 85 - 94, 1982.
- [22] CAO DANH H., BENEDETTI M. S., DOSTERT, P., Age-related changes in sorbitol dehydrogenase activity of rat brain, liver, kidney and eye, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**: 910 - 912, 1985.
- [23] CARLILE S. I., LACKO A. G., Strain differences in the age related changes of rat lipoprotein metabolism, *Comp. Biochem. Physiol.*, **70**: 753 - 759, 1981.
- [24] CARLSON J. A., FROBERG S. O., NYE E. R., Effect of age on blood and tissue levels of lipids in the male rat, *Gerontologia*, **14**: 65 - 79, 1968.
- [25] CASTLE T., KATZ A., RICHARDSON A., Comparison of RNA synthesis by liver nuclei from rats of various ages, *Mech. Age. Dev.*, **8**: 383 - 395, 1978.
- [26] CHATTERJEE B., NATH T. S., ROY A. K., Differential regulation of the messenger RNA for three major senescence marker proteins in male rat liver, *J. Biol. Chem.*, **256**: 5939 - 5941, 1981.
- [27] CHEN J. C., OVE P., LANSING A., In vitro synthesis of microsomal protein and albumin in young and old rats, *Biochim. Biophys. Acta*, **312**: 598 - 607, 1973.
- [28] CLAES-RECKINGER N., VANDENHAUTE J., Van BEZOOIJEN C. F. A., DELCOUR J., Functional properties of rat liver protein synthesizing machinery in relation to aging, *Exp. Gerontol.*, **17**: 281 - 286, 1982.
- [29] COLEMAN G. L., BARTHOLD S. W., OSBALDISTON G. W., FOSTER S. J., JONES A. M., Pathological changes during aging in barrier-reared Fischer 344 male rats, *J. Gerontol.*, **32**: 258 - 286, 1977.
- [30] CONIGLIO J. J., LIU D. S. H., RICHARDSON A., A comparison of protein synthesis by liver parenchymal cells isolated from Fischer 344 rats of various ages, *Mech. Age. Dev.*, **11**: 77 - 90, 1979.
- [31] COOK J. R., BUETOW D. E., Decreased protein synthesis by polysomes, tRNA and aminoacyl-tRNA synthetases isolated from senescent rat liver, *Mech. Age. Dev.*, **17**: 41 - 52, 1981.
- [32] DANIS M., HARRISON D. E., THURMAN R. G., Alterations in oxidative and drug metabolism in aging: a study in an inbred strain of mice, *Fed Proc.*, **44**: 750, 1985.

- [33] DAVIDSON M. B., The effect of aging on carbohydrate metabolism: a review of the English literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly, *Metabolism*, **28**: 688 - 705, 1979.
- [34] DAX E. M., PORTILLA J. S., PINEYRO A., GREGERMAN R. I., β -adrenergic receptors, glucagon receptors and their relationship to adenylate cyclase in rat liver during aging, *Endocrinology*, **120**: 1534 - 1541, 1987.
- [35] DEAN R. G., CUTLER R. G., Absence of significant age-dependent increase of single-stranded DNA extracted from mouse liver nuclei, *Exp. Gerontol.*, **13**: 287 - 292, 1978.
- [36] DEVI A., LINDAY P., RAINA R. L., WARKAR N. K., Effect of age on some aspects of the synthesis of ribonucleic acid, *Nature*, **212**: 474 - 475, 1966.
- [37] DOBROSIELSKA-VERGONA K., WINDELL C. C., Age-related differences in the response of hepatic microsomal glucose-6-phosphatase to triiodothyronine and triamcinolone in the rat, *Endocrinology*, **111**: 953 - 958, 1982.
- [38] DUPONT J., MATHIAS M. M., CABACUNGAN N. B., Dietary lipids, fatty acid synthesis and cholesterol metabolism in aging rats, *Lipids*, **7**: 576 - 589, 1972.
- [39] DUPONT J., SPINDLER A. A., MATHIAS M. M., Dietary fat saturation and cholesterol and fatty acid synthesis in aging rats, *Age*, **1**: 93 - 99, 1978.
- [40] EINARSSON K. K., NILSELL K., LEIJD B., ANGELIN B., Effect of age on secretion of cholesterol and synthesis of bile acids by the liver, *New Eng. J. Med.*, **313**: 277 - 282, 1985.
- [41] ELAHI D., Glucose and insulin metabolism, [w] *Rev. Biol. Res. Aging*, **1**: 343 - 356, 1983.
- [42] FROLKIS V. V., BEZRUKOVA V. V., MURAKIAN K. K., Hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation of induction of some enzymes of carbohydrate and amino acid metabolism in aging, *Exp. Gerontol.*, **11**: 65 - 76, 1979.
- [43] GABIUS H. J., ENGELHARDT L., DEERBERG F., CRAMER F., Age-related changes in different steps of protein synthesis of liver and kidney of rats, *FEBS Lett.*, **160**: 115 - 118, 1983.
- [44] GABIUS H. J., GOLDBACK S., GRAMPNER G., REHM S., CRAMER F., Organ pattern of age-related changes in the aminoacyl-tRNA synthetases activities of the mouse, *Mech. Age. Dev.*, **20**: 305 - 313, 1982.
- [45] GAUBATZ J., ELLIS M., CHALKEY R., The structural organization of mouse chromatin as a function of age, *Fed. Proc.*, **38**: 1973 - 1978, 1979.
- [46] — Nuclease digestion studies of mouse chromatin as a function of age, *J. Gerontol.*, **34**: 672 - 679, 1979.
- [47] GOLD P. H., GEE M. V., STREHLER B. L., Effect of age on oxidative phosphorylation in the rat, *J. Gerontol.*, **23**: 509 - 512, 1968.
- [48] GOMMERS A., GENNE H., Effect of aging on insulin and insulin-glucose sensitivity tests in the rat, *Acta Diabetol. Lat.*, **12**: 303 - 308, 1975.
- [49] GERGERMAN R. I., Mechanisms of age-related alterations of hormone secretion and action. An overview of 30 years of progress, *Exp. Gerontol.*, **21**: 345 - 365, 1986.
- [50] GRINNA L. S., Age-related alterations in membrane lipid and protein interactions. Arrhenius studies of microsomal glucose-6-phosphatase, *Gerontology*, **23**: 342 - 349, 1977.
- [51] — Age-related changes in the lipids of the microsomal and mitochondrial membranes of rat liver and kidney, *Mech. Age. Dev.*, **6**: 197 - 205, 1977.

- [52] GRINNA L. S., BARBER A., Age-related changes in membrane lipid content and enzyme activities, *Biochim. Biophys. Acta*, **288**: 347 - 353, 1972.
- [53] — Kinetic analysis of the age-related differences in the glucose-6-phosphatase activity, *Exp. Gerontol.*, **10**: 319 - 323, 1975.
- [54] HANSFORD R. G., Bioenergetics in aging, *Biochem. Biophys. Acta*, **726**: 41 - 80, 1983.
- [55] HARPER H. A., RODWELL V. W., MAYES P. A., *Zarys chemii fizjologicznej*, PZWL, Warszawa 1983.
- [56] HAYASHI K., Insulin insensitivity and hyposuppressibility of glucagon by hyperglycemia in aged Wistar rats, *Gerontology*, **28**: 10 - 18, 1982.
- [57] HEIL M. F., DINGHMAN A. D., GERVEY J. S., Antigen handling in aging, III. Age-related changes in antigen handling by liver parenchymal and nonparenchymal cells, *Mech. Age. Dev.*, **26**: 327 - 340, 1984.
- [58] HEINSIMER J. A., LEFKOWITZ R. J., The impact of aging on adrenergic receptor function: clinical and biochemical aspects *J. Am. Geriat. Soc.*, **33**: 184 - 188, 1985.
- [59] HILL B. T., WHEELAN R. D., Studies on the degradation of aging chromatin DNA by nuclear and cytoplasmic factors and deoxyribonucleases, *Gerontology*, **24**: 326 - 336, 1978.
- [60] HORBACH G. J. M. G., YAP S.-H., Van BEZOOIJEN C. F. A., Age-related changes in albumin elimination in female WAG/Rij rats, *Biochem. J.*, **216**: 309 - 315, 1983.
- [61] HORBACH G. J. M. G., PRINCEN H. M., Van der KROEF H. M., Van BEZOOIJEN C. F. A., YAP S.-H., Changes in the sequence content of albumin mRNA and its translational activity in the rat liver with age, *Biochim. Biophys. Acta*, **783**: 60 - 66, 1984.
- [62] HORBACH G. J. M. G., Van LEEUWEN R. E. W., YAP S.-H., Van BEZOOIJEN C. F. A., Changes in fluid-phase endocytosis in the rat with age and their relation to total albumin elimination, *Mech. Age. Dev.*, **33**: 305 - 312, 1986.
- [63] HOTTA S. S., The influence of age on the increased activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in regenerating livers of partially hepatectomized rats, *Exp. Gerontol.*, **16**: 495 - 500, 1981.
- [64] INAMDAR K. R., PERSON R., KOHNEN P., DUNCAN H., MACKLER B., Effect of age on oxydative phosphorylation in tissues of hamster, *J. Gerontol.*, **29**: 638 - 642, 1974.
- [65] JACOBUS S., GERSHON D., Age-related changes in inducible mouse liver enzymes: ornithine decarboxylase and tyrosine aminotransferase, *Mech. Age. Dev.*, **12**: 311 - 322, 1980.
- [66] JONES A. L., SUMMERFIELD J. A., Functional aspects of hepatic sinusoidal cells, *Seminars Liver Dis.*, **5**: 157 - 174, 1985.
- [67] KALIMAN P. A., MISZCZENKO W. P., NIECZEPURENKO L. P., Wozrastnyje osobiennosti funkcionirovania citrat-piruwatnoj sistiemy w pieczeni krysz, *Ukr. Bioch. Żur.*, **52**: 285 - 288, 1980.
- [68] KALIMI M., GUPTA S., HUBBARD J., GRENE K., Glucocorticoid receptors in adult and senescent rat liver, *Endocrinology*, **112**: 341 - 347, 1983.
- [69] KALISH M. I., KATZ M. S., PINEYRA M. A., GREGERMAN R. I., Epinephrine- and glucagon-sensitive adenylyl cyclases in rat liver during aging, *Biochim. Biophys. Acta*, **483**: 452 - 456, 1977.
- [70] KENNAH H. E., COETZEE M. L., OVE P., A comparision of DNA repair

- synthesis in primary hepatocyte culture from young and old rats, *Mech. Age. Dev.*, **29**: 283 - 298, 1985.
- [71] KERR J. S., FRANKEL H. M., Substrate, enzyme and coenzyme levels in male and female rats from 3 to 24 months of age, *Int. J. Biochem.*, **7**: 455 - 460, 1976.
- [72] KHANDENWAL R. L., ENNO T. L., NARAYAN H., Effects of age on glycogen synthase and phosphorylase activities in rat liver *Mech. Age. Dev.*, **28**: 13 - 22, 1984.
- [73] KMIEC Z., MYŚLIWSKI A., Age-dependent changes of hormone-stimulated gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes, *Exp. Gerontol.*, **18**: 173 - 184, 1983.
- [74] — Urea synthesis in hepatocytes isolated from young and old rats, *Exp. Gerontol.*, **20**: 271 - 277, 1985.
- [75] KMIEC Z., MYŚLIWSKI A., SUPPAN K., ANDRZEJEWSKA A., The effect of aging on hormonally-stimulated glycogenolysis in isolated rat hepatocytes, 2nd Int. Congress on Biomed. Gerontol., Hamburg 1987.
- [76] KONOPYLA E. F., LIKSHA G. L., SAVATEEV S. K., NAUMOV A. D., Steroid receptor complexes and their interaction with the rats liver nuclei during ontogenesis, *Mech. Age. Dev.*, **35**: 95 - 107, 1986.
- [77] KOSENKO E. A., KAMIŃSKI J. G., Energetyczny obмін w печені молодих і старих крис під впливом голодування, *Ukr. Bioch. Żur.*, **55**: 425 - 430, 1983.
- [78] KRAMER W., ZORICH N., LIU D. S., RICHARDSON A., Effect of age on RNA synthesis by rat hepatocytes, *Exp. Gerontol.*, **14**: 27 - 36, 1979.
- [79] KRITCHEVSKY D., Age-related changes in lipid metabolism, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **165**: 193 - 199, 1980.
- [80] KROKER R., ANWER M. S., HEGNER D., The age dependence of bile acid metabolism in rats, *Akt. Gerontol.*, **7**: 539 - 545, 1977.
- [81] KURTZ D. I., The effect of aging on in vitro fidelity of translation in mouse liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **407**: 479 - 484, 1975.
- [82] — A decrease in the number of active mouse liver ribosomes during aging, *Exp. Gerontol.*, **13**: 397 - 402, 1979.
- [83] LACKO A. G., CARLILE S., KUDCHODHAR B. J., Evaluation of lipid and lipoprotein metabolism in rats as a model for studying age-related physiological changes, *J. Gerontol.*, **39**: 513 - 520, 1984.
- [84] LAVIE L., REZNICK A. Z., GERSHON D., Decreased protein and puromycinyl-peptide degradation in livers of senescent mice, *Biochem. J.*, **202**: 47 - 51, 1982.
- [85] LAYMAN D. K., RICCA A. G., RICHARDSON A., The effect of age on protein synthesis and ribosome aggregation to messenger RNA in rat liver, *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**: 246 - 254, 1975.
- [86] LEMAITRE-COEHLO I., JACKSON G. D., VAERMEN J. P., Rat bile as a convenient source of secretory IgA and secretory component, *Eur. J. Immunol.*, **7**: 588 - 590, 1977.
- [87] LEMESHKO V. V., BABENKO N. A., POPOVA L. Y., BELOSTOTSKAYA L. I., KOZLOVA E. V., Strukturnoje sostojanie miembran mitochondrij i mikrosom печені крис при стареніі і под дією тироксина, *Ukr. Bioch. Żur.*, **58**: 63 - 68, 1986.
- [88] LINDELL T. J., DUFFY J. J., BYRNES B., Transcription in aging: the response of rat liver nuclear polymerases to cycloheximid in vivo, *Mech. Age. Dev.*, **19**: 63 - 71, 1982.

- [89] MAINWARING V. I. P., Changes in the ribonucleic acid metabolism of aging mouse tissues with particular reference to the prostate gland, *Biochem. J.*, **110**: 79 - 86, 1968.
- [90] — The effect of age on protein synthesis in mouse liver, *Biochem. J.*, **113**: 869 - 878, 1969.
- [91] MAKRIDES S. C., GOLDWAITHE J., The content and size distribution of membrane-bound and free polyribosomes in mouse liver during aging, *Mech. Age. Dev.*, **27**: 111 - 134, 1984.
- [92] MAYS L. L., LAWRENCE A. E., HO R. W., ACKLEY S., Age-related changes in functions of transfer ribonucleic acid of rat liver, *Fed. Proc.*, **38**: 1984 - 1988, 1979.
- [93] MEDVEDEV Z. A., MEDVEDEVA M. N., HUSCHTSCHA L. I., Age changes of the pattern of histone F1 subfractions in rat liver and spleen chromatin, *Gerontology*, **23**: 334 - 341, 1977.
- [94] MEDVEDEV Z. A., MEDVEDEVA M. N., ROBSON L., Tissue specificity and age changes of the pattern of the H1 group of histones in chromatin from mouse tissues, *Gerontology*, **24**: 286 - 292, 1978.
- [95] MILLER J. K., Age-associated changes in initiation of ribonucleic acid synthesis in isolated rat liver nuclei, *Biochem. J.*, **188**: 55 - 60, 1980.
- [96] MOLDAVE H., HARRIS J., SABO W., SADNICK I., Protein synthesis and aging: studies with cell-free mammalian systems, *Fed. Proc.*, **38**: 1979 - 1983, 1979.
- [97] MOORE R. E., GOLDSWORTH T. L., PITOT H. C., Turnover of 3-polyadenylate-containing RNA in livers from aged, partially hepatectomized, neonatal and Morris 513c hepatoma-bearing rats, *Cancer Res.*, **40**: 1449 - 1959, 1980.
- [98] MORI N., MIZUNO D., GOTO S., Conservation of ribosomal fidelity during aging, *Mech. Age. Dev.*, **10**: 379 - 398, 1979.
- [99] MORITA I., MUROTA S., Prostaglandin-synthesizing systems in rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **90**: 441 - 449, 1978.
- [100] — Effect of aging on the prostaglandin-synthesizing system in rat liver, *Prostaglandin and Medicine*, **4**: 45 - 52, 1980.
- [101] MORTIMORE G. E., PÖSÖ A. R., Lysosomal pathways in hepatic protein degradation: regulatory role of amino acids, *Fed. Proc.*, **43**: 1289 - 1294, 1984.
- [102] MOUDGIL P. G., COOK J. R., BUETOW D. E., The proportion of ribosomes active in protein synthesis and the content of polyribosomal poly (A)-containing RNA in senescent rat livers, *Gerontology*, **25**: 322 - 326, 1979.
- [103] MURTHY V. K., OREDIPE O. A., STILES M. R., SHIPP J. C., Increased fatty acid uptake, a factor in increased hepatic triacylglycerol synthesis in aging rats, *Mech. Age. Dev.*, **37**: 49 - 54, 1986.
- [104] MYŚLIWSKI A., MYŚLIWSKA J., KMIEĆ Z., Age-related changes in liver cell nuclei of different ploidy, *Histochemistry*, **52**: 91 - 96, 1977.
- [105] NAKAZAWA Z., MORI N., GOTO S., Functional deterioration of mouse liver ribosomes during aging; translational activity and activity for formation of the 47S initiation complex, *Mech. Age. Dev.*, **26**: 241 - 251, 1984.
- [106] NEUMEISTER J. A., WEBSTER G. C., Changes in the level and the rate of synthesis of transfer RNA in tissues of mice of different ages, *Mech. Age. Dev.*, **16**: 319 - 326, 1981.
- [107] NIEDERMÜLLER H., HOFHECKER G., SKALICKY M., Changes of DNA repair mechanisms during the aging of the rat, *Mech. Age. Dev.*, **29**: 221 - 238, 1985.

- [108] NIEDŹWIEDZKI A., LEWIS P. N., CINADER B., Changes of histone H1 subtypes with aging in strains of mice that possess different immunological characteristics, *J. Gerontol.*, **40**: 695 - 699, 1985.
- [109] NOKUBO M., Physical-chemical and biochemical differences in liver plasma membranes in aging Fischer 344 rats, *J. Gerontol.*, **40**: 409 - 414, 1985.
- [110] OBENRADER M. F., LANSING A. I., OVE P., Evidence relating the amount of albumin mRNA to the increased albumin synthetic activity observed in old rats, [w] *Explorations in Aging*, red. V. J. Cristofalo, Plenum Press, New York 1975, 289 - 290.
- [111] O'MEARA A. R., HERRMANN R. L., A modified mouse liver preparation displaying age-related differences in salt dissociation and template activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **269**: 419 - 427, 1972.
- [112] ÖSTERLIND P. O., ALAFUZOT I., LÖFGREN A. C., MARKLUND S., NYSTRÖM L., SANDMAN P. O., STEEN B., WINBLAD B., Blood components in an elderly population, *Gerontology*, **30**: 247 - 252, 1984.
- [113] PARK S. W., UENEO R., HAYASHI O., Prostaglandin synthesizing enzyme activities of hepatocytes and non-hepatocytes in rat liver as a function of age, *Biochem. Int.*, **13**: 827 - 834, 1986.
- [114] PATERNIT J. R., Jr., LIN C. P., BEATTIE D. S., Delta-aminolevulinic acid synthetase: regulation of activity in various tissues of the aging rat, *Arch. Biochem. Biophys.*, **191**: 792 - 797, 1978.
- [115] PETKOVA D. H., MOMECHILOVA A. B., KOUMANOV K. S., Age-related changes in rat liver plasma membrane phospholipase A₂ activity, *Exp. Gerontol.*, **21**: 187 - 193, 1986.
- [116] PETTEL J. K., LEBHERZ H. G., Properties and metabolism of fructose diphosphate aldolase in liver of „old” and „young” mice, *J. Biol. Chem.*, **254**: 8179 - 8184, 1979.
- [117] PIERI C., ZSY-NAGY V., GIULI C., ZSY-NAGY I., BRETTONI-FREDDARI C., Age-dependent increase of thermal stability of in situ chromatin of rat liver and its reversal after hepatectomy, *Experientia*, **32**: 891 - 903, 1976.
- [118] PLESKO M., RICHARDSON A., Age-related changes in unscheduled DNA synthesis by rat hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**: 730 - 735, 1984.
- [119] PRABHAKARAM M., SINGH S. N., Effect of age on the crystalline rat liver lactate dehydrogenase, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **5**: 57 - 64, 1986.
- [120] REIS R. J. S., Ribosomes from aging mice are not generally deficient in cell free protein synthesis, *Mech. Age. Dev.*, **17**: 311 - 320, 1981.
- [121] REZNICK A. Z., LAVIE L., GERSHON H. E., GERSHON D., Age-associated accumulation of altered FDP aldolase in mice, *FEBS Lett.*, **128**: 221 - 224, 1981.
- [122] RICHARDSON A., BIRCHENALL-SPARKS M. C., STAECKER J. L., HARDWICK J. P., LIU D. S. H., The transcription of various types of ribonucleic acid by hepatocytes isolated from rats of various ages, *J. Gerontol.*, **37**: 666 - 672, 1982.
- [123] ROSS M. H., ELY J. O., Aging and enzyme activity, *J. Franklin Inst.*, **258**: 63 - 78, 1954.
- [124] ROTH G. S., Age-related changes in specific glucocorticoid binding by steroid responsive tissues of rats, *Endocrinology*, **94**: 82 - 91, 1974.
- [125] — Hormone receptor change during aging: significance for gerontological research, *Fed. Proc.*, **38**: 1910 - 1914, 1979.
- [126] ROY A. K., NATH T. S., MOTWANI N. M., CHATTERJEE B., Age-depen-

- dent regulation of the polymorphic forms of α_{2u} -globulin, *J. Biol. Chem.*, **258**: 10123 - 10127, 1983.
- [127] RUTHEFORD M. S., BAEHLER C. S., RICHARDSON A., Genetic expression of complement factors and α_1 -acid glycoprotein by liver tissue during senescence, *Mech. Age. Dev.*, **35**: 245 - 254, 1986.
- [128] SARKAR F. H., SARKAR P. K., HUNTER S., POULIK M. D., ROY A. K., Cytoplasmic androgen binding protein of rat liver: molecular characterization after photoaffinity labelling and functional correlation with the age-dependent synthesis of α_{2u} -globulin, *Biochemistry*, **26**: 3965 - 3970, 1987.
- [129] SCARPACE P. J., ABRASS I. B., Thyroid hormone regulation of beta-adrenergic receptor number in aging rats, *Endocrinology*, **108**: 1276 - 1278, 1981.
- [130] SCHACHTER D., Fluidity and function of hepatocytes plasma membranes, *Hepatology*, **4**: 140 - 151, 1984.
- [131] SCHMUCKER D. L., GILBERT L., JONES A. L., HRADEK G. T., BAZIN H., Effect of aging on the hepatobiliary transport of dimeric immunoglobulin A in male Fischer rat, *Gastroenterology*, **88**: 436 - 443, 1985.
- [132] SCOTTO A. W., RINEHART R. W., BEATTIE D. S., Aging-related decreases in hepatic mitochondrial and cytoplasmic delta-amino-levulinic acid synthase during experimental porphyria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **222**: 150 - 157, 1983.
- [133] SILBER J. R., FRY M., MARTIN G. M., LOEB L. A., Fidelity of DNA polymerases isolated from regenerating liver chromatin of aging *Mus musculus*, *J. Biol. Chem.*, **260**: 1304 - 1310, 1985.
- [134] SINGH I. R. N., SINGH S. N., Regulation of NAD- and NADP-linked isocitrate dehydrogenase by hydrocortisone in the brain and liver of male rats of various ages, *Biochim. Biophys. Acta*, **633**: 323 - 330, 1980.
- [135] SOJAR H. T., ROTHSTEIN M., Protein synthesis by liver ribosomes from aged rats, *Mech. Age. Dev.*, **35**: 47 - 57, 1986.
- [136] SPECTOR A. A., YOREK M. A., Membrane lipid composition and cellular function, *J. Lipid Res.*, **26**: 1015 - 1035, 1985.
- [137] STITH R. D., McCALLUM R. E., Effects of aging and endotoxin on hepatic glucocorticoid action and glucose metabolism in mice, *Mech. Age. Dev.*, **30**: 73 - 78, 1985.
- [138] STORY J. A., Age-related changes in cholesterol metabolism, w *Liver and Aging — 1978*, red. K. Kitani, Elsevier, Amsterdam 1978, 193 - 201.
- [139] STORY J. A., KRITCHEVSKY D., Cholesterol oxidation by rat liver preparations: effect of age, *Experientia*, **30**: 242 - 243, 1974.
- [140] STORY J. A., TEPPER J. A., KRITCHEVSKY D., Age-related changes in lipid metabolism of Fischer 344 rats, *Lipids*, **11**: 623 - 627, 1976.
- [141] STORY J. A., GOMOLIŃSKI E., TEPPER S. A., KRITCHEVSKY D., Comparison of lipid metabolism in two strains of rats of various ages, *Fed. Proc.*, **37**: 329, 1978.
- [142] STORY J. A., GOMOLIŃSKI E., TEPPER S. A., CZARNECKI S. K., KRITCHEVSKY D., Age-strain interrelations of lipid metabolism, of rats, *Lipids*, **16**: 87 - 92, 1981.
- [143] SZAMOSI T., PORJESZ T., The penetration of the membrane of mitochondria obtained from livers of adult or old rats by different anions, *Experientia*, **28**: 394 - 396, 1972.
- [144] SZYMAŃSKI E. S., LITTLE N. A., KRITCHEVSKY D., Phospholipid metabolism in livers of young and old Fischer 344 and Sprague-Dawley rats, *Exp. Gerontol.*, **16**: 163 - 169, 1981.
- [145] TAKAHASHI R., GOTO S., Age-associated accumulation of heat-labile

- aminoacyl-tRNA synthetases in mice and rats, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **6**: 73 - 82, 1987.
- [146] TAKAHASHI R., MORI N., GOTO S., Alteration of aminoacyl tRNA synthetases with age: accumulation of heat-labile enzyme molecules in rat liver, kidney and brain, *Mech. Age. Dev.*, **33**: 67 - 75, 1985.
- [147] — Accumulation of heat-labile elongation factor 2 in the liver of mice and rats, *Exp. Gerontol.*, **20**: 325 - 331, 1985.
- [148] UCHIDA K., NOMURA Y., KADOWAKI M., TAKASE H., TAKANO K., TAKEUCHI N., Age-related changes in cholesterol and bile acid metabolism in rats, *J. Lipid Res.*, **19**: 544 - 552, 1978.
- [149] UCHIDA K., NOMURA Y., KADOWAKI M., TAKASE H., TAKANO K., Age-related changes in cholesterol-bile acid metabolism and hepatic mixed function oxidase activities in rats, w *Liver and Aging — 1982*, red. K. Kitani, Elsevier, Amsteram 1982, 195 - 209.
- [150] UNGEMACH F. R., HEGNER D., Effect of local anesthetics on cellular respiration and thymidine transport in hepatocytes from young and old rats, *Mech. Age. Dev.*, **14**: 127 - 135, 1980.
- [151] UNDERDOWN B. J., Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface, *Annu. Rev. Immunol.*, **4**: 389 - 417, 1986.
- [151] Van BEZOOIJEN C. F. A., Cellular basis of liver aging studied with isolated hepatocytes, Thesis, Utrecht 1978.
- [153] Van BEZOOIJEN C. F. A., GRELL T., KNOOK D. L., Albumin synthesis by liver parenchymal cells isolated from young and old rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**: 513 - 518, 1976.
- [154] — The effect of age on protein synthesis by isolated liver parenchymal cells, *Mech. Age. Dev.*, **6**: 293 - 304, 1977.
- [155] Van BEZOOIJEN C. F. A., SAKKEE N., KNOOK D. L., Sex and strain dependence of age related changes in protein synthesis of isolated rat hepatocytes, *Mech. Age. Dev.*, **17**: 11 - 18, 1981.
- [156] VANDENHAUTE J., DELCOUR J., Age-related modifications in the protein synthesis machinery of mouse liver cells, [W] *Morphological, Biochemical and Pharmacological Aspects of Aging Liver*, red. C. F. A. Van Bezooijen, EURAGE, Rijsvijk 1984, 13 - 18.
- [157] VINYKUK M., Aminoacylation of rat liver transfer RNA with homologous and heterologous enzyme systems during aging, *Biochem. Int.*, **12**: 479 - 484, 1986.
- [158] VIOLA-MAGNI M. P., MAGNI F., Age-related changes in rat liver tyrosine-aminotransferase (TAT) rythm, [W] *Modern Trends in Aging Research*, red. D. L. Knook, John Libbey, Paris 1986, 141 - 146.
- [159] VISKUP R. W., BAKER M., HOLBROOK J. P., PENMIAL R., Age-associated activities of protein synthesis of rat hepatocytes *Exp. Aging Res.*, **5**: 487 - 496, 1979.
- [160] VITTORICA J., SATRUSTEGUI N., MACHADO A., Metabolic implications of aging: changes in activities of key lipogenic and gluconeogenic enzymes in the aged rat liver, *Enzyme*, **26**: 144 - 155, 1981.
- [161] Von HAHN H. P., Structural and functional changes in nucleoprotein during the aging of the cell, *Gerontologia*, **16**: 116 - 127, 1970.
- [162] VORBECK M. L., MARTIN A. P., PARK J. K. J., TOWNSEND J. F., Aging-related decrease in hepatic cytochrome oxidase of the Fischer 344 rat, *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**: 67 - 79, 1982.
- [163] VORBECK M. L., MARTIN A. P., LONG J. W., Jr., SMITH J. M., ORR R. R., Jr., Aging-dependent modification of lipid composition and lipid structural

- order parameter of hepatic mitochondria, Arch. Biochem. Biophys., **217**: 351 - 361, 1982.
- [164] VYDELINGUM N. A., Influence of age obesity on protein metabolism in rat epididymal adipose tissue and liver, Age, **10**: 44 - 53, 1987.
- [165] WANG R., MAYS L., Opposite changes in rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase during aging in Sprague-Dawley and Fischer 344 male rats, Exp. Gerontol., **12**: 177 - 183, 1977.
- [166] WARNER C. M., BRIGGS C. J., BALINSKY D., MEYER T. E., Glucose phosphate isomerase activity in C57BL/6 and A mice of different ages, Gerontology, **31**: 315 - 320, 1985.
- [167] WATERLOW J. C., Protein turnover with special reference to man, Quart. J. Exp. Physiol., **69**: 409 - 438, 1984.
- [168] WEBER A., GREGORI C., SCHAPIRA F., Aldolase B in the liver of senescent rats, Biochim. Biophys. Acta, **444**: 810 - 815, 1976.
- [169] WEINBACH E. C., GARBUS J., Oxidative phosphorylation in mitochondria from aged rats, J. Biol. Chem., **234**: 412 - 417, 1959.
- [170] WEINDRUCH R. H., CHEUNG M. K., VERITY M. A., WALFORD R. L., Modification of mitochondrial respiration by aging and by dietary restrictions, Mech. Age. Dev., **12**: 375 - 392, 1980.
- [171] WEISBROD S., Active chromatin, Nature, **297**: 289 - 295, 1982.
- [172] WELLINGER R., GUIGOZ Y., The effect of age on the induction of tyrosine aminotransferase and tryptophan oxygenase genes by physiological stress, Mech. Age. Dev., **34**: 203 - 217, 1986.
- [173] WERNER M., TOLLS R. E., HULTIN J. V., MELLECHER J., Influence of sex and age on the normal range of eleven serum constituents, Z. Klin. Chem., **8**: 105 - 115, 1970.
- [174] WILSON P. D., Enzyme patterns in young and old mouse livers and lungs, Gerontologia, **18**: 36 - 54, 1972.
- [175] WILSON P. D., HILL B. T., FRANKS L. M., The effect of age on mitochondrial enzymes and respiration, Gerontologia, **21**: 95 - 101, 1975.
- [176] WILSON P. D., WATSON R., KNOOK D. L., The effects of age on rat liver enzymes: a study using isolated hepatocytes, Gerontology, **28**: 32 - 43, 1982.
- [177] YU B. P., WONG G., LEE H. C., BERTRAND H., MASORO E. J., Age changes in hepatic metabolic characteristics and their modulation by dietary manipulation, Mech. Age. Dev., **24**: 67 - 81, 1984.
- [178] ZS-NAGY I., GYENES M., LUSTYIK G., ZS-NAGY V., JENEY F., Age-dependent decrease of cell membrane permeability of rat hepatocytes as revealed by in vivo Rb⁺-uptake and release, [W] Liver and Aging — 1982, wyd. K. Kitani, Elsevier Biomedical, Amsterdam 1982, 215 - 227.
- [179] ZS-NAGY I., Common mechanisms of cellular aging in brain and liver in the light of the membrane hypothesis of aging, [W] Liver and Aging — 1986, Liver and Brain, wyd. K. Kitani, Elsevier Biomedical, Amsterdam 1986, 373 - 384.
- [180] ZS-NAGY I., KITANI K., OHTA M., ZS-NAGY V., IMAHORI K., Age-dependent decrease of the lateral diffusion constant of proteins in the plasma membrane of hepatocytes as revealed by fluorescence recovery after photobleaching in tissue smears, Arch. Gerontol. Geriatr., **5**: 141 - 146, 1986.

Otrzymano: 30 września 1986.

Przyjęto: 15 lutego 1988.

Adres autora: ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk.

KOMUNIKAT Nr 1

W dniach 15-17 czerwca 1989 r. odbędzie się w Szczecinie XXII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików. Zasadnicze tematy Sympozjum:

1. **Proliferacja, różnicowanie i dojrzewanie komórek.**
2. **Hodowla komórek: metody, zastosowanie w badaniach dotyczących biologii komórki.**

Obrady Sympozjum będą prowadzone w języku angielskim.

Zgłoszenie uczestnictwa prosimy nadsyłać do 31 października 1988 r., a tytuł i streszczenie pracy do 31 grudnia 1988 r. pod adresem:

Komitet Organizacyjny XXII Sympozjum PTHiC
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Pomorskiej Akademii Medycznej
Al. Powstańców Wlkp. 72
70-111 Szczecin, tel. 82 40 82

Streszczenie pracy w języku angielskim nie może przekraczać jednej strony maszynopisu (30 wierszy łącznie z tytułem), z zachowaniem 3,5 cm marginesu.

Komitet Organizacyjny

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumeratę **na kraj** przyjmują i informacji o cenach udzielają urzędy pocztowe i doręczyciele na wsi oraz Oddziały RSW „Prasa – Książka – Ruch” w miastach.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki **za granicę** przyjmuje RSW „Prasa – Książka – Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto NBP XV Oddział w Warszawie nr 1153-201045-139-11. Wysyłka za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:

- do 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do 1 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise
ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland.

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

TREŚĆ

S. MALESZEWSKI, Karboksylaza/oksygenaza rybulozo- -1,5-bisfosforanu – kluczowy enzym fotosyntezy i foto- oddychania	233
Z. M. RUPNIEWSKA, Wieloetapowy rozwój przewlekłej białaczki szpikowej. I. Właściwości niektórych protoonko- genów uczestniczących w patogenezie przewlekłej bia- łaczki szpikowej	255
Z. M. RUPNIEWSKA, Wieloetapowy rozwój przewlekłej białaczki szpikowej. II. Zmiany molekularne związane z przewlekłą białaczką szpikową	283
Z. KILIAŃSKA, Nabyty zespół niedoboru immunologicz- nego (AIDS) w świetle nauk biologicznych	299
A. KRUSZEWSKA, M. BOGUTA, Struktura i funkcja mito- chondrialnych genomów	327
R. GORĄCZNIAK, H. AUGUSTYNIAK, Małe cząsteczki DNA występujące w mitochondriach roślin wyższych	347
Z. KMIEĆ, Wpływ starzenia na strukturę mięszowych komórek wątroby	367
Z. KMIEĆ, Wpływ starzenia na aktywność metaboliczną hepatocytów	