

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postępy Biologii Komórki

TOM 16-NR 2

1989 (125-267)

PWN WARSZAWA — WROCŁAW

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje kolegium

Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wincenty KILARSKI, Jan
MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Maciej ZABEL

Rada Redakcyjna

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni
HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd
NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK,
Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

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

Państwowe Wydawnictwo Naukowe – Oddział Wrocławski

Nakład 530+100 egz. Ark. wyd. 10,75. Ark. druk. 9. Papier druk. sat. kl. III 80 g 70×100 cm. Oddano do składania
24 I 1989 r. Podpisano do druku w lipcu 1989 r. Druk ukończono w październiku 1989 r. Zam. 4053/89. Cena 240 zł
Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

<http://rcin.org.pl>

MOLEKULARNE PODSTAWY SYNTEZY IMMUNOGLOBULIN ORAZ RECEPTORA LIMFOCYTÓW T

MOLECULAR BASIS OF IMMUNOGLOBULIN AND T CELL RECEPTOR SYNTHESIS

Robert GNIADDECKI

Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie. Geny kodujące immunoglobuliny oraz receptory limfocytów T są odcinkami DNA noszącymi nazwy V, D, J. Podczas rozwoju limfocytów geny V, D, J rekombinują ze sobą. Enzymem odpowiedzialnym za łączenie genów V, D, J jest rekombinaza. Mechanizm jej działania oraz zakres różnorodności immunoglobulin i receptorów limfocytów T omówiono w tej pracy. Ponadto przedstawiono poglądy na ewolucję genów V, D, J.

Summary. Immunoglobulin and T cell antigen receptor genes in their germline form are organized as discontinuous DNA elements named V, D, J. These V, D, J genes are joined by recombinations during lymphocyte development. The enzyme participating in this process is called recombinase. Mechanism of its action is reviewed below. The extent of the diversity of immunoglobulins and T cell receptors is discussed in the following article. Moreover, current views on the evolution of V, D, J genes are presented.

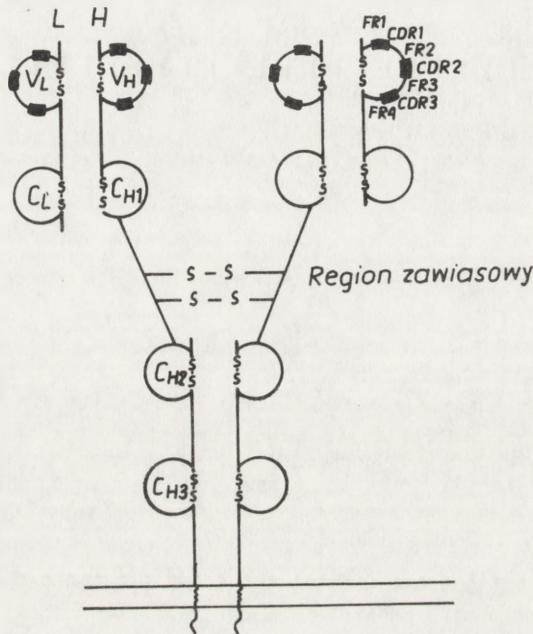
1. WSTĘP

Immunoglobuliny (Ig) oraz receptor limfocyty T (TCR) to dwie podstawowe cząsteczki umożliwiające swoiste rozpoznanie antygeny przez układ immunologiczny. Ich struktura molekularna oraz genetyczne mechanizmy syntezy są w ostatnich latach intensywnie badane. Celem niniejszej pracy jest opis genów kodujących Ig i TCR, ich rekombinacji, ewolucji oraz procesów prowadzących do zmienności kodowanych przez nie białek.

2. STRUKTURA IMMUNOGLOBULIN I RECEPTORA LIMFOCYTÓW

2.1. BUDOWA IMMUNOGLOBULIN

Struktura cząsteczki immunoglobuliny (Ig) jest bardzo dobrze poznana (ryc. 1). Składa się ona z czterech łańcuchów polipeptydowych, połączonych ze sobą mostkami siarczkowymi S-S. Wyróżniamy dwa łańcuchy lekkie L (z ang.



Ryc. 1. Schemat immunoglobuliny. Półkola symbolizują domeny białkowe, odcinki pogrubione oznaczają regiony hiperzmiennicze CDR

light) i dwa ciężkie H (z ang. heavy). Każdy z łańcuchów składa się z N-końcowej części zmiennej V (z ang. variable) i C-końcowej części stałej C (z ang. constant) [147, 171]. Części zmienne łańcucha lekkiego i ciężkiego są zbudowane podobnie – składają się z trzech regionów hiperzmienniczych CDR 1, 2, 3 (z ang. complementarity determining region), rozdzielonych czterema sekwencjami o mniejszej różnorodności FR 1, 2, 3, 4 (z ang. framework region) [147]. Za wiązanie antygeny są głównie odpowiedzialne regiony CDR. Każda część zmienna jest jednocześnie pojedynczą, wyróżnioną domeną białkową zamkniętą wiązaniem S-S [70]. Części zmienne V_L i V_H tworzą miejsca wiązania antygeny [147].

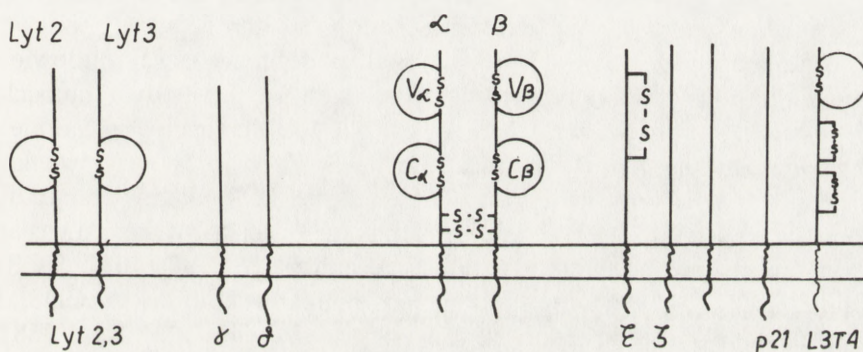
Część stała łańcucha ciężkiego jest zbudowana z trzech, rzadziej czterech

domen białkowych (C_H 1, 2, 3), natomiast w łańcuchu lekkim część stała jest krótsza – obejmuje tylko jedną domenę (C_L) [147]. Typ łańcucha immunoglobulinowego zależy od budowy części stałej. Wyróżniamy 4 typy łańcuchów lekkich (κ , λ 1, λ 2, λ 3) oraz 8 typów łańcuchów ciężkich (μ , γ 1, γ 2a, γ 2b, γ 3, α , ϵ) [171]. Typ łańcucha immunoglobulinowego ciężkiego określa rodzaj całej immunoglobuliny. Wyróżniamy: IgM, IgD, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA i IgE [147, 171].

2.2. BUDOWA RECEPTORA LIMFOCYTÓW T

Wyróżniamy dwa rodzaje receptorów limfocytów T (TCR) [13, 84, 96, 129]:

- „klasyczne” receptory składające się z polipeptydowych łańcuchów α i β (znajdowane są na większości limfocytów T) (rys. 2);
- receptory składające się z łańcuchów γ i δ (obecne na ok. 2% limfocytów T, tymocytach, komórkach dendrytycznych, niektórych komórkach NK oraz komórkach śródnabłonkowych jelita).



Ryc. 2. Schemat budowy receptora limfocytów T

Opis budowy białkowej TCR oraz wyizolowanie genów kodujących łańcuchy α i β jest osiągnięciem ostatnich pięciu lat [59, 78]. Obecnie wiadomo, że TCR składa się z łańcuchów polipeptydowych połączonych z sobą mostkami dwusiarczkowymi S–S [4, 124] (rys. 2). Każdy z łańcuchów zawiera część stałą i zmienną, które, podobnie jak w przypadku immunoglobulin, są zorganizowane w domeny białkowe, spięte mostkami S–S. Dimer α/β osadzony jest w błonie limfocytu. Do prawidłowego działania receptorów limfocytów T potrzebne są dodatkowe białka. U myszy odkryto następujące białka pomocnicze: γ , δ , ϵ , ζ i p21. Tworzą one kompleks T3 odgrywający ważną rolę w przewodzeniu sygnału z TCR do wnętrza komórki [4, 128, 130]. U człowieka istnieje analogiczny kompleks o prostszej budowie, nazwany CD3. Składa się

z łańcuchów CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ i prawdopodobnie CD3 ζ [130, 177]. Interakcja dodatkowo naładowanych reszt lizyn w częściach błonowych łańcuchów α i β i ujemnie naładowanych części błonowych polipeptydów wchodzących w skład kompleksu T3/CD3 warunkuje ich bliskie ułożenie na powierzchni limfocyta T. Oprócz kompleksu T3 (CD3), do działania TCR niezbędne są białka CD4 (mysi odpowiednik L3T4) i CD8 (u myszy Lyt2,3). Ich zadaniem jest najprawdopodobniej wiązanie się z monomorficznymi częściami antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy I (w przypadku CD8) lub klasy II (CD4) (39, 130). Być może białka CD4 i CD8 mają pewien udział w tworzeniu swoistości TCR.

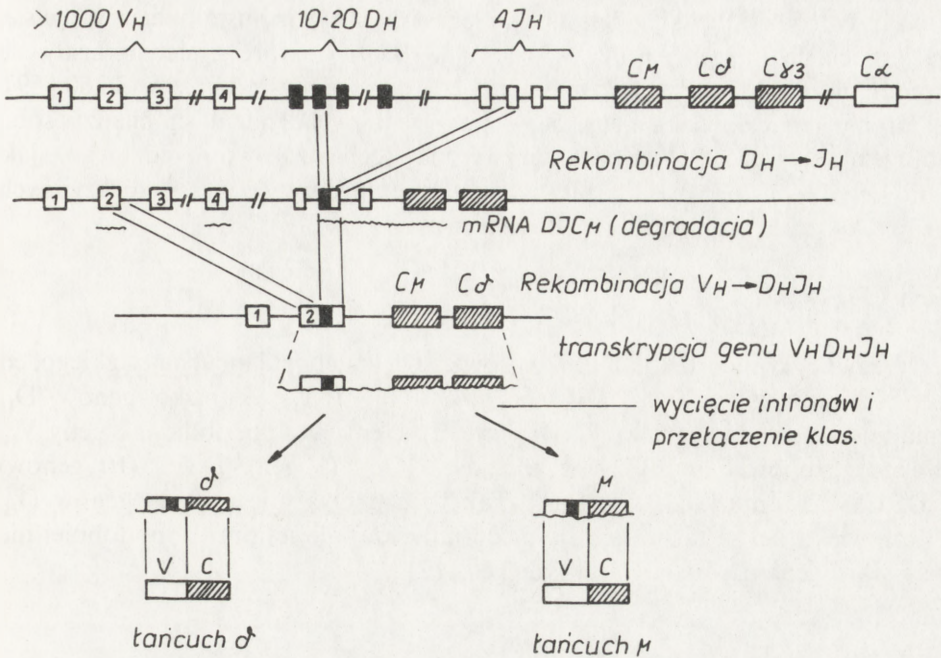
Obecność dodatkowych białek w połączeniu z receptorem limfocytów T nie jest jednak jedyną różnicą między immunoglobulinami a TCR. Okazało się bowiem, że TCR nie rozpoznaje antygeny rozpuszczalnego, a tylko w połączeniu z MHC (tzw. MHC restrykcja), co ma zapewne duże znaczenie w obronie przeciwwirusowej organizmu [12, 14]. Ponadto, w przeciwieństwie do immunoglobulin, receptor limfocytów T nie pełni funkcji efektorowych w odpowiedzi immunologicznej. Jednak zasada wiązania antygeny jest w przypadku obu receptorów taka sama — struktury przestrzenne miejsc łączących się z antygenem w Ig i TCR są do siebie podobne [30, 153].

Receptor drugiego typu (TCR γ/δ) jest podobny w swej budowie do opisanego tu klasycznego receptora α/β . Składa się on z dwu łańcuchów γ i δ posiadających część zmienną i stałą [24]. Oba łańcuchy mogą, ale nie muszą być połączone za pomocą mostków S—S. Tak więc, w przeciwieństwie do TCR α/β , wyróżniamy dwie formy molekularne TCR γ/δ : zawierającą i nie zawierającą wiązań S—S. Wydaje się jednak, że obecność wiązań dwusiarczkowych nie wpływa na funkcjonalność receptora [56, 87, 101]. TCR γ/δ , podobnie jak TCR α/β , zespolony jest z białkami kompleksu CD3. Nie wykazano jednak obecności białek CD4 i w połączeniu z TCR γ/δ [88].

3. BUDOWA GENÓW KODUJĄCYCH IMMUNOGLOBULINY

3.1. GENY KODUJĄCE IMMUNOGLOBULINOWY ŁAŃCUCH CIĘŻKI

W skład locus kodującego łańcuch ciężki (locus H) wchodzi cztery rodzaje genów: V_H (z ang. variable), D_H (z ang. diversity), J_H (z ang. joining) i C_H (z ang. constant) (ryc. 3). Część zmienną łańcucha ciężkiego kodują geny V_H, D_H, J_H, natomiast część stałą — gen C_H. U człowieka locus H leży na chromosomie 14 (prążek q32) [176].



Ryc. 3. Budowa i rekombinacja genów kodujących łańcuch ciężki. Nie zaznaczono wszystkich genów C

Geny V_H

Geny V_H składają się z dwu egzonów. Egzon 5' (zwany również genem L) koduje większą część tzw. sekwencji sygnałowej (reszty aminokwasowe od -19 do -4), która umożliwi przejście białka do szorstkiej siateczki cytoplazmatycznej. Sekwencja sygnałowa zostaje tam odcięta i zdegradowana. Egzon 3' (właściwy gen V_H) koduje pozostałą część sekwencji sygnałowej oraz 95-98 N-końcowych aminokwasów ciężkiego łańcucha immunoglobulinowego [176]. Odpowiada to regionom FR1, CDR1, FR2 i CDR2 [147, 151, 171, 183]. Istnieje wiele genów V_H , które zostały na podstawie wzajemnych homologii podzielone na rodziny [6, 102, 183]. U myszy wyróżniamy co najmniej 9 rodzin genów V_H oznaczonych następująco: 3609, J558, J606, VGAM3-8, 36.60, X24, Q52, 7183 [136]. Poszczególne rodziny nie są, jak się uprzednio wydawało, ściśle od siebie odgraniczone [171, 184], przeciwnie, geny V_H z różnych rodzin przeplatają się wzajemnie [136]. Nie wiadomo dokładnie, ile jest genów V_H u myszy, ale wykazano, że tylko jedna rodzina (J558) zawiera 500-1000 członków [102].

Liczba rodzin ludzkich genów V_H nie jest definitywnie ustalona. Wydaje się, że jest ich co najmniej 6 (V_I – V_{VI}) [69, 83, 97]. Niektóre z nich okazały się homologiczne do mysich rodzin V_H ; np. V_{IV} odpowiada rodzinie $V_H36.60$ [69]. U myszy i u człowieka geny V_H z poszczególnych rodzin są między sobą poprzelatane [83, 97]. Charakterystyczną cechą zarówno ludzkiego, jak i mysiego locus H jest obecność wielu pseudogenów ψV_H – nieczynnych genów o strukturze podobnej do aktywnych V_H [77].

Geny D_H

Geny D_H kodują 1–15 aminokwasów części zmiennej łańcucha ciężkiego, co odpowiada fragmentowi CDR3 [6, 147, 171, 183]. Skupisko genów D_H znajduje się między genami V_H i J_H (ryc. 3). Geny D_H , podobnie jak geny V_H , można zgrupować u myszy w rodziny: DQ52 (1 gen), DSP2 (10 genów) i DFL16 (2 geny) [147, 171, 183]. Tak więc u myszy jest 10–20 genów D_H . U człowieka liczba ta wydaje się nieco mniejsza, ale najprawdopodobniej nie wszystkie geny D zostały odkryte [66, 171].

Geny J_H

Geny J_H kodują region FR4 części zmiennej łańcucha ciężkiego [171]. Skupisko genów J_H leży między genami D_H a genem $C\mu$. Liczba genów J_H jest niska, np. u myszy odkryto tylko 4 geny J_H [147, 183].

Geny C_H

Geny C_H kodują część stałą ciężkiego łańcucha immunoglobulinowego. U myszy wyróżniamy 8 genów C_H ułożonych na chromosomie w następującym porządku: $5'\mu$, δ , $\gamma3$, $\gamma1$, $\gamma2b$, ϵ , $\alpha3'$ [147]. Każdy gen C_H koduje odpowiadającą mu część stałą, np. gen $C\mu$ koduje część stałą łańcucha ciężkiego μ . U człowieka genów C_H jest więcej niż u myszy, są to: $5'\mu$, δ , $\gamma3$, $\gamma1$, $\psi\epsilon$ (pseudogen), $\alpha1$, $\psi\gamma$ (pseudogen), $\gamma2$, $\gamma4$, ϵ , $\alpha23'$ [118, 176]. Ludzkie geny C_H układają się w skupiska (ang. clusters). Wyróżniamy 3 takie skupiska:

- 1) geny μ i δ ,
- 2) geny $\gamma3$ – $\gamma1$,
- 3) geny $\gamma2$ – $\alpha2$.

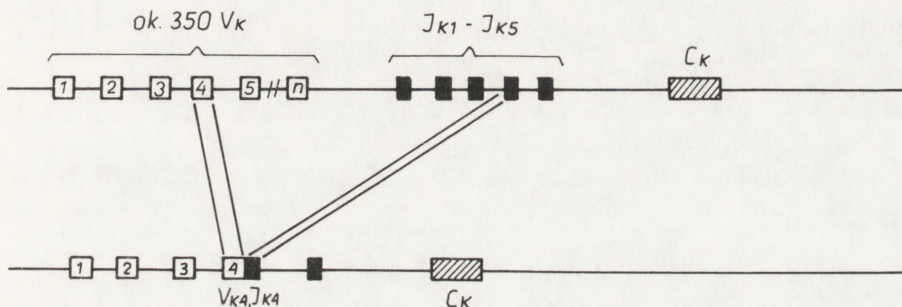
Gen $\psi\gamma$ nie należy do żadnego ze skupisk [118].

Wewnętrzna organizacja genów C_H jest szczególna. Składają się one z intronów i egzonów, przy czym liczba egzonów odpowiada z reguły liczbie domen białkowych części stałej. Na przykład gen $\gamma2a$ u myszy zawiera 5 osobnych egzonów: dla domeny C_H1 , regionu zawiasowego, domeny C_H2

i C_{H3} oraz części przechodzącej przez błonę komórkową. Taka charakterystyczna organizacja egzonów występuje we wszystkich genach C kodujących części stałe zarówno łańcuchów immunoglobulinowych, jak i receptorów limfocytów T [66, 111, 147].

3.2. GENY KODUJĄCE LEKKI ŁAŃCUCH IMMUNOGLOBULINOWY κ

Locus κ leży u człowieka na chromosomie 2 (prążek $q13$) [176]. Zasada jego budowy jest podobna do omówionego już tu locus H. Zwraca uwagę brak genów D: locus κ zawiera jedynie geny V_{κ} , J_{κ} i C_{κ} (ryc. 4). Liczba genów V_{κ} jest



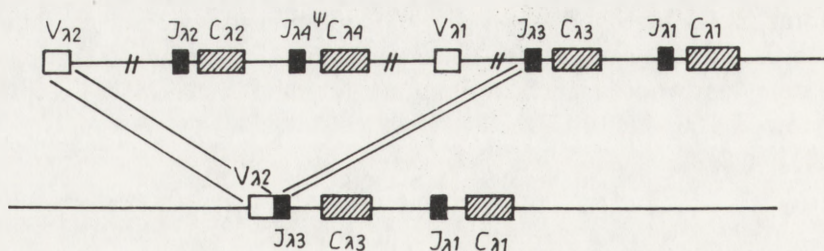
Ryc. 4. Budowa i rekombinacja genów kodujących immunoglobulinowy łańcuch κ

o wiele niższa niż u genów V_H ; istnieje ok. 350 V_{κ} , które można zgrupować w 4 rodziny [132, 147, 183]. Geny z poszczególnych rodzin przeplatają się wzajemnie, podobnie jak w przypadku V_H [131, 132]. Część genów V_{κ} (ok. 10%) leży poza właściwym locus κ , który znajduje się na chromosomie 6 (mysz) lub 2 (człowiek) [111]. Znalaziono bowiem V_{κ} u myszy na chromosomach 1, 15, 22 [105]. Próba interpretacji tych obserwacji będzie przedstawiona w rozdz. 9.

W kierunku 3' do genów V_{κ} znajduje się skupisko 5 genów J_{κ} , z których jeden ($J_{\kappa 3}$) jest pseudogenem [147, 171]. W locus κ w przeciwieństwie do locus H, wyróżniamy pojedynczy gen C_{κ} .

3.3. GENY KODUJĄCE LEKKI ŁAŃCUCH IMMUNOGLOBULINOWY λ

Locus λ leży u człowieka na chromosomie 22 (prążek $q11$) [176]. Jego budowa różni się znacznie od opisanych tu loci H i κ . Charakterystyczna jest niska liczba genów. Wyróżniamy jedynie 2 geny V_{λ} , 4 geny J_{λ} i 4 geny C_{λ} (ryc. 5) [147]. Nie istnieją wyodrębnione skupiska genów V_{λ} i J_{λ} , a obserwuje się fizyczne sprzężenie genów J z odpowiednimi genami C [183]. Locus λ zawiera



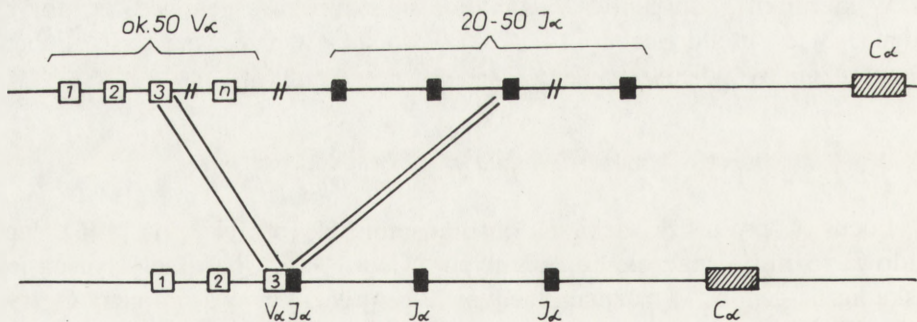
Ryc. 5. Budowa i rekombinacja genów kodujących immunoglobulinowy łańcuch λ

więc 4 geny C, z których jeden ($C_{\lambda 4}$) jest defektywny. Czynne są zatem tylko 3 geny C, stąd też 3 typy łańcucha λ : $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$ [147, 171, 183].

4. BUDOWA GENÓW KODUJĄCYCH RECEPTORY LIMFOCYTÓW T

4.1. GENY KODUJĄCE ŁAŃCUCH α

Locus α u człowieka leży na chromosomie 14 (prążek q11-12) [176]. Pod względem zasady budowy przypomina immunoglobulinowy locus κ ; wyróżniamy jedynie geny V_{α} , J_{α} oraz pojedynczy gen C_{α} (ryc. 6) [113]. W obrębie locus α znajduje się ok. 50 genów V i od 20 do 50 genów J [54, 113, 176]. W porównaniu z locus κ , cechą charakterystyczną jest mała liczba genów V_{α} oraz liczne geny J_{α} rozsiane na bardzo długim odcinku chromosomu (60 kb) [182, 187]. Dla porównania, geny J_H i J_{κ} nie zajmują obszaru dłuższego niż 3 kb [187]. Geny V_{α} są bardzo różnorodne; dzielą się aż na 10 rodzin po 1–10 członków [7, 54]. Tak więc wzajemne homologie genów V_{α} są o wiele mniejsze

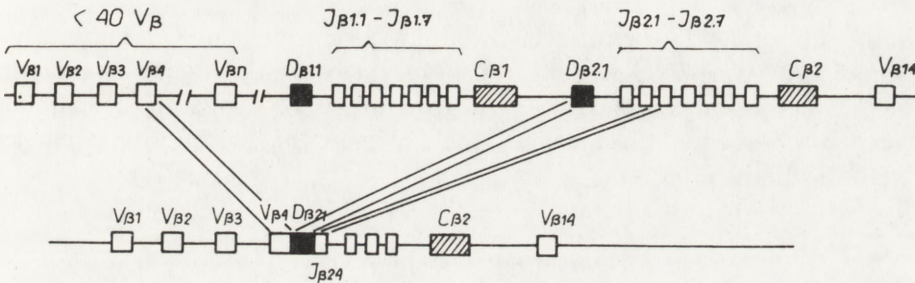


Ryc. 6. Budowa i rekombinacja genów kodujących łańcuch α .

niż immunoglobulinowych genów V (7). Locus α nie zawiera segmentów D. Jednak na końcu 5' niektórych genów J_α znaleziono odcinki DNA homologiczne do genów D [57]. Być może istniały więc niegdyś geny D_α , które po fuzji z pierwotnymi genami J dały wtórne geny J_α .

4.2. GENY KODUJĄCE ŁAŃCUCH β

W skład locus kodującego łańcuch β (locus β -chromosom ludzki 7q32-35) wchodzi 4 rodzaje genów: V_β , D_β , J_β i C_β (ryc. 7) [4, 54, 95, 113, 176]. Geny V_β

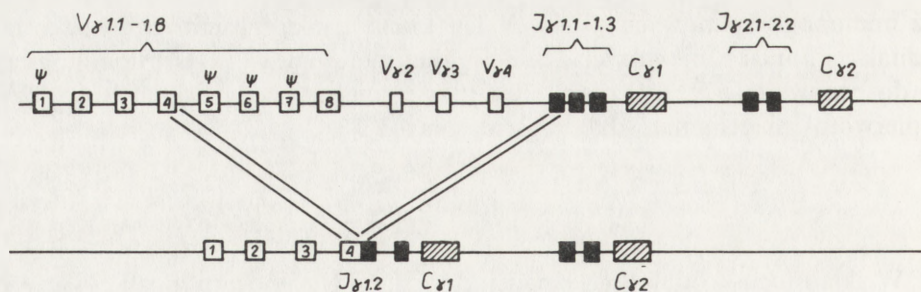


Ryc. 7. Budowa i rekombinacja genów kodujących łańcuch β

występują w mniejszej liczbie kopii niż V_α ; ich liczba najprawdopodobniej nie przekracza 40 [54]. Geny V_β podzielono na rodziny, których członkowie mogą się wzajemnie przeplatać [94, 95, 164]. Podobnie jak w przypadku genów V_α , homologie między różnymi V_β są niższe niż między immunoglobulinowymi genami V [69]. W kierunku 3' do genów V_β znajdują się 2 skupiska genów D_β - J_β - C_β [26, 69, 144]. Każde z nich zawiera gen D i 7 genów J. Mimo obecności dwóch genów C istnieje tylko jeden izotyp łańcucha β , ponieważ geny $C_{\beta 1}$ i $C_{\beta 2}$ są ściśle do siebie homologiczne (na poziomie białka odkryto jedynie różnicę czterech aminokwasów w ostatnim egzonie) [54]. Zwraca uwagę nietypowe ułożenie jednego z genów V ($V_{\beta 14}$) w kierunku 3' do $C_{\beta 2}$ [54, 69, 94, 144].

4.3. GENY KODUJĄCE ŁAŃCUCH γ

Budowa ludzkiego locus γ (chromosom 7p15) jest obecnie bardzo dobrze poznana (ryc. 8) [54, 68, 69, 168]. W jego skład wchodzi niewiele genów. 11 genów V_γ jest podzielonych na 4 rodziny, z których najliczniejsza $V_{\gamma 1}$ zawiera 8 genów, a pozostałe ($V_{\gamma 2}$ - $V_{\gamma 4}$) po jednym genie. Podobnie jak w loci α i β , wzajemne homologie między genami V_γ są niskie [41, 99]. Co najmniej 4 z jedenastu genów V_γ są pseudogenami [98]. Oprócz genów V, wyróżniamy

Ryc. 8. Budowa i rekombinacja genów kodujących łańcuch γ

2 skupiska genów J_γ sprzężonych z odpowiednimi genami C_γ . Łącznie jest 5 genów J_γ i 2 geny C_γ . Kierunki transkrypcyjne wszystkich genów są zgodne [168]. Mniej jasna jest budowa mysiego locus γ . Wyróżnia się co najmniej 7 genów V, 4 geny J i 4 geny C. Ich kolejność na chromosomie nie jest dokładnie znana [108].

4.4. GENY KODUJĄCE ŁAŃCUCH δ

Odkrycie genów kodujących łańcuch δ jest wynikiem prac ostatnich 2 lat [9, 15, 16, 56, 103]. Ich budowa jest bardzo słabo poznana. Wiadomo jedynie, że locus δ leży w chromosomie wewnątrz locus α [24, 56], oraz że zawiera co najmniej 2 geny D_δ , 2 geny J_δ i gen C_δ [24]. Zidentyfikowano 6 rodzin genów V_δ . Ich charakterystyczną cechą jest duża homologia (90–100%) do genów V_α [33]. Z powodu bliskości locus α nie można wykluczyć rekombinacji genów V_α dó D_δ . Jednak dotychczasowe prace nie potwierdzają tej hipotezy [33].

5. ROZWÓJ LIMFOCYTU B

W trakcie rozwoju limfocytu B następuje komórkowo swoista aktywacja genów immunoglobulinowych, co prowadzi do syntezy powierzchniowego receptora dla antygeny (IgR) [139]. Multipotencjalne komórki macierzyste (tzw. stem cells) znajdują się w wątrobie płodowej. Komórki te mają niską zawartość antygeny Thy-1 i nie mają markerów, linii mieloidalnych (GM^-), ani limfocytarnych (TB^-) [121]. Rozwiną się z nich następujące komórki:

- limfocyty B,
- limfocyty T,
- komórki mieloidalne i erytrocyty.

W pierwszym etapie rozwoju limfocytów B następuje różnicowanie się komórki macierzystej w kierunku limfocyty pre-pre-B (inna nazwa: pro-B)

[121, 156]. W komórce pro-B zachodzi pierwszy etap somatycznej rekombinacji genów immunoglobulinowych, polegający na zbliżeniu do siebie dwu dowolnych genów D_H i J_H (ryc. 3) [183]. Powstaje zrekombinowany gen D_HJ_H , po czym następuje jego transkrypcja do mRNA $DJ_C\mu$ [28, 138]. Transkrypcji mogą podlegać również nie zrekombinowane geny V_H [184]. Rola tych pierwotnych transkryptów jest nieznana [28]. Trzeba zaznaczyć, że rekombinacja D_H-J_H może zajść na jednym lub obu allelach [138]. Następnym etapem rozwojowym jest przekształcenie się komórki pre-pre-B w pre-B. W limfocycie pre-B zachodzi rekombinacja V_H do DJ_H , polegająca na zbliżeniu do siebie genów V_H i D_HJ_H . Gotowy aktywny gen $V_HD_HJ_HC\mu$ ulega transkrypcji — powstałe mRNA po obróbce polegającej na wycięciu intronów $J_H-C\mu$ i translacji daje ciężki łańcuch immunoglobulinowy μ (ryc. 3). Obecność łańcucha μ w cytoplazmie jest więc ważnym markerem pozwalającym na odróżnienie limfocyta pre-B od innych stadiów rozwojowych [147]. Komórka pre-B migruje następnie do szpiku, gdzie po rekombinacji locus κ (zbliżenie dowolnych genów V_κ i J_κ) przekształca się w niedojrzałą komórkę B (ryc. 4). Obecny w niej aktywny gen $V_\kappaJ_\kappaC_\kappa$ podlega transkrypcji i translacji, wskutek czego w cytoplazmie pojawia się lekki łańcuch κ . Dochodzi do łączenia się powstałego wcześniej łańcucha μ z lekkim łańcuchem κ . Powstaje immunoglobulina, która po przejściu przez aparat Golgiego zostaje osadzona w błonie limfocyta [61, 147]. Geny kodujące łańcuch λ rekombinują później niż geny κ (ryc. 5). Wydaje się, że geny λ mogą rekombinować tylko wtedy, gdy z jakiegoś powodu nie dojdzie do ekspresji łańcucha κ (tzw. wyłączenie izotypowe, ang. isotypic exclusion) [85, 155]. Szansa ekspresji genów κ jest więc większa niż genów λ i dlatego większość immunoglobulin zawiera łańcuch κ [176]. Receptor powierzchniowy niedojrzałego limfocyta B jest więc najczęściej immunoglobuliną klasy IgM, zawierającą lekki łańcuch κ . W trakcie dojrzewania komórki B następuje koekspresja IgM/IgD o jednakowych właściwościach. Taka zmiana izotypu IgR nazwana została przełączeniem klas (ang. class switching) [160]. W przypadku dziewiczych limfocytów B polega ono na odpowiedniej obróbce mRNA przepisanego z genów $V_HD_HJ_H-C\mu-C_\delta$ (ryc. 3). W wycięcia RNA między przepisany genami $V_HD_HJ_H$, a C_δ , powstaje mRNA kodujący łańcuch δ . Gdy zaś eliminacji ulegnie RNA odpowiadający genowi C_δ , po translacji utworzony zostanie łańcuch μ [114, 160].

Dojrzałe dziewicze limfocyty B, mające powierzchniowe receptory dla antygenów, opuszczają szpik i zasiedlają obwodowe narządy limfatyczne.

6. ROZWÓJ LIMFOCYTÓW T

Różnicowanie komórek T zachodzi głównie w grasicy [172, 181]. Nie jest jednak wykluczone, że poza nią może dojrzewać pewien niewielki procent

limfocytów T [23, 46, 106]. Grasicca składa się z tymocytów, czyli różnicujących się niedojrzałych limfocytów T oraz z komórek zrębu. Istnieją 4 najważniejsze populacje komórek zrębowych [126, 173]:

- komórki pochodzenia nabłonkowego – korykalne i rdzenne posiadające antygeny MHC klasy II, oraz rdzenne nie posiadające antygenów MHC klasy II;

- komórki pochodzenia szpikowego – dendrytyczne (MHC II pozytywne).

Komórki zrębu kontaktują się z tymocytami [35] oraz wydzielają substancje stymulujące ich różnicowanie [20, 72, 123], tworząc w ten sposób mikrośrodowisko pozwalające na rozwój limfocytów T.

Różnicowanie komórek T przedstawia się następująco. W płodowej wątrobie (lub w innych płodowych organach, np. pęcherzyku żółtkowym lub sieci) z komórek macierzystych (stem) powstaje protymocyt – komórka prekursorowa dla limfocytów T [49, 121, 181]. Protymocyty migrują do grasicy, gdzie osiedlają się w jej części korowej [159]. Tam też następuje rekombinacja genów γ i δ (ryc. 8) oraz ich ekspresja [24, 41, 67, 129, 165, 188]. Powstają komórki nie mające antygenów CD4 i CD8 (podwójnie negatywne – ang. double negative) [67]. Jeżeli rekombinacja genów γ i δ jest produktywna, to zostaje utworzony funkcjonalny TCR γ/δ CD3⁺ [10, 13, 19, 129, 130]. Dalszy los tych komórek jest nieznan; prawdopodobnie mogą opuszczać grasicę i osiedlać się w obwodowych narządach limfatycznych [4, 24, 56, 71, 96, 129, 166], przekształcając się w komórki dendrytyczne [84, 166] lub w komórki NK [143]. Jednak wyniki ostatnich badań [24, 33] wykazują, że grasicze tymocyty TCR γ/δ ⁺CD3⁺ nie są bezpośrednimi prekursorami dojrzałych komórek TCR γ/δ ⁺. Natomiast gdy rekombinacja genów γ i δ jest poronna (nie tworzy się funkcjonalny TCR γ/δ), tor rozwojowy jest inny. Wygasa stopniowo transkrypcja genów γ i δ [24, 165], a locus δ jest usuwany z genomu.

Rekombinacji podlega locus β (ryc. 7). Początkowo jest to rekombinacja D_β do J_β [17, 91], a następnie V_β do $D_\beta J_\beta$ [109]. Powstaje komórka produkująca łańcuch β [52]. Przez analogię do limfocytu pre-B, syntetyzującego immunoglobulinowy łańcuch ciężki μ , nazwano ją limfocytym pre-T. W następnej kolejności rekombinuje locus α (ryc. 6), powstaje łańcuch α , który wraz z łańcuchem β tworzy dimer TCR α/β [4, 52, 165]. Na tym etapie komórki T mają fenotyp CD3⁺4⁺8⁺ TCR α/β ⁺ (są to tzw. komórki podwójnie pozytywne – ang. double positive), które nabywają tolerancję w stosunku do autologicznych antygenów MHC (ang. thymus education) [44]. Elementami odpowiedzialnymi za ten proces są zapewne komórki dendrytyczne oraz w pewnych wypadkach epitelialne komórki zrębu [92, 127, 128, 146].

Ostatecznie grasicę opuszczają następujące podstawowe typy komórek T:

- 1) CD3⁺4⁺8⁻ TCR α/β ⁺, specyficzne w stosunku do MHC klasy II (w większości są to pomocnicze limfocyty T);
- 2) CD3⁺4⁻8⁺ TCR α/β ⁺, specyficzne w stosunku do MHC klasy I (głównie cytotoksyczne limfocyty T);

3) komórki posiadające TCR γ/δ :

a) komórki dendrytyczne CD4⁻CD8⁻,

b) komórki „somatyczne” CD4⁻CD8⁻ znajdujące we krwi i narządach chłonnych,

c) komórki śródnabłonkowe jelita CD4⁻CD8⁺.

Komórki te różnią się typem powierzchniowego receptora oraz rodzajem restrykcji MHC. Nie wiadomo jednak, jaka jest przyczyna wyraźnych różnic w MHC restrykcji, wiadomo, że zarówno komórki wykazujące restrykcję w stosunku do MHC I, jak i MHC II mogą używać tych samych genów V α i V β [51, 91, 149]. Jeszcze większą zagadką jest receptor supresorowych limfocytów T, u których często nie dochodzi do ekspresji genów β , a więc nie tworzy się zapewne TCR α/β [91, 144]. Budowa receptora limfocytów supresorowych nie jest znana [176].

Przedstawiony schemat rozwoju limfocytów T jest tylko jednym z wielu możliwych, ponieważ biorąc pod uwagę wysoką dynamikę populacji tymocytów bardzo trudno jest podać spójny model różnicowania grasiczego. Każdej doby ginie i odnawia się około 30% populacji tymocytów; nie jest więc wykluczone, że w danym momencie w grasicy jest realizowanych równolegle wiele różnych programów rozwojowych [24, 52].

7. MECHANIZMY REKOMBINACJI V(D)J

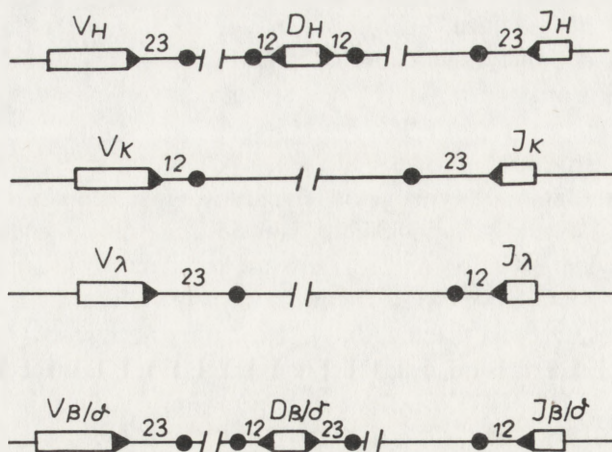
7.1. SEKWENCJE SYGNAŁOWE

Rekombinacja genów kodujących IgR i TCR jest procesem enzymatycznym. Limfocyty B i T zawierają bowiem enzym — rekombinazę, najprawdopodobniej o identycznych właściwościach w obu tych komórkach [48, 54, 185]. Chociaż nie jest znana struktura molekularna rekombinazy, to jednak wiele wiadomo o jej podstawowych aktywnościach. Jedną z nich jest aktywność przyczepu; rekombinaza jest zdolna do rozpoznawania i przyczepiania się do pewnych sekwencji DNA, ograniczających rekombinowane geny. Do sekwencji tych (ang. flanking sequences) zaliczamy:

— heptamery — 7-nukleotydowe sekwencje o odwróconej symetrii (palindromowe) CACAGTG, położone na 3' końcach genów V, końcach 3' i 5' genów D i końcach 5' genów J [29, 66, 98, 134, 171, 182]; dodatkowo odkryte zostały heptamery wewnętrzne, znajdujące się w obrębie ok. 70% genów V_H [5, 81, 140];

— nonamery — 9-nukleotydowe sekwencje ACA₅C₂, zlokalizowane dystalnie do heptameru [66, 98, 134, 171, 182] (ryc. 9).

Heptamery i nonamery mogących z sobą rekombinować genów są do siebie wzajemnie komplementarne, np. heptamery i nonamery genów V_H są kom-



Ryc. 9. Sekwencje sygnałowe. Zaczerniony trójkąt oznacza heptamer (CACAGTG), kółko – nonamer (ACA_5C_2); 23 – wstawka długości 23 ± 1 bp; 12 – wstawka długości 12 ± 1 bp

plementarne do heptamerów i nonamerów na 5' końcach segmentów D_H . Między heptamerami i nonamerami znajdują się wstawki (ang. spacers) długości bądź 23 ± 1 bp bądź 12 ± 1 bp (ryc. 9). Rekombinacja między dwoma segmentami zachodzi tylko wtedy, gdy mają one wzajemnie komplementarne heptamery i nonamery oraz różnej długości wstawki (reguła 12/23) [66, 171]. Wstawki różnej długości zapewniają ułożenie heptamerów i nonamerów po tej samej stronie spirali DNA, ponieważ 12 parom zasad odpowiada jeden skręt helisy, a 23 parom zasad – dwa skręty [176]. Przymuszczalnie unilateralne położenie sekwencji sygnałowych jest warunkiem ich rozpoznania przez rekombinazę. Dzięki regule 12/23 można więc przewidzieć, które grupy genów mogą wzajemnie rekombinować. Na przykład w locus H rekombinacja jest możliwa między genami V_H i D_H oraz D_H i J_H , a zabroniona między V_H i J_H , ponieważ sekwencje sygnałowe zarówno V_H , jak i J_H mają wstawki identycznej długości (23 ± 1 bp) (ryc. 9) [5, 66, 144, 171]. Zupełnie inna sytuacja występuje w obrębie locus β i δ . Tutaj ułożenie wstawek jest takie, że możliwe są zarówno klasyczne rekombinacje V do D do J, jak i rzadziej spotykane V–J, D–D, J–J [24, 149, 164] (ryc. 9).

Wydaje się, że heptamery, nonamery oraz wstawki są jedynymi sekwencjami rozpoznawanymi przez rekombinazę. Jeżeli bowiem do limfocytu zostanie wprowadzony plazmid, na którym znajdują się dowolne geny nie immunoglobulinowe mające na swoich końcach sekwencje sygnałowe, to geny te ulegną rekombinacji [62]. Oczywiście jest więc, że rekombinaza rozpoznaje jedynie sekwencje sygnałowe, a nie rodzaj rekombinowanych genów [2, 34]. Odkrycie to umożliwiło izolację białka limfocytarnego, które ma dużą aktywność selektywnego przyczepu do heptameru, natomiast jego powinowactwo do

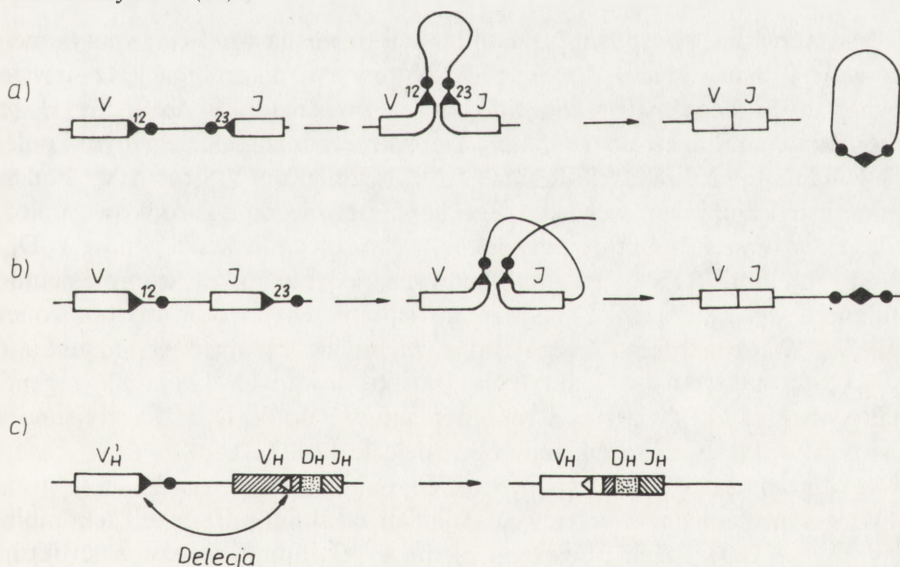
nonameru jest niewielkie [1]. Wydaje się, że jest to jedna z podjednostek rekombinazy, ponieważ z badań eksperymentalnych wiadomo, że rozpoznanie nonameru nie jest niezbędne w procesie somatycznej rekombinacji [32, 64, 81, 140, 162].

Obecnie wyróżniamy następujące podstawowe mechanizmy somatycznej rekombinacji: poprzez inwersję i przez delecję [8, 112, 125]. Jednak dane dwa segmenty nie mogą ze sobą rekombinować na oba sposoby, ponieważ warunkiem zajścia inwersji są przeciwne kierunki transkrypcyjne obu genów, natomiast w wypadku delecji kierunki te muszą być zgodne.

7.2. REKOMBINACJA PRZEZ DELECJĘ

Jest to najbardziej częsty sposób rekombinacji zarówno genów immunoglobulinowych [8], jak i TCR [38, 125]. Kolejne etapy przedstawione są na ryc. 10a. W pierwszym stadium następuje wypętlenie odcinka DNA między mającymi ze sobą rekombinować genami. Pętla jest stabilizowana przez wzajemną komplementację heptamerów i nonamerów. Kompleks rekombinazy rozpoznaje komplementarne sekwencje sygnałowe, nacina łańcuchy DNA na złączy gen strukturalny-heptamer, po czym następuje ligacja powstałych wolnych końców. Powstają dwa rodzaje złączy:

– złącze kodujące (ang. coding joint) między zrekombinowanymi genami strukturalnymi V(D)J;



Ryc. 10 a) rekombinacja przez delecję; b) rekombinacja przez inwersję; c) rekombinacja przy użyciu wewnętrznego heptameru. Jasny trójkąt symbolizuje heptamer wewnętrzny, pozostałe oznaczenia jak na ryc. 9

– złącze wzajemne (ang. reciprocal joint) między heptamerami wchodzącymi w skład sekwencji sygnałowych.

Charakterystyczną cechą rekombinacji przez wypełnienie jest powstanie krótko żyjącego kolistego DNA zawierającego połączone sekwencje sygnałowe. Udało się wykazać istnienie takiego kolistego DNA w jądrze limfocytu T. Jest to bezpośredni dowód rekombinacji przez delecję [38, 125]. Jednak już sama analiza kierunków transkrypcyjnych genów sugeruje rozpowszechnianie mechanizmu delecyjnego we wszystkich loci Ig i TCR.

7.3. REKOMBINACJA PRZEZ INWERSJĘ

Inwersja jest zjawiskiem rzadszym od delecji [62]. Występuje jedynie w stosunku do genów o przeciwnych kierunkach transkrypcyjnych (ryc. 10b). Nie znamy względnych orientacji wszystkich genów IgR i TCR. Wiadomo jednak, że co najmniej w loci β , κ i TCR δ [82, 104, 112] istnieją geny o przeciwnych kierunkach transkrypcyjnych. Udało się również eksperymentalnie wywołać rekombinację przez inwersję na plazmidzie zawierającym geny V_x i J_x ułożone w stosunku do siebie w odwrotnych kierunkach transkrypcyjnych [100].

7.4. REKOMBINACJA Z UŻYCIEM WEWNĘTRZNYCH HEPTAMERÓW

Przedstawione już sposoby rekombinacji (inwersja i delecja) spotykane są zarówno w limfocytach B, jak i T. Natomiast rekombinację z użyciem wewnętrznych heptamerów opisano jedynie w stosunku do locus H [5]. Rekombinacja taka jest oparta najczęściej na mechanizmie delecyjnym i polega na wymianie uprzednio zrekombinowanych segmentów V_H (ryc. 10c). Podczas rekombinacji z użyciem wewnętrznego heptameru jeden z zarodkowo położonych genów V_H rekombinuje z genem V_H wchodzącym w skład genów $V_H D_H J_H$ [81, 140]. Pętla DNA jest stabilizowana jedynie przez komplementację heptameru wewnętrznego z klasycznym heptamerem zarodkowo położonego genu V_H . Wtórne rekombinacje mogą zachodzić zarówno w stosunku do $V_H D_H J_H$ produktywnych i aktywnie transkrybowanych [81], jak i genów nieaktywnych [140]. Częstości rekombinacji V_H do $V_H D_H J_H$ są zbliżone do częstości zwykłych rekombinacji przez delecję [140].

Rekombinacja V_H do $V_H D_H J_H$ ma co najmniej dwa znaczenia:

- 1) Jest mechanizmem przeciwdziałającym skutkom poronnych rekombinacji $V_H D_H J_H$ [140]. Jeżeli przyczyna błędu w rekombinacji leży w strukturze złącza kodującego V_H-D_H lub w samym genie V_H , to wprowadzenie nowego segmentu V_H może ją usunąć [5].

- 2) Wiadomo, że do pierwotnej rekombinacji $V_H D_H J_H$ najczęściej używany

jest segment V leżący najbliżej genów J [69, 186]. Jednak badania dojrzałych limfocytów wykazują, że w skład $V_H D_H J_H$ wchodzi z równą częstością wszystkie geny V_H [158, 186]. Nie wykluczone, że właśnie rekombinacja V_H do $V_H D_H J_H$ jest jednym (choć na pewno nie jedynym) ze sposobów używanym do podniesienia różnorodności segmentów V_H w genie $V_H D_H J_H$ [5, 158]. Nie można jednak zapominać, iż w komórkach B aktywność rekombinazy jest o wiele mniejsza niż w komórkach pre-B, z czego wynika wniosek, że rekombinacje V_H do $V_H D_H J_H$ nie mogą jednakowo efektywnie zachodzić przez cały okres życia limfocytu B.

7.5. MOLEKULARNE PODSTAWY DZIAŁANIA REKOMBINAZY

7.5.1. Struktura złącza wzajemnego i kodującego

Przed rozpatrzeniem molekularnego mechanizmu działania rekombinazy niezbędne jest zapoznanie się ze zjawiskami zachodzącymi na poziomie złącza kodującego i wzajemnego. Sekwencje w złączu kodującym różnią się o kilka lub nawet kilkanaście nukleotydów od sekwencji przewidzianych na podstawie kolejności nukleotydów rekombinujących segmentów. Wyróżniamy kilka typów zmian nukleotydów na złączu kodującym:

Delecje nukleotydów, dotyczy głównie złącz $V_\alpha - J_\alpha$ i $V_\lambda - J_\lambda$ [100, 171].

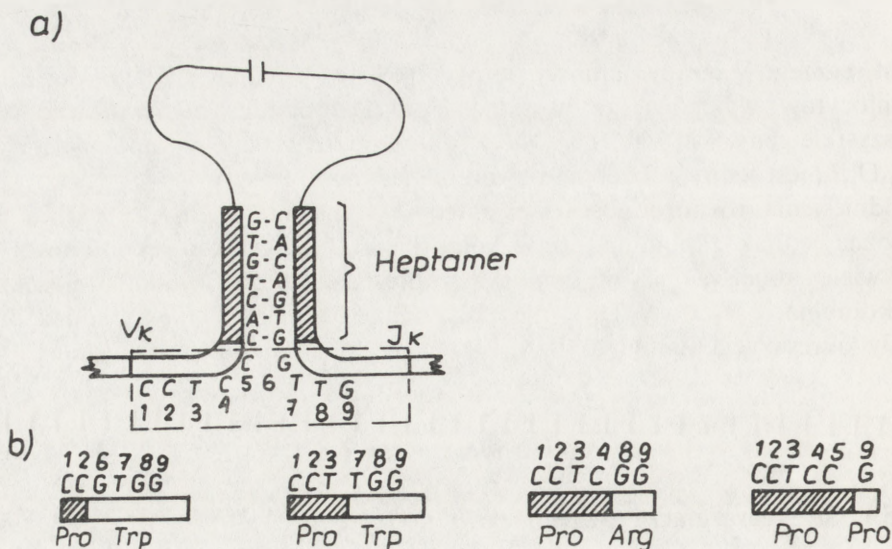
Insercje nukleotydów nie wchodzących w skład rekombinujących segmentów. Powstają tzw. regiony N (z ang. new) obserwowane na granicy zrekombinowanych genów z loci H i genów TCR [7, 36, 51, 66, 98, 100, 134, 171, 182].

Niedokładne łączenie segmentów V(D)J stwarza wrażenie nieściśłego rozpoznawania granic rekombinowanych genów przez rekombinazę. Zjawisko to opisano zarówno dla genów immunoglobulinowych [80, 133, 147, 171], jak i dla genów TCR α , β i γ [7, 36, 51, 98, 134, 182] (ryc. 11).

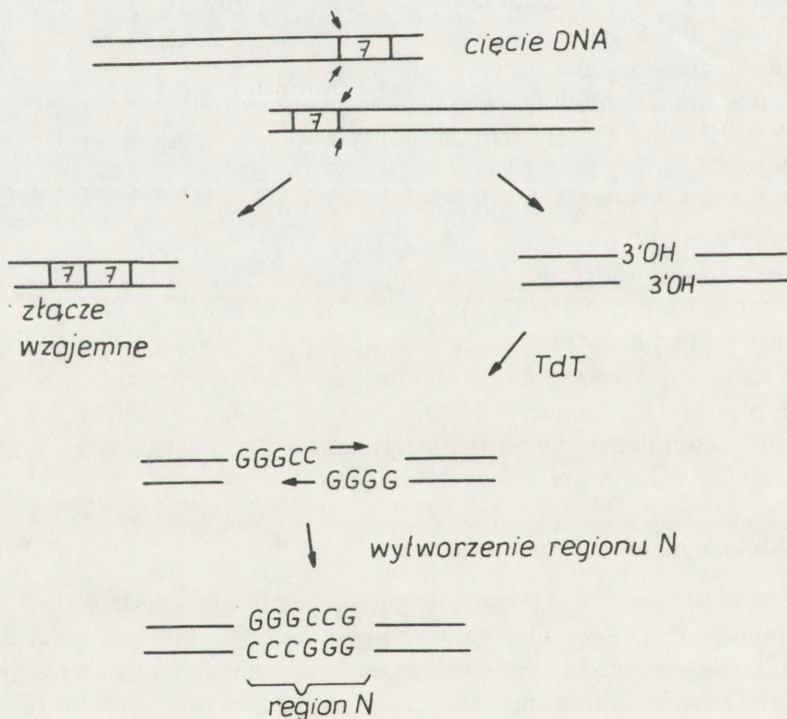
Złącze wzajemne, w przeciwieństwie do złącza kodującego, nie jest zmienne, co oznacza, że sekwencja nukleotydów na złączu jest prostą sumą sekwencji tworzących go heptamerów [100]. Wszystkie próby konstrukcji modelu działania rekombinazy muszą tłumaczyć fakt stałości złącza wzajemnego przy równoczesnej zmienności złącza kodującego.

7.5.2. Modele działania rekombinazy

Obecnie istnieją dwa podstawowe modele opisujące mechanizmy działania rekombinazy. Pierwszy z nich to model podany przez Alta i Baltimore'a [171] (ryc. 12). Rekombinaza po rozpoznaniu sekwencji sygnałowych przecina łańcuchy DNA na granicy heptamerów i genów strukturalnych V(D)J. Następnie dochodzi do szybkiej ligacji heptamerów (stąd stałość złącza wzajemnego).



Ryc. 11. Przykład ilustrujący mechanizm tworzenia zmienności na złączu kodującym V_x-J_x; a) delecyjna rekombinacja V-J. Zaznaczono komplementarne heptamery. Rekombinaza przecina DNA między dowolnymi nukleotydami 1-9; b) wynik zmienności na złączach V-J — dwa identyczne rekombinujące geny mogą wytworzyć różne sekwencje nukleotydów i aminokwasów w regionie CDR3 łańcucha immunoglobulinowego



Ryc. 12. Model rekombinacji według Alta i Baltimore'a. Strzałki oznaczają miejsca przecięcia DNA

Natomiast wolne końce genów strukturalnych nie są łączone, lecz trawione przez egzonukleazę. Tworzy się szczelina między rekombinującymi genami, która umożliwia syntezę regionu N. Enzymem odpowiedzialnym za utworzenie regionu N jest terminalna transferaza dezoksyrybonukleotydowa (TdT), której aktywność wykazano w kortykalnych tymocytach i komórkach pre-B [93, 171]. Jak wykazały badania biochemiczne, TdT jest zdolna do bezmatrycowego dodawania nukleotydów do 3'OH końca DNA. Preferencyjnymi substratami są guanina (G) i cytozyna (C) [93]. Stąd właśnie regiony N są bogate w te nukleotydy.

Podsumowując, rekombinaza w modelu Alta i Baltimore'a ma co najmniej 4 aktywności enzymatyczne [35]:

- aktywność przyczepu do sekwencji sygnałowych,
- aktywność endonukleazy,
- aktywność egzonukleazy,
- aktywność ligazy.

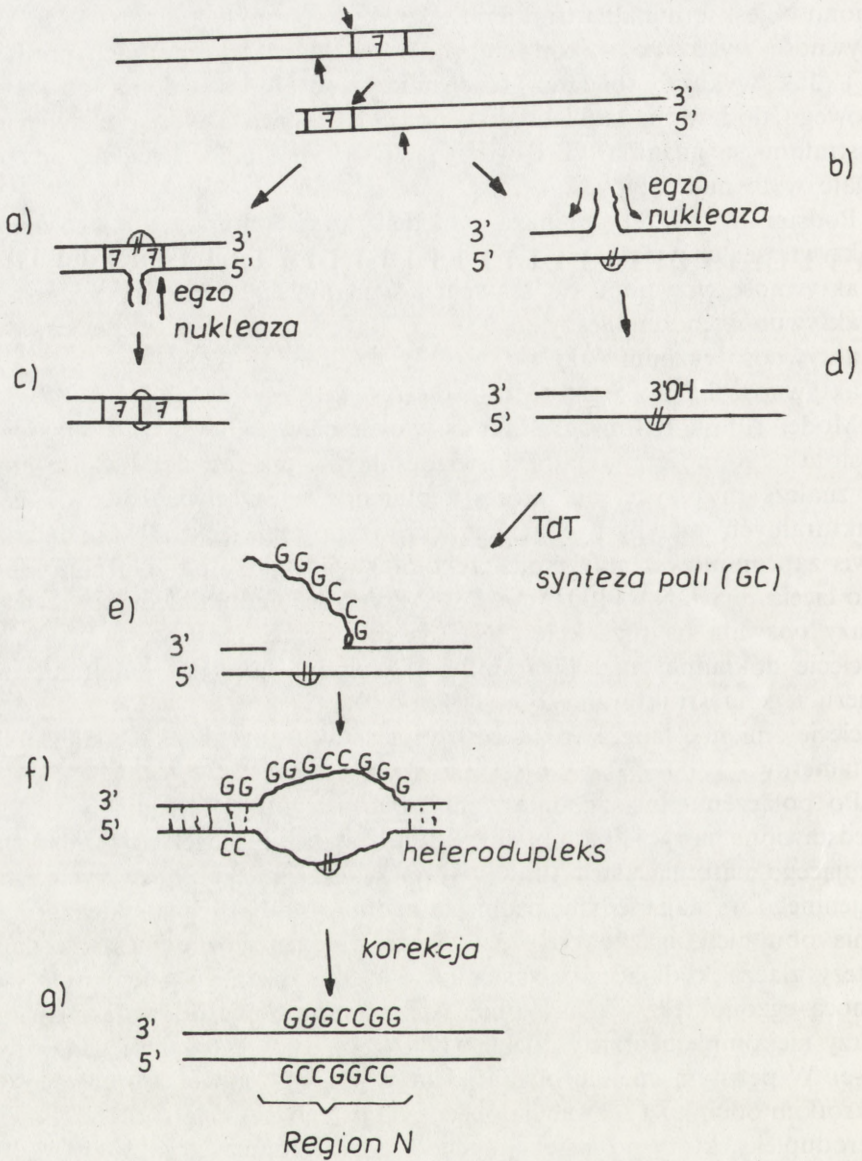
Model Alta i Baltimore'a mimo swoich niewątpliwych zalet, takich jak prostota i zgodność z faktami doświadczalnymi, ma również i wady. Trudno np. znaleźć przyczynę, dla której heptamery w przeciwieństwie do genów strukturalnych miałyby być łączone wkrótce po przecięciu DNA. Dlatego też Lewis zaproponował inny model rekombinacji, oparty na założeniu nierównego cięcia nici DNA [100] (ryc. 13). Aktywność endonukleolityczna rekombinazy pozwala na przecięcie DNA na dwa różne sposoby:

cięcie dokładne (ang. invariant cut) wprowadzane jest na granicy heptameru i genu strukturalnego,

cięcie zmienne (ang. variant cut) w pewnej niezbyt dalekiej odległości od heptamerów.

Po połączeniu nici zgodnie z ich polarnościami otrzymujemy struktury przedstawione na ryc. 13 a) i b). Struktura b) stanowi załączek przyszłego złącza kodującego, natomiast struktura a) – złącza wzajemnego. Wytworzenie złącza wzajemnego wymaga jedynie usunięcia nadmiaru DNA (egzonukleaza) i połączenia obu nici (ligaza) (ryc. 13c). Nieco bardziej złożony jest mechanizm syntezy złącza kodującego. Następuje odcięcie zbędnego odcinka DNA za pomocą egzonukleazy, a następnie TdT po przyczepie do wolnego 3'końca tworzy niekomplementarny odcinek DNA bogaty w cytozynę i guaninę (ryc. 13d-e). W pewnym miejscu oligonukleotyd poli(CG) może skomplementować na krótkim odcinku z sekwencją obecną na przeciwnej nici (ryc. 13f). Powstaje heterodupleks, który po korekcji wchodzi do regionu N (ryc. 13g) [93, 100].

Dzięki modelowi Lewisa łatwo wytłumaczyć brak regionów N na złączach segmentów $V_x - J_\lambda$, $V_\lambda - J_\lambda$ i $D_\delta - J_\delta$. Otóż nie wykryto aktywności TdT w komórkach podczas rekombinacji wymienionych genów [24, 93]. Nie mogą więc powstać regiony N; następuje zwykła ligacja struktury oznaczonej na ryc. 13 jako b), co prowadzi do delecji kilku nukleotydów ze złącza kodującego [100].



Ryc. 13. Model rekombinacji według Lewisa

Model Lewisa w oczywisty sposób tłumaczy również mechanizm powstawania niedokładności rekombinacyjnych na złączach V-D-J.

8. MECHANIZMY PROWADZĄCE DO ZMIENNOŚCI Ig I TCR

8.1. ŹRÓDŁA ZMIENNOŚCI Ig I TCR

Komórki B i T dysponują wieloma sposobami służącymi do zwiększenia różnorodności powierzchniowych receptorów dla antygeny. Istnieją następujące podstawowe źródła zmienności Ig i TCR [119]:

1) zmienność wynikająca z obecności wielu genów V(D)J (im więcej wariantów V, D i J, tym większa różnorodność zrekombinowanego genu V(D)J) (ang. germline diversity);

2) zmienność kombinacyjna (ang. combinatorial diversity) – łańcuchy lekkie i ciężkie mogą się dowolnie łączyć, tworząc wiele rodzajów Ig o różnych swoistościach, oraz dowolność w łączeniu się genów V(D)J w procesie somatycznej rekombinacji;

3) zmienność na złączach V-J, V-D i D-J;

4) mutacje somatyczne i konwersje genów¹.

8.2. MUTACJE SOMATYCZNE

Obecnie jest niemal pewne, że limfocyty B mają o wiele wyższy poziom mutacji niż inne komórki somatyczne (np. fibroblasty) [3, 43, 115, 116, 161, 171]. I tak na przykład o ile częstość mutacji w fibroblastach ocenia się na ok. 10^{-9} /bp/ generację, o tyle minimalna częstość mutacji w komórkach B wynosi 10^{-5} /bp/ generację, czyli co najmniej 10 000 razy więcej [154]. Owa częstość mutacji jest wartością zmienną w poszczególnych stadiach rozwojowych limfocyty B. Wydaje się, że komórki pre-B, spoczynkowe komórki B oraz limfocyty B, uczestniczące w pierwotnej odpowiedzi immunologicznej, mają częstość mutacji równą ok. 10^{-5} /bp/ generację [3, 116, 154, 161, 174]. Natomiast komórki B, będące komórkami pamięci immunologicznej, mutują z częstością wyższą 10^{-3} /bp/ generację [3, 161]. Sytuacja ulega zmianie w trakcie wtórnej odpowiedzi immunologicznej; pobudzone komórki pamięci powracają do niższych wartości mutacji, tzn. 10^{-5} /bp/ generację. Natomiast w komórkach plazmatycznych, produkujących duże ilości wolnych immuno-

¹ Mutacje somatyczne mają znaczenie jedynie w zwiększaniu różnorodności immunoglobulin; nie dotyczą one TCR.

globulin, mutacje ulegają wygaszeniu do poziomu podstawowego (10^{-9} /bp/ generację) [3, 161].

Opisany tu rozkład częstości mutacji jest korzystny dla organizmu [3]. Częstość 10^{-5} /bp/ generację nie powoduje zbyt dużego obumierania limfocytów B (trzeba pamiętać, że co najmniej 25% mutacji to mutacje letalne), a jednocześnie pozwala na znaczne zwiększenie różnorodności powierzchniowych Ig. Oczywiście jest, że zbyt wysoki poziom mutacji nie powodowałby wzrostu różnorodności przeciwciał. Przeciwnie, z powodu dużej śmiertelności prekursorów limfocytów B liczba wariantów Ig uległaby znacznemu obniżeniu. Natomiast korzystne jest zwiększenie częstości mutacji w komórkach pamięci, ponieważ dzięki temu wzrasta różnorodność przeciwciał biorących udział we wtórnej odpowiedzi immunologicznej [3, 47].

Molekularny mechanizm mutagenyzy w limfocytach B jest nieznan. Proponowane są dwa rozwiązania:

- 1) w komórce B istnieje specyficzny aparat enzymatyczny, wprowadzający mutacje do genów immunoglobulinowych;
- 2) komórka B wyposażona jest w polimerazę DNA nie posiadającą właściwości naprawczych (ang. error-prone polymerase), co powoduje zwiększenie liczby mutacji po każdej rundzie replikacyjnej.

Do prawidłowej oceny obu modeli niezbędne jest zapoznanie się z pewnymi właściwościami mutacji somatycznych w komórkach B. Po pierwsze nie ulega wątpliwości, że błędne jest wiązanie wzrostu poziomu mutacji ze zjawiskiem zmiany klas (ang. class switching) w trakcie wtórnej odpowiedzi immunologicznej [3, 43, 148, 154, 161]. Po drugie mutacje bardzo często zachodzą w stosunku do puryn na nici sensownej DNA [66] oraz są skupione w okolicach kodujących regiony CDR [27, 115, 171]. Niestety, takie rozkłady mutacji nie są potwierdzane przez innych autorów, którzy obserwowali jednakową liczbę mutacji zarówno w regionach CDR, jak i FR [147, 152]. Obecnie uważa się, że wzrost liczby mutacji w regionach CDR jest wynikiem selekcji w trakcie odpowiedzi immunologicznej, ponieważ zaobserwowano, że tzw. mutacje ciche (ang. silent mutations) dotyczą z tą samą częstością zarówno regionów CDR, jak i FR. Natomiast pewne jest, że mutacje skupione są głównie w zrekombinowanych genach VDJ, brak ich w segmentach C_H i C_L [3, 27, 147, 151, 152, 161, 171]. Fakty te podważają słuszność hipotezy zakładającej obecność polimerazy DNA nie mającej właściwości naprawczych, ponieważ przy braku dodatkowych ograniczeń taka polimeraza powinna wprowadzać mutacje na całej długości genu V(D)JC. Ponadto można by się spodziewać wzrostu poziomu mutacji wraz ze wzrostem podziałów komórki. Taka zależność jednak nie występuje; częstość mutacji mało aktywnych mitotycznie komórek pamięci jest przecież wyższa niż intensywnie się dzielących limfocytów pre-B. Model nienaprawczej polimerazy nie tłumaczy też przyczyny włączania mutagenyzy po rekombinacji VDJ. Wiadomo, że częstość

zrekombinowanych genów VDJ jest wielokrotnie wyższa niż ich odpowiedników w położeniu zarodkowym. Okazało się jednak, że sam akt rekombinacji nie jest potrzebny do aktywacji mechanizmu wprowadzającego mutacje [122]. Ponadto wykazano, że dla ukierunkowania mutacji w stosunku do genów VDJ nie jest wymagany kontekst chromatyny [122]. Co jest więc czynnikiem powodującym skupianie się mutacji w obrębie części zmiennych? Zaproponowano, że poziom mutacji w zrekombinowanych genach VDJ zależy od stopnia ich metylacji. W obrębie genów VDJ istnieją obszary o szczególnie wysokim poziomie mutacji (tzw. hot spots). W tych obszarach najczęstszymi mutacjami były punktowe zmiany cytozyny w tymidynę oraz guaniny w adeninę. Wiadomo, że w genomach *Eucaryota* cytozyna często ulega metylacji z wytworzeniem 5-metylocytozyny. Po jej dezaminacji powstaje tymidyna, natomiast po replikacji na nici komplementarnej otrzymamy mutację guaniny do cytozyny. W ten właśnie sposób autorzy tłumaczą powstawanie zaobserwowanych mutacji. Inni autorzy postulują istnienie odpowiedniego enzymu zdolnego do indukcji mutacji i rozpoznającego pewne sekwencje DNA genów immunoglobulinowych. Istnienie takiego enzymu nie zostało dotychczas potwierdzone. Należy dodać, że nie znaleziono hipermutacji w stosunku do genów kodujących receptor limfocytów T [7, 24, 29, 33, 36, 57, 98].

8.3. KONWERSJE GENÓW

Konwersja genów jest procesem, dzięki któremu następuje przeniesienie pewnej sekwencji DNA z genu D (donorowego) na gen A (akceptorowy) w taki sposób, że gen D nie ulega zmianie [86]. Konwersja nie może zachodzić między dwoma dowolnymi genami; warunkiem jest częściowa choćby homologia między genami A i D [86]. Po raz pierwszy konwersja została odkryta u workowców, ale okazało się, że może ona zachodzić również i u organizmów wyższych [37, 50]. Konwersja genów szczególnie często zachodzi między genami należącymi do rodziny wielogenowej (ang. multigene family) [31], ponieważ w obrębie takiej rodziny obserwuje się zwykle wysokie homologie między genami wchodzącymi w jej skład [31, 86]. U człowieka wyróżniono wiele rodzin wielogenowych. Jedną z nich tworzy pula genów immunoglobulinowych i genów TCR. Homologia między tymi genami jest wysoka, bo aż 20–70% [29, 59, 74]. Istnieją więc teoretyczne warunki do konwersji genów. Intensywne poszukiwania przykładów konwersji u człowieka nie dały jednoznacznych rezultatów; opisano zaledwie jeden przypadek, w którym gen D_H był genem donorowym, a gen V_x akceptorem [22]. Można więc przyjąć, że konwersja genów w obrębie loci Ig i TCR u człowieka, mimo iż teoretycznie możliwa, jest dość rzadkim procesem. Natomiast doskonale udokumentowanym modelem konwersji genów jest immunoglobulinowy locus λ kurczaka

[142, 170]. Ptak ów ma unikatową budowę locus λ , ponieważ składa się ono tylko z trzech genów: V, J i C [141]. Jednak różnorodność łańcuchów λ kurczaka jest tak wysoka, że nie może być jedynie wynikiem zmian na złączach V_{λ} - J_{λ} [110, 141]. Okazało się, że głównym mechanizmem generowania zmienności łańcuchów λ są konwersje genów. Genami donorowymi są pseudogeny V_{λ} , których skupisko znajduje się w kierunku 5' do czynnego genu V_{λ} [141]. Pseudogeny V_{λ} utraciły zdolność do rekombinacji z genem J, ale zachowanie dużej homologii w stosunku do genów V_{λ} umożliwia częste i wielokrotne konwersje ψV_{λ} do V_{λ} [142]. Nigdy nie znaleziono konwersji między ψV_{λ} a V_{λ} w położeniu zarodkowym [170]. Sytuacja przypomina nieco mutacje genów immunoglobulinowych, które zachodzą jedynie w obrębie zrekombinowanych genów VDJ. Być może jest to kwestia stopnia otwartości chromatyny – V_{λ} w położeniu zarodkowym wchodzi w skład chromatyny zamkniętej, która po rekombinacji ulega aktywacji i otwarciu [110]. Dopiero do takiej otwartej chromatyny miałyby dostęp enzymy powodujące konwersję.

Wykorzystanie konwersji do podniesienia różnorodności genów ma miejsce również u organizmów niższych. Na przykład konwersje genów u bakterii *Neisseria* bardzo przypominają analogiczny proces w locus λ kurczaka [117]. *Neisseria* poprzez konwersje między pulą pseudogenów a genem kodującym antygeny „pilin” podnosi znacznie ich różnorodność [18, 117]. Pozwala to na częstą zmianę obrazu antygenowego bakterii. Mechanizm generowania zmienności antygenowej drobnoustrojów poprzez konwersję jest bardzo rozpowszechniony; oprócz *Neisseria* dobrym przykładem jest *Trypanosoma* sp., *Borrelia* sp. i inne [18].

8.4. ZAKRES ZMIENNOŚCI Ig I TCR

Znając główne mechanizmy dywersyfikacji immunoglobulin, można obliczyć zakres ich różnorodności [66]. Niewątpliwie największą zmiennością dysponuje immunoglobulinowy łańcuch ciężki, z powodu dużej liczby kodujących segmentów (kilka tysięcy V, 10–20 D, 4 J) oraz znacznej zmienności na złączach (regiony N, niedokładności rekombinacyjne). W nieco mniejszej liczbie wariantów występuje łańcuch κ , najmniej zaś różnorodny jest łańcuch λ [66]. Stosunkowo niska zmienność łańcuchów lekkich wynika z małej liczby genów V, nieobecności genów D oraz braku sekwencji N na złączach V–J. Ostatecznie przyjmuje się, że maksymalny zakres zmienności immunoglobulin wynosi ok. 10^{10} – 10^{11} różnych wariantów (tzw. repertuar potencjalny – ang. potential repertoire) [47]. Natomiast liczba wariantów faktycznie znajdowanych u danego osobnika jest oczywiście nieco niższa i wynosi około 10^8 (ang. available repertoire) [47]. Wartości te dotyczą organizmu dojrzałego; u płodów i noworodków sytuacja kształtuje się zupełnie inaczej. Otóż okazało się, że podczas rozwoju układu immunologicznego pewne układy genów V–(D)–J

pojawiają się z o wiele większą częstością niż inne. Można to wytłumaczyć zjawiskiem preferencyjnego używania do rekombinacji najbardziej proksymalnych segmentów V. Proces ten prowadzi do ograniczenia liczby wariantów immunoglobulin [158]. Dopiero później zmienność Ig znacznie wzrasta [158], co jest prawdopodobnie wynikiem wtórnych rekombinacji V_H do $V_H D_H J_H$ (rozdz. 7.4). Podobne zjawisko odkryto w przypadku genów V_γ : w trakcie rozwoju w grasicy najpierw ulegają ekspresji geny $V_\gamma 3$, a dopiero później inne geny V_γ .

Zakres zmienności $TCR\alpha/\beta$ jest trudny do określenia [113, 176]. Bardziej różnorodny, jak się wydaje, jest łańcuch α [7], ponieważ ma wiele segmentów V_α i J_α oraz wykazuje dużą zmienność na złączach V–J (niedokładności rekombinacyjne, regiony N) [7, 182]. Ponadto istnieje unikatowy typ zmienności w locus α , polegający na heterogenności końców 3' J_α [7, 182] (inne geny J_α są heterogenne jedynie na końcach 5'). Zmienność łańcucha β , pomimo obecności kodujących segmentów D_β , jest nieco mniejsza niż łańcucha α . Szczególną rolę w generowaniu zmienności łańcucha β odgrywają zmiany na złączach V–D i D–J, ponieważ geny D_β mogą wykorzystywać wszystkie 3 ramki odczytu (ang. reading frames) [36, 51, 176]. Umożliwia to bezkarną zmienność na złączach, ponieważ poważne nawet delecje czy insercje nukleotydów nie mogą zaburzyć fazy odczytu genu $V_\beta D_\beta J_\beta$. Zupełnie inaczej jest w przypadku genów D_H , które podlegają transkrypcji i translacji tylko w jednej ramce odczytu. Stosunkowo duża liczba poronnych rekombinacji $V_H-D_H-J_H$ (ok. 80%) wynika z faktu, że każda delecja czy insercja zaburzająca fazę odczytywania będzie prowadziła do dezaktywacji genu VDJ [11, 47, 66, 171, 176]. Potencjalny repertuar $TCR\alpha/\beta$ ocenia się na ok. 10^{15} .

Mechanizmem ograniczającym różnorodność TCR jest selekcja grasicza. Jedynie niewielka część z ogólnej puli wytworzonych wariantów receptorów limfocytów T jest wykorzystywana przez organizm. W grasicy następuje eliminacja tych tymocytów, których receptory powierzchniowe wykazują duże powinowactwo do własnych nie zmienionych antygenów MHC (tzw. selekcja negatywna) [29, 79, 107]. Wyróżniamy też selekcję pozytywną; na obwód przechodzą tylko te komórki T, które mają odpowiednio małe powinowactwo do własnych antygenów zgodności tkankowej, co umożliwia restrykcję MHC w trakcie odpowiedzi immunologicznej [146]. Tak więc proces selekcji grasiczej przyczynia się do obniżenia dostępnego repertuaru TCR (available repertoire), nie wpływając oczywiście na repertuar potencjalny (potential repertoire).

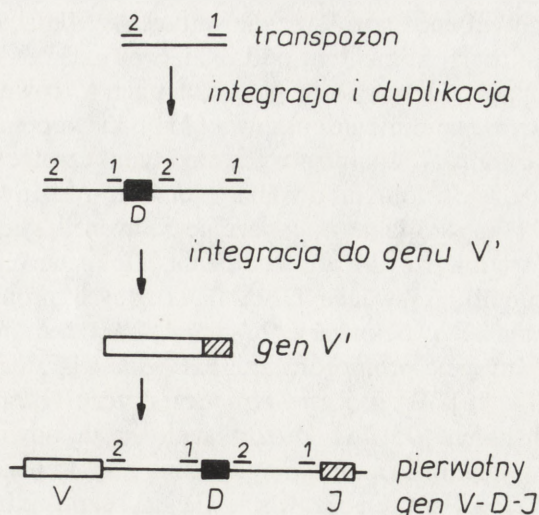
Dane określające zakres różnorodności $TCR\gamma/\delta$ są sprzeczne. Wiadomo, że łańcuchy γ znajdujące w tymocytach mają bardzo ograniczoną zmienność, głównie z powodu niskiej liczby genów V i J [60, 98, 134, 145]. Podstawowym sposobem generowania różnorodności są zmienności na złączach, a stąd z kolei duża liczba poronnych rekombinacji $V_\gamma-J_\gamma$ [54, 89, 134, 137, 150, 188].

Podobnie i zmienność łańcucha δ znajdowanego w tymocytach jest bardzo niska. Jest to zrozumiałe, biorąc pod uwagę niewielką liczbę genów V_δ , J_δ i D_δ . Ponadto nie wykryto zmienności na złączach (brak regionów N) [24, 33]. Zakładając, że tymocyty $TCR\gamma/\delta^+$ są prekursorami obwodowych komórek mających ten receptor, do niedawna wydawało się, że zmienność $TCR\gamma/\delta$ jest bardzo niska. Pogląd ten obecnie ulega zmianie. Okazało się bowiem, że łańcuchy γ i δ znajdowane na dojrzałych komórkach są bardzo różnorodne. Szczególnie dobrze jest to widoczne na przykładzie łańcucha δ [33]. W przeciwieństwie do swego tymocytarnego odpowiednika, gen $V_\delta-D_\delta-J_\delta$ w komórkach dojrzałych ma regiony N oraz nietypowe rekombinacje genów $D_\delta-D_\delta$. Dzięki temu zmienność podniesiona zostaje do ok. 10^{13} . Biorąc pod uwagę zmienność łańcucha γ , obliczono, że $TCR\gamma/\delta$ może występować w ok. 10^{17} lub nawet 10^{18} wariantów [33]. Tak olbrzymia różnorodność z pewnością wystarczy do związania wszelkich antygenów, a więc $TCR\gamma/\delta$ może spełniać takie funkcje jak $TCR\alpha/\beta$. Należy zaznaczyć, że charakter zmienności receptora limfocytów T jest inny niż immunoglobulin. O ile bowiem zmienność Ig wynika głównie z obecności wielu genów V, D i J, o tyle zmienność w obrębie TCR jest skupiona raczej na krótkich odcinkach DNA w obrębie złącz genów. Wydaje się, że jest to odzwierciedleniem funkcji TCR, a mianowicie rozpoznawanie bardzo małych i niezwykle różnorodnych antygenów połączonych z polimorficznymi antygenami MHC.

9. EWOLUCJA GENÓW KODUJĄCYCH Ig I TCR

9.1. POWSTANIE PIERWOTNEGO GENU VDJ

Wysoka homologia między Ig a TCR zarówno na poziomie białka, jak i DNA sugeruje ich wspólne pochodzenie ewolucyjne [70, 179]. Przypuszcza się, że pierwszym etapem ewolucji genów Ig i TCR było powstanie prekursorowego genu V-D-J, mającego zdolność do rekombinacji [70, 178, 179]. Gen taki powstał prawdopodobnie w sposób przedstawiony na ryc. 14 [178]. Transpozon o niesymetrycznych odwróconych sekwencjach powtórzonych (ang. inverted repeats) integrował zapewne do genomu, duplikując tak, że między owe sekwencje powtórzone wprowadzony został odcinek DNA (w przyszłości przekształci się on w gen D). Taki złożony transpozon, zawierający pierwotny gen D, integruje po raz drugi do genu V' , dzieląc go na segmenty V i J. W ten sposób powstają pierwotne geny V-D-J. Mają one zdolność do rekombinacji, co jest uwarunkowane obecnością ograniczających sekwencji powtórzonych, będących sekwencjami sygnałowymi (przekształconych w toku ewolucji w heptamery, nonamery i wstawki). Istnieje wiele faktów potwier-



Ryc. 14. Powstanie pierwotnego genu V-D-J, 1, 2 – niesymetryczne, odwrócone sekwencje powtórzone

dzających opisany przebieg wczesnej ewolucji genów V-D-J. Jednym z nich jest odkrycie rodziny (ang. immunoglobulin superfamily) białek, których wspólnymi cechami jest: udział w kontaktach międzykomórkowych i budowa oparta na domenie immunoglobulinowej (ang. immunoglobulin homology unit) [70, 179]. Do rodziny tej, oprócz immunoglobulin i receptorów limfocytów T, zaliczamy:

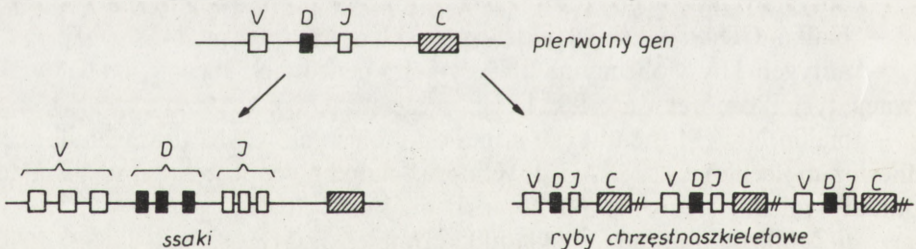
- antygeny głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC [37, 50];
- białka CD4 i CD8 wchodzące w skład kompleksu TCR [70];
- antygen Thy-1 obecny na limfocytach i neuronach, biorący udział w aktywacji tych komórek [55, 90, 157];
- białka NCAM (neural cell adhesion molecule), ICAM (intracellular cell adhesion molecule), L-1 i MAG (myelin associated glycoprotein) umożliwiające kontakty między neuronami i komórkami krwi [70, 163];
- β -2-mikroglobulinę – składnik kompleksu MHC klasy I [37, 50];
- poly-Ig – odpowiedzialną za transport immunoglobulin przez błony śluzowe [120].

Lista białek należących do rodziny immunoglobulinowej jest o wiele dłuższa. Duża homologia wewnątrz rodziny oraz wspólny schemat budowy oparty na domenie immunoglobulinowej [70, 74, 179] przemawia za hipotezą rozbieżnej ewolucji wszystkich jej członków od wspólnego genu prekursorowego [111]. Wydaje się, że tym genem prekursorowym był właśnie pierwotny gen V. Jego funkcją było zapewne kodowanie białka zapewniającego sprawną interakcję między komórkami organizmu. Przypuszcza się,

że produkt genu V' rozpoznawał własne antygeny MHC. Integracja transpozonu do genu V' była momentem oddzielającym gałąź ewolucyjną, prowadzącą do powstania genów Ig i TCR. Natomiast gen V' równolegle ewoluując dał ostatecznie rodzinę immunoglobulinową [111]. Dowodem wspólnej ewolucji TCR i IgR jest duża homologia między tymi cząsteczkami (20–40%), większa aniżeli między dowolnymi dwoma członkami rodziny immunoglobulinowej [18, 59]. Transpozonalne pochodzenie sekwencji sygnałowych genów V(D)J jest nieco trudniejsze do udowodnienia. Do pewnych wniosków doprowadzić może analiza sekwencji DNA flankujących promotor genów H1 i H2 bakterii *Salmonella*. Sekwencje te mają charakter „inverted repeats” i powodują częste inwersje promotora alternatywnie włączając lub wyłączając geny H1 i H2 [18, 76]. W procesie tym uczestniczy rekombinaza o dużej homologii do transpozaz [75, 76]. Otóż okazało się, że odwrócone sekwencje powtórzone są w wysokim stopniu homologiczne z sekwencjami sygnałowymi genów V–D–J [40, 76]. Fakt ten oczywiście nie jest bezpośrednim dowodem na transpozonalne pochodzenie sekwencji sygnałowych. Dowód wprost może dać tylko oczyszczenie i zsekwencjonowanie rekombinazy i ewentualne wykazanie jej powinowactwa do transpozaz.

9.2. DALSZĄ EWOLUCJA PIERWOTNEGO GENU V–D–J

Ewolucja pierwotnego genu V–D–J polegała głównie na zwielokrotnieniu liczby segmentów V, D i J. Dowiedziono, że w trakcie ewolucji pojawiły się dwie strategie duplikacji genów V, D i J [45, 63] (ryc. 15). Pierwsza z nich,



Ryc. 15. Duplikacja pierwotnego genu V–D–J

wykorzystana przez ryby chrzęstnoszkieletowe, polegała na duplikacji całego pierwotnego genu V–D–J [63]. U rekina znajdujemy więc układ genów $V_1D_1J_1C_1-V_2D_2J_2C_2-\dots-V_nD_nJ_nC_n$. Oczywiście ułożenie takie nie jest optymalne, ponieważ nie ma możliwości kombinacyjnego łączenia się genów, np. V_1 z J_3 [45]. A zatem rekin dysponuje jedynie dwoma sposobami różnicowania przeciwciał: poprzez wykorzystanie zmienności na złączach oraz

dzięki obecności wielu kopii V-D-J [45, 63]. W zupełnie innym kierunku poszła ewolucja ssaków. Nastąpiła duplikacja poszczególnych genów V, D i J, co doprowadziło do wytworzenia dodatkowej możliwości różnicowania przeciwciał i TCR (zmiennosc kombinacyjna) [45]. Dokładna analiza sekwencji genów V immunoglobulin i TCR wykazała, że w trakcie ewolucji duplikowały zarówno pojedyncze geny V, jak i całe tandemy, np. $V_{\beta}5$ i $V_{\beta}8$ [25]. Jednak gdyby duplikacja była jedynym sposobem zwielokrotnienia liczby V, D i J u ssaków, to loci V byłyby zbudowane ze ściśle od siebie odgraniczonych rodzin genów. Wiadomo, że tak nie jest. Geny V z poszczególnych rodzin mogą się wzajemnie przeplatać (rozdz. 3 i 4). Mechanizm prowadzący do wymieszania genów V nie jest znany. Przypuszcza się, że główną rolę odgrywa transpozycja całych genów V [83, 97, 132]. Hipoteza ta jest trudna do sprawdzenia. Jednak znalezienie sekwencji homologicznych do pewnych części transpozonów w pobliżu genów V_{α} [131] wydaje się ją potwierdzać. Jeszcze bardziej tajemnicze jest wyjście genów V_{α} poza locus α . Wydaje się, że i za ten proces odpowiedzialna była transpozycja [105]. W zestawieniu z tymi faktami wykazującymi dużą labilność genów V, ciekawe i zaskakujące wydają się ostatnio opublikowane wyniki, wskazujące, że względne pozycje w chromosomie homologicznych do siebie mysich i ludzkich genów V_{β} są stałe [95]. Być może kolejność genów w chromosomie ma znaczenie funkcjonalne. Wiadomo przecież, że geny leżące najbliżej segmentów J są rekombinowane jako pierwsze. Tak więc skutek procesów prowadzących do zwielokrotnienia liczby genów V, D i J organizm zyskiwał coraz sprawniejszy system różnicowania Ig i TCR.

Jednakże wraz ze wzrostem liczby V, D i J zaczęły zaznaczać się procesy prowadzące do homogenizacji tych genów. Było to oczywiście skutkiem wytworzenia rodziny wielogenowej [31]. W takiej rodzinie następuje wzajemna wymiana DNA między jej członkami (konwersje genów, transpozycje, nierówny crossing-over), prowadząca do ujednoczenia struktury wszystkich genów [131, 175]. Widać to doskonale na przykładzie pseudogenów V_{α} , które, choć nieaktywne, podlegają takim samym zmianom ewolucyjnym, jak pozostałe, czynne V_{α} [131]. Wykazano, że najważniejszym procesem powodującym homogenizację genów jest konwersja genów [131]. Tak więc konwersja może zarówno doraźnie zwiększać różnorodność, jak i na dłuższą metę homogenizować geny V [31, 131].

10. ZAKOŃCZENIE

Genetyka molekularna immunoglobulin i receptora limfocytów T, choć w dużym stopniu poznana, jest w dalszym ciągu interesującym problemem. Obecnie pojawiają się możliwości praktycznego wykorzystania wiedzy o ge-

nach Ig i TCR. Podejmowane są np. próby syntezy immunoglobulin, składających się z ludzkiej części stałej i mysiej części zmiennej [169]. Takie sztuczne mysio-ludzkie przeciwciała miałyby duże znaczenie w terapii antynowotworowej. Obecnie możliwe jest otrzymanie mysich immunoglobulin monoklonalnych przeciw ludzkim nowotworom, jednak ich kliniczne zastosowanie jest niewielkie z powodu znacznej odpowiedzi immunologicznej antyallootypowej i antyidiotypowej [20]. Immunoglobuliny, których części zmienne pochodzą od myszy, a części stałe od człowieka, są o wiele mniej immunogenne [20, 180]. W celu dalszego zmniejszenia immunogenności proponuje się konstrukcję przeciwciał, w których od myszy pochodzą jedynie fragmenty CDR [180]. Inny kierunek w inżynierii genetycznej immunoglobulin to synteza receptora, w którego skład wchodziłyby zarówno łańcuchy TCR, jak i Ig [42].

Wiadomo również, że nieprawidłowości w działaniu rekombinazy, powodujące liczne rodzaje translokacji chromosomalnych [53, 58, 65, 77, 135] zarówno w komórkach B, jak i T, są przyczyną powstawania białaczek i chłoniaków. Lepsze zrozumienie mechanizmów tych translokacji niewątpliwie zależy od postępu badań nad somatyczną rekombinacją.

PODZIĘKOWANIE

Za krytyczne uwagi i cenne wskazówki dziękuję doc. Markowi Jakóbisiakowi oraz Pani Monice Gajkowskiej za pomoc w przygotowaniu manuskryptu.

LITERATURA

- [1] AGUILERA R. J., AKIRA S., OKAZAKI K., SAKANO H., A pre-B cell nuclear protein that specifically interacts with the immunoglobulin V-J recombination sequences, *Cell*, **51**: 909-917, 1987.
- [2] AKIRA S., OKAZAKI K., SAKANO H., Two pairs of recombination signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining, *Science*, **238**: 1134-1138, 1987.
- [3] ALLEN D., CUMANO A., DILDROP R., KOCKS C., RAJEWSKY K., RAJEWSKY N., ROES J., SABLITZKY F., SIEKEVITZ M., Timing, genetic requirements and functional consequences of somatic hypermutation during B-cell development, *Immunol. Rev.*, **96**: 5-22, 1987.
- [4] ALLISON J. P., LANIER L. L., Structure, function and serology of the T-cell antigen receptor complex, *Ann. Rev. Immunol.*, **5**: 503-540, 1987.
- [5] ALT F. W., Antibody diversity. New mechanism revealed. *Nature* **322**: 772-773, 1986.
- [6] ALT F. W., BLACKWELL T. K., YANCOPOULOS G. D., Development of the primary antibody repertoire, *Science*, **238**: 1079-1087, 1987.
- [7] ARDEN B., KLOTZ J. L., SIU G., HOOD L. E., Diversity and structure of genes of the α family of mouse T cell antigen receptor, *Nature*, **316**: 783-787, 1985.
- [8] BALTIMORE D., Inversion for gene construction, *Nature*, **319**: 12-13, 1986.

- [9] BAND H., HOCHSTENBACH F., MCLEAN J., HATA S., KRANGEL M. S., BRENNER M. B., Immunochemical proof that a novel rearranging gene encodes the T cell receptor δ subunit, *Science*, **238**: 682–684, 1987.
- [10] BANK I., DEPINHO R. A., BRENNER M. B., CASSIMIERIS J., ALT F. W., CHESS L., A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes, *Nature*, **322**: 179–181, 1986.
- [11] BEHLKE M. A., LOH D. Y. Alternative splicing of murine T-cell receptor β -chain transcripts, *Nature*, **322**: 379–382, 1986.
- [12] BLACKMAN M., YAGUE J., KUBO R., GAY D., COLECLOUGH C., PALMER E., KAPPLER J., MARRACK P. The T cell repertoire may be biased in favor of MHC recognition, *Cell*, **47**: 349–357, 1986.
- [13] BLUESTONE J. A., PARDOLL D., SHARROW S. O., FOWLKES B. J., Characterization of murine thymocytes with CD3 associated T-cell receptor structures, *Nature* **326**: 82–84, 1987.
- [14] BOLHUIS R. L. H., GRAVEKAMP C., van de GRIEND R. J. Cell-cell interactions, *Clin. Immunol. Allerg.*, **6**: 29–90, 1986.
- [15] BONYHADI M., WEISS A., TUCKER P. W., TIGELOAR R. E., ALLISON J. P., Δ elta is the C_x -gene product in the γ/δ antigen receptor of dendritic epidermal cells, *Nature*, **330**: 574–576, 1987.
- [16] BORN W., MILES C., WHITE J., O'BRIEN R., FREED J. H., MARRACK P., KAPPLER J., KUBO R. T. Peptide sequences of T-cell receptor δ and γ chains are identical to predicted κ and γ proteins, *Nature*, **330**: 569–572, 1987.
- [17] BORN W., YAGUE J., PALMER E., KAPPLER J., MARRACK P. Rearrangement of T-cell receptor β -chain genes during T-cell development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**: 2925–2929, 1985.
- [18] BORST P., GREAVES D. R., Programmed gene rearrangements altering gene expression, *Science*, **235**: 658–667, 1987.
- [19] BRENNER M. B., MCLEAN J., DIALYNAS D. P., STROMINGER J. L., SMITH J. A., OWEN F. L., SEIDMAN J. G., IP S., KRANGEL M. S. Identification of a putative second T-cell receptor, *Nature*, **322**: 145–149, 1986.
- [20] CAMPBELL A. M., WHITFORD P., LEAKE R. E. Human monoclonal antibodies and monoclonal antibody multispecificity, *Br. J. Cancer*, **56**: 709–713, 1987.
- [21] CAMPBELL P. A., COLLINS J. M., STEDMAN K. E., A spleen-derived maturational factor allows immature thymocytes, prepared as cells bearing low amounts of surface sialic acid, to become cytotoxic T cells, *J. Immunol.*, **139**: 1385–1392, 1987.
- [22] CHEN P. P., KABAT E. A., WU T. T., CARSON D. A., Possible involvement of human D minigenes in the first complementarity-determining region of κ light chains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**: 2125–2127, 1985.
- [23] CHERVENAK P., MOORHEAD J. W., COHEN I. J., Prethymic T-cell precursors express receptors for antigen, *J. Immunol.*, **134**: 695–698, 1985.
- [24] CHIEN Y., IWASHIMA N., WATTSTEIN D. A., KAPLAN K. B., ELLIOTT K. B., BORN W., DAVIS M. M. T-cell receptor δ gene rearrangements in early thymocytes, *Nature*, **330**: 722–727, 1987.
- [25] CHOU H. S., ANDERSON S. J., LOUIE M. C., GODAMBE S. A., POZZI M. R., BEHLKE M. A., HUPPI K., LOH D. Y., Tandem linkage and unusual RNA splicing of the T-cell receptor β -chain variable-region genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 1992–1996, 1987.
- [26] CLARK S. P., YOSHIKAI Y., TAYLOR S., SIU G., HOOD L., MAK T. W., Identification of a diversity segment of human T-cell receptor β -chain, and comparison with the analogous murine element, *Nature*, **311**: 387–389, 1984.

- [27] CLEARY M. L., MEEKER T. C., LEVY S., LEE E., TRELA M., SKLAR J., LEVY R., Clustering of extensive somatic mutations in the variable region of an immunoglobulin heavy chain gene from a human B cell lymphoma, *Cell*, **44**: 97–106, 1986.
- [28] COLECLOUGH C. D.-J. Joining and D-J proteins in B- and T-cells, *Immunol. Today*, **6**: 128–130, 1985.
- [29] DAVIS M. M., GASCOIGNE N. R. J., HEDRICK S. M. A murine T-cell receptor gene complex: isolation, structure and rearrangement, *Immunol. Rev.*, **81**: 235–258, 1984.
- [30] DEMBIC Z., HAAS W., WEISS S., MCCUBREY J., KIEFER H., von BOEHMER H., STEINMETZ M., Transfer of specificity by murine α and β T-cell receptor genes, *Nature*, **320**: 232–238, 1986.
- [31] DOVER G. A., Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated, *Trends Genet.*, **2**: 33, 1986.
- [32] DURDIK J., MOORE M. W., SELSING E., Novel κ light chain gene rearrangements in mouse λ light chain-producing B lymphocytes, *Nature*, **307**: 749–752, 1984.
- [33] ELLIOTT J. F., PATTEN P. A., DAVIS M. M., CHIEN Y., The adult T-cell receptor δ chain is diverse and distinct from that of fetal thymocytes, *Nature*, **331**: 627–631, 1988.
- [34] ENGLER P., STORB U., High-frequency deletional rearrangement of immunoglobulin κ gene segments introduced into a pre-B-cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 4949–4953, 1987.
- [35] FARR A. G., ANDERSON S. K., MARRACK P., KAPPLER J., Expression of antigen specific major histocompatibility complex-restricted receptors by cortical and medullary thymocytes in situ, *Cell*, **43**: 543–550, 1985.
- [36] FINK P. J., MATIS L. A., MCELLIGOT D. L., BOOKMAN M., HEDRICK S. M., Correlation between T-cell specificity and structure of the antigen receptor. *Nature*, **321**: 219–226, 1986.
- [37] FLAWELL R. A., ALLEN H. Molecular biology of the H-2 histocompatibility complex, *Science*, **233**: 437–443, 1986.
- [38] FUJIMOTO S., YAMAGISHI H., Isolation of an excision product of T-cell receptor α -chain gene rearrangements, *Nature*, **327**: 242–243, 1987.
- [39] GABERT J., LANGLET C., ZAMOYSKA M., PARNES J. R., SCHMITT-VERHULST A.-M., MALLISEN B., Reconstruction of MHC class I specificity by transfer of the T-cell receptor and *Lyt-2* genes, *Cell*, **50**: 545–555, 1987.
- [40] GAJEWSKI W., Transpozony i inne ruchome elementy genetyczne, [w:] *Biologia molekularna*, pod red. Zofii Lassoty, t. 2, 434–461. PWN, Warszawa, 1987.
- [41] GARMAN R. D., DOHERTY P. J., RAULET D. H., Diversity, rearrangement, and expression of murine T-cell gamma genes, *Cell*, **45**: 733–742, 1986.
- [42] GASCOIGNE N. R. J., GOODNOW C. C., DUDZIK K. I., OI V. T., DAVIS M. M., Secretion of a chimaeric T-cell receptor immunoglobulin protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 2936–2940, 1987.
- [43] GEARHART P. J., JOHNSON N. D., DOUGLAS R., HOOD L., IgG antibodies to phosphorylcholine exhibit more diversity than their IgM counterparts, *Nature*, **291**: 29–34, 1981.
- [44] GEFTER M., MARRACK P., Immunology. Development and modification of the lymphocyte repertoire, *Nature*, **321**: 116–118, 1986.
- [45] GILBERT W., Evolution of antibodies. The road not taken, *Nature*, **320**: 485–486, 1986.
- [46] GILLIS S., UNION N. A., BAKER P. E., SMITH K. A., The in vitro generation and sustained culture of nude mouse cytolytic T-lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **149**: 1460–1476, 1979.
- [47] GOLUB E. S., Somatic mutation: diversity and regulation of the immune repertoire, *Cell*, **48**: 723–724, 1987.

- [48] GOODHARDT M., CAVELIER P., AKIMENKO M. A., LUTFALLA G., BABINET C., ROUGEON F., Rearrangement and expression of rabbit immunoglobulin α light chain gene in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 4229-4233, 1987.
- [49] GOODWIN L. O., ROCHA A. J. D., BASCH R. S., Isolation of cell lines possessing functional and serological properties resembling those of thymocyte precursors, *Nature*, **323**: 166-169, 1986.
- [50] GÓRSKI J., MACH B., Polymorphism of human Ia antigens: gene conversion between two DR β results in a new HLA D⁻/DR specificity, *Nature*, **322**: 67-70, 1986.
- [51] GOVERMAN J., MINARD K., SHASTRI N., HUNKAPILLER T., HANSBURG D., SRECARZ E., HOOD L., Rearranged δ T-cell receptor genes in a helper T cell clone specific for lysosyme: no correlation between V β and MHC restriction, *Cell*, **40**: 859-867, 1985.
- [52] HAARS R., KRONENBERG M., GALLETIN W. M., WEISSMAN I. L., OWEN F. L., HEDRICK S. M., NIELSEN E. A., KAVALER J., COHEN D. I., DAVIS M. M., Sequence relationship between putative T-cell receptor polypeptides and immunoglobulins, *Nature*, **308**: 153-158, 1984.
- [53] HALUSKA F. G., FIUVER S., TSUJIMOTO Y., CROCE C. M., The t(8;14) chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results from mistakes in V-D-J joining, *Nature*, **324**: 158-161, 1986.
- [54] HASHIMOTO Y., Organization and expression of murine T-cell receptor genes, *The Year in immunology* **2**: 237-244, 1986.
- [55] HASHIMOTO Y., YUI K., LITTMAN D., GREENE M. I., T-cell receptor genes in autoimmune mice: T-cell subsets have unexpected T-cell receptor programs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 5883-5887, 1987.
- [56] HATA S., BRENNER M. B., KRANGEL S., Identification of putative human T-cell receptor δ complementary DNA clones, *Science*, **238**: 678-682, 1987.
- [57] HAYDAY A. C., DIAMOND D. J., TANIGAWA G., HEILING J. S., FOLSOM V., SAITO H., TONEGAWA S., Unusual organization and diversity of T-cell receptor α -chain genes, *Nature*, **316**: 828-832, 1985.
- [58] HAYDAY A. C., GILLIES S. D., SAITO H., WOOD C., WIMAN K., HAYWARD W. S., TONEGAWA S., Activation of a translocated human c-myc by an enhancer in the immunoglobulin heavy-chain locus, *Nature*, **307**: 334-340, 1984.
- [59] HEDRICK S. M., COHEN D. I., NIELSON E. A., DAVIS M. M., Isolation of cDNA clones encoding T-cell-specific membrane-associated proteins, *Nature*, **308**: 149-153, 1984.
- [60] HEILING J. S., TONEGAWA S., Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes, *Nature*, **322**: 836-840, 1986.
- [61] HENDERSHOT L., KEARNEY J. F., The role of immunoglobulin heavy chain binding protein in immunoglobulin transport, *Immunol. Today*, **8**: 111-114, 1987.
- [62] HESSE J. E., LIEBER M. R., GELLERT M., MIZUUCHI K., Extrachromosomal DNA substrates in pre-B-cells undergo inversion or deletion at immunoglobulin V-(D)-J joining signals, *Cell*, **49**: 775-783, 1987.
- [63] HINDS K. R., LITMAN G. W., Major reorganization of immunoglobulin V_H segmental elements during vertebrate evolution, *Nature*, **320**: 546-549, 1986.
- [64] HOCHTL J., ZACHAU H. G., A novel type of aberrant recombination in immunoglobulin genes and its implications for V-J joining mechanism, *Nature*, **302**: 260-263, 1983.
- [65] HOLLIS G. F., MITCHELL K. F., BATTEY M. J., POTTER H., TAUB R., LENOIR G. M., LEDER P., A variant translocation places the λ immunoglobulin genes 3' to the c-myc oncogene in Burkitt's lymphoma, *Nature*, **307**: 752-755, 1984.
- [66] HONJO T., Immunoglobulin genes, *Ann. Rev. Immunol.*, **1**: 499-528, 1983.

- [67] HOOD L., Rearrangement and expression of T-cell antigen receptor and γ genes during thymic development, *J. Exp. Med.*, **164**: 1–24, 1986.
- [68] HUCK S., LEFRANC M.-P., Rearrangement to the JP1, JP and JP2 segments in the human T-cell rearranging gamma gene (TCR γ) locus, *FEBS Lett.*, **224**: 291–296, 1987.
- [69] HUMPHRIES C. G., SHEN A., KUZIEL W. A., CAPRA J. D., BLATTNER F. R., TUCHER P. W., A new human immunoglobulin V_H family preferentially rearranged in immature B-cell tumours, *Nature*, **331**: 446–449, 1988.
- [70] HUNKAPILLER T., HOOD L., Immunology. The growing immunoglobulin gene super-family, *Nature*, **323**: 15–16, 1986.
- [71] IOANNIDES C. G., ITOH K., FOX F. E., PAHWA R., GOOD R. A., PLATSOUKAS C. D., Identification of a second T-cell antigen receptor in human and mouse by an anti-peptide γ -chains-specific monoclonal antibody, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 4244–4248, 1987.
- [72] JANOSSY G., THOMAS J. A., GOLDSTEIN G., BOLLUM F. J., The human thymic microenvironment. Microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation, *Ciba Found. Symp.*, **84**: 193–214, 1981.
- [73] JOHN S., OWEN M. J., The molecular biology of the antigen-specific T-cell receptor, *Trends Genet.*, **1**: 261–264, 1985.
- [74] JOHNSON P., WILLIAMS A. F., Striking similarities between an antigen receptor J pieces and sequence in the second chain of the murine CD8 antigen, *Nature*, **323**: 74–76, 1986.
- [75] JOHNSON R. C., SIMON M. J., Hin-mediated site-specific recombination requires two 26 bp recombination sites and a 60 bp recombination enhancer, *Cell*, **41**: 781–791, 1985.
- [76] – Enhancers of site-specific recombination in bacteria, *Trends Genet.*, **3**: 262–267, 1987.
- [77] KAGAN J., FINAN J., LETOFSKY J., BESA E. C., NOWELL P. C., CROCE C. M., α -chain locus of the T-cell antigen receptor is involved in the t(10;14) chromosome translocation of T-cell acute lymphocytic leukemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 4543–4546, 1987.
- [78] KAPPLER J., KUBO R., HASKINS K., HANNUM C., MARRACK P., PIGEON M., MCINTYRE B., ALLISON J., TROWBRIDGE I., The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T-cells in mouse and man: identification of constant and variable peptides, *Cell*, **35**: 295–302, 1983.
- [79] KAPPLER J. W., STAERZ U., WHITE J., MARRACK P. C., Self-tolerance eliminates T-cells specific for MIs-modified products of the major histocompatibility complex, *Nature*, **332**: 35–40, 1988.
- [80] KARJALAINEN K., COLECLOUGH C., An unusual type of V-J joining diversifies the primary repertoire of mouse λ light chains, *Nature*, **314**: 544–546, 1985.
- [81] KLEINFELD R., HARDY R. R., TARLINTON D., DAUGL J., HERZENBERG L. A., WEIGERT M., Recombination between an expressed immunoglobulin heavy-chain gene and a germline variable gene segments in a Ly1⁺ B-cell lymphoma, *Nature*, **322**: 843–846, 1986.
- [82] KLOBECK H. G., ZIMMER F. J., COMBRIATO G., ZACHAU H. G., Linking of the human immunoglobulin V_K and J_KC_K regions by chromosomal walking, *Nucl. Acid Res.*, **15**: 9655–9665, 1987.
- [83] KODAIRA M., KINASHI T., UMEMURA I., ONO Y., HONJO T., Organization and evolution of variable region genes of the human immunoglobulin heavy chain, *J. Mol. Biol.*, **190**: 529–541, 1986.
- [84] KONING F., STINGL G., YOKOYAMA W. M., SHEVACH W. M., COLIGAN J. E., Identification of a T3-associated $\gamma\delta$ T-cell receptor on Thy-1⁺ dendritic epidermal cell lines, *Science*, **236**: 834–837, 1987.
- [85] KORSMEYER S. J., ARNOLD A., BAKHSHI A., KERSEY J., LEDER P., WALDMANN

- J., Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute leukemias of T-cell and B-cell precursor origins, *J. Clin. Invest.*, **71**: 301–313, 1983.
- [86] KOURILSKY P., Molecular mechanisms for gene conversion in higher cells, *Trends Genet.*, **3**: 60–63, 1986.
- [87] KRANGEL M. S., BAND H., HATA S., MCLEAN J., BRENNER M. B., Structurally divergent human T-cell receptor γ proteins encoded by distinct C_γ genes, *Science*, **327**: 64–67, 1987.
- [88] KRANGEL M. S., BIERER B. E., DEVLIN P., MCLEAN J., BRENNER M. B., T3 glycoprotein is functional although structurally distinct on human T-cell receptor γ T lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 3817–3821, 1987.
- [89] KRANZ D. M., SAITO H., HAAS W., EISEN H. N., TONEGAWA S., Limited diversity of the rearranged T-cell γ gene, *Nature*, **313**: 752–755, 1985.
- [90] KROCZEK R. A., GUNTER K. C., GERMAIN R. N., SHEVACH E. M., Thy-1 functions as a signal transduction molecule in T lymphocytes and transfected B lymphocytes, *Nature*, **322**: 181–184, 1986.
- [91] KRONENBERG M., GOVERMAN J., HAARS R., MALISSEN M., SUCIUFOCA N., HOOD L., Rearrangement and transcription of the β -chain genes of the T-cell antigen receptor in different types of murine lymphocytes, *Nature*, **313**: 647–653, 1985.
- [92] KRUISBEEK A. M., LONGO D. L., Acquisition of MHC-restriction specificities: role of thymic stromal cells, *Surv. Immunol. Res.*, **4**: 110–119, 1985.
- [93] KUNKEE T. A., KARUMATHIL P. G., LOEB L. A., Rearrangements of DNA mediated by terminal transferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 1867–1871, 1986.
- [94] LAI E., BARTH R. K., HOOD L., Genomic organization of the mouse T-cell receptor β -chain gene family, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 3846–3850, 1987.
- [95] LAI E., CONCANNON P., HOOD L., Conserved organization of the human and murine T-cell receptor β -gene family, *Nature* **331**: 543–546, 1988.
- [96] LANIER L. L., WEISS A., Presence of Ti(WT31) negative T lymphocytes in normal blood and thymus, *Nature*, **324**: 268–270, 1986.
- [97] LEE K. H., MATSUDA F., KINASHI T., KODAIRA M., HONJO T., A novel family of variable region genes of the human immunoglobulin heavy chain, *J. Mol. Biol.*, **195**: 761–768, 1987.
- [98] LEFRANC M. P., FORSTER A., BAER R., STINSON M. A., RABBITTS T. H., Diversity and rearrangement of the human T-cell rearranging γ genes: nine germline variable genes belonging to two subgroups, *Cell*, **45**: 237–246, 1986.
- [99] LEFRANC M. P., FORSTER A., RABBITTS T. H., Rearrangement of two distinct T-cell γ -chain variable-region genes in human DNA, *Nature*, **319**: 420–422, 1986.
- [100] LEWIS S., GIFFORD A., BALTIMORE D., DNA elements are asymmetrically joined during the site-specific recombination of kappa immunoglobulin genes, *Science*, **228**: 677–685, 1985.
- [101] LITTMAN D. R., NEWTON M., CROMMIE D., ANG S. L., SEIDMAN J. G., GETTNER S. N., WEISS A., Characterization of an expressed CD3-associated Ti γ -chain reveals C_γ domain polymorphism, *Nature*, **326**: 85–88, 1987.
- [102] LIVANT D., BLATT C., HOOD L., One heavy chain variable region gene segment subfamily in the BALB/c mouse contains 500–1000 or more members, *Cell* **47**: 461–470, 1986.
- [103] LOH E. Y., LANIER L. L., TURCK C. W., CHIEN Y. H., WEISS A., Identification and sequence of a fourth human T-cell antigen receptor chain, *Nature*, **330**: 569–573, 1987.
- [104] LORENZ W., STRAUBINGER B., ZACHAU H. G., Physical map of the human immunoglobulin K locus and its implication for the mechanism of V_K - V_K rearrangement, *Nucl. Acid. Res.*, **15**: 9667–9676, 1987.

- [105] LOTSCHER E., GRZESCHIK K. H., BAUER H. G., ZACHAU H. G., Dispersed human immunoglobulin κ light-chain genes, *Nature*, **320**: 456-458, 1986.
- [106] MACDONALD H. R., LEES R. K., SORDAT B., ZAECH P., MARYANSKY J. L., BRON C., Age-associated increase in expression of the T-cell surface markers Thy-1, Lyl-1, and Lyl-2 in congenitally athymic (nu/nu) mice: analysis by flow microfluorometry, *J. Immunol.*, **126**: 855-861, 1980.
- [107] MACDONALD H. R., SCHNEIDER R., LEES R. K., ZINKERNAGEL R. M., HENGARTNER H., T-cell receptor V_{β} use predicts reactivity and tolerance to Mls^a-encoded antigens, *Nature*, **332**: 40-45, 1988.
- [108] MAEDA K., NAKANISHI N., ROGERS B. L., HASER W. G., SHITARA K., AUGUSTIN A. A., TONEGAWA S., Expression of T-cell receptor γ -chain gene products on the surface of peripheral T-cells and T-cell blasts generated by allogeneic mixed lymphocyte reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 6536-6540, 1987.
- [109] MAGGIANO N., LAROCCA L. M., PINATELLI M., ACUTO O., MUSIANI P., Expression of T-cell receptor- α and - β subunits in the human thymocytes. An immunocytological study, *J. Immunol.*, **139**: 1438-1445, 1987.
- [110] MAIZELS N., Diversity achieved by diverse mechanisms: gene conversion in developing B-cells in the chicken, *Cell*, **48**: 359-360, 1987.
- [111] MAK T. W., YANAGI Y., Genes encoding the human T-cell antigen receptor, *Immunol. Rev.*, **81**: 221-233, 1984.
- [112] MALISSEN M., MCCOY Y., BLANC D., FITCH F., HOOD L., MALISSEN B., Direct evidence for chromosomal inversion during T-cell receptor β -gene rearrangements, *Nature*, **319**: 28-33, 1986.
- [113] MARRACK P., KAPPLER J., The T-cell receptor, *Science*, **238**: 1073-1079, 1987.
- [114] MATHER E. L., NELSON K. J., HAIMOVITCH J., PERRY R. P., Mode of regulation of immunoglobulin μ and δ chain expression during B-lymphocyte maturation, *Cell* **36**: 329-338, 1984.
- [115] MCKEAN D., HUPPI K., BELL M., STAUDT L., GERHARD W., WEIGERT M., Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 3180-3184, 1984.
- [116] MEYER J., JACK H. M., ELLIS N., WABL M., High rate of somatic point mutations in vitro in and near the variable-region segment of an immunoglobulin heavy chain gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 6950-6953, 1986.
- [117] MEYER T. F., Molecular basis of surface antigen variation in *Neisseria*, *Trends Genet.*, **3**: 319-324, 1987.
- [118] MIGONE N., de LANGE G., PIAZZA A., CAVALI-SFORZA L. L., Genetic analysis of eight linked polymorphisms within the human immunoglobulin heavy-chain region, *Am. J. Hum. Genet.*, **37**: 1146-1163, 1985.
- [119] MILSTEIN C., From antibody structure to immunological diversification of immune response, *Science*, **231**: 1261-1268, 1986.
- [120] MOSTOV K. E., FRIEDLANDER M., BLOBEL G., The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains, *Nature*, **308**: 37-43, 1984.
- [121] MULLER-SIEBURG C. E., WHITLOCK C. A., WEISSMAN I. L., Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy⁻¹⁰ hematopoietic stem cell, *Cell*, **44**: 653-662, 1986.
- [122] O'BRIEN R. L., BRINSTER R. L., STORB U., Somatic hypermutation of an immunoglobulin transgene in κ transgenic mice, *Nature*, **326**: 405-409, 1987.
- [123] OETTGEN H. C., PETTEY C. L., MALOY W. L., TERHORST C. A T3-like protein complex associated with the antigen receptor on murine T-cells, *Nature*, **320**: 272-275, 1986.

- [124] OGATA M., SATO S., SANO H., HAMAOKA T., DOI H., ITOH T., FUJIWARA H., Thymic stroma-derived T-cell growth factor (TSTGF). I. Functional distinction of TSTGF from interleukins 2 and 4 and its preferential growth-promoting effect on helper T-cell clones, *J. Immunol.*, **139**: 2675–2682, 1987.
- [125] OKAZAKI K., DAVIS D. D., SAKANO H., T-cell receptor β gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining, *Cell*, **49**: 477–485, 1987.
- [126] OWEN J. J. T., JENKINSON E. J., Early events in T lymphocyte genesis in the fetal thymus, *Am. J. Anat.*, **170**: 301–310, 1984.
- [127] OWEN J. J. T., JENKINSON E. J., KINGSTON R., Thymic stem cells: their interaction with the thymic stroma and tolerance induction, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **129**: 35–41, 1986.
- [128] OWEN M. J., Immunology. T-cell receptor companions, *Nature* **312**: 406, 1984.
- [129] PARDOLL D. M., FOWLKES B. J., BLUESTONE J. A., KRUISBEEK A., SCHWARTZ R. H., Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development, *Nature*, **326**: 79–81, 1987.
- [130] PARNES J. S., Structure and function of T lymphocyte differentiation antigens, *Trends Genet.*, **2**: 179–183, 1986.
- [131] PECH M., JAENICHER H. R., POHLENZ H. D., NEUMAIER P. S., KLOBECK H. G., ZACHAU H. G., Organization and evolution of a gene cluster for human immunoglobulin variable regions of the kappa type, *J. Mol. Biol.*, **176**: 189–204, 1984.
- [132] – Immunoglobulin genes of different subgroups are interdigitated within the V_{κ} locus, *Nucl. Acid Res.*, **12**: 9229–9236, 1984.
- [133] POLLOK B. A., KEARNEY J. F., VAKIL M., PERRY R. P., A biological consequence of variation in the site of DJ_H gene rearrangement, *Nature*, **311**: 376–379, 1984.
- [134] QUERTERMOUS T., STRAUSS W., MURRE C., SEIDMAN J. G., Human T-cell γ genes contain N segments and have marked junctional variability, *Nature*, **322**: 184–187, 1986.
- [135] RABBITS T. H., The c-myc oncogene: involvement in chromosomal abnormalities, *Trends Genet.*, **1**: 327–331, 1985.
- [136] RATHBUN G. A., CAPRA J. D., TUCKER P. W., Organization of the murine immunoglobulin V_H complex in the inbred strains, *EMBO J.*, **6**: 2931–2937, 1987.
- [137] REILLY E. B., KRANZ D. M., TONEGAWA S., EISEN H. N., A functional γ -gene segment is not necessary for antigen specific responses of murine cytotoxic T lymphocytes, *Nature*, **321**: 878–880, 1986.
- [138] RETH M. G., ALT F. W., Novel immunoglobulin heavy chains are produced from DJ_H gene segment rearrangements in lymphoid cells, *Nature*, **312**: 418–423, 1984.
- [139] RETH M. G., AMMIRATI P., JACKSON S., ALT F., Regulated progression of a cultured pre-B-cell line to the B-cell stage, *Nature*, **317**: 353–355, 1985.
- [140] RETH M., GEHRMANN P., PETRAC E., WIESE P., A novel V_H to $V_H D_H J_H$ joining mechanism in heavy-chain-negative (null) pre-B cells result in heavy-chain production, *Nature*, **322**: 840–942, 1986.
- [141] REYNAULD C. A., ANQUEZ V., DAHAN A., WEILL J. C., A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity, *Cell*, **40**: 283–291, 1985.
- [142] REYNAULD C. A., ANQUEZ V., GRIMAL H., WEILL J. C., A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire, *Cell*, **48**: 379–388, 1987.
- [143] RITZ J., CAMPEN T. J., SCHMIDT R. E., ROYER H. D., HERCEND T., HUSSEY R. E., REINHERZ E. L., Analysis of T-cell receptor gene rearrangement and expression in human natural killer clones, *Science*, **228**: 1540–1543, 1985.
- [144] ROBERTSON M., Immunology. Receptor gene rearrangement and ontogeny of T-lymphocytes, *Nature*, **311**: 305–306, 1984.

- [145] – Immunology. T-cell receptor gamma gene product surfaces, *Nature*, **322**: 110–111, 1986.
- [146] – Immunology. Tolerance, restriction and Mls enigma, *Nature*, **332**: 18–19, 1988.
- [147] ROITT I., BROSTOFF J., MALE D., Immunology. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York, 1985.
- [148] RUDIKOFF S., PAWLITA M., PUMPHREY J., HELLER M., Somatic diversification of immunoglobulins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**: 2162–2166, 1984.
- [149] RUPP F., ACHA-ORBEA H., HENGARTNER H., ZINKERNAGEL R., JOHO R., Identical V_B T-cell receptor genes used in alloreactive cytotoxic and antigen plus I-A specific helper T-cells, *Nature*, **315**: 425–427, 1985.
- [150] RUPP F., FRECH G., HENGARTNER H., ZINKERNAGEL R., JOHO R., No functional γ -chain transcripts detected in an alloreactive cytotoxic T-cell clone, *Nature*, **321**: 876–878, 1986.
- [151] SABLITZKY F., WEISBAUM D., RAJEWSKY K., Sequence analysis of non-expressed immunoglobulin heavy chain loci in clonally related, somatically mutated hybridoma cells, *EMBO J.*, **4**: 3435–3437, 1985.
- [152] SABLITZKY F., WILDNER G., RAJEWSKY K., Somatic mutation and clonal expansion of B-cells in an antigen-driven immune response, *EMBO J.*, **4**: 345–350, 1985.
- [153] SAITO T., WEISS A., MILLER J., NORCROSS M. A., GERMAIN R. N., Specific antigen-Ia activation of transfected human T-cells expressing murine Ti $\alpha\beta$ -human T3 receptor complexes, *Nature*, **325**: 125–130, 1987.
- [154] SAKAGUCHI N., MECKERS F., $\lambda 5$, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes, *Nature*, **324**: 579–582, 1986.
- [155] SAUTER H., PAIGE C. J., Deletion of normal B-cell precursors that give rise to colonies producing both κ and λ light immunoglobulin chains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 4989–4993, 1987.
- [156] SCHERR J., β -lymphocyte ontogeny, *Crit. Rev. Immunol.*, **1**: 287–301, 1981.
- [157] SCHMITT-VERHULST A. M., GUIMEZANES A., BOYER C., POENIE M., TSIEN R., LESERMAN L., Pleiotropic loss of activation pathways in a T-cell receptor α -chain deletion variant of a cytolytic T-cell clone, *Nature*, **325**: 628–631, 1987.
- [158] SCHROEDER H. W., Jr., HILLSON J. L., PERLMUTTER R. M., Early restriction of the human antibody repertoire, *Science*, **238**: 791–793, 1987.
- [159] SCOLLAY R., SMITH J., STAUFFER V., Dynamics of early T-cells: prothymocyte migration and proliferation in the adult mouse thymus, *Immunol. Rev.*, **91**: 129–157, 1986.
- [160] SHIMIZU A., HONJO T., Immunoglobulin class switching, *Cell*, **36**: 801–803, 1984.
- [161] SIEKEVITZ M., KOCKS C., RAJEWSKY K., DILDROP R., Analysis of somatic mutation and class switching in naive and memory B-cells generating adoptive primary and secondary responses, *Cell*, **48**: 757–770, 1987.
- [162] SIMINOVITCH K. A., BAKHSHI A., GOLDMAN P., KORSMEYER S. J., A uniform deleting element mediates the loss of κ genes in human B-cells, *Nature*, **316**: 260–262, 1985.
- [163] SIMMONS D., MAKGOBA M. W., SEED B. ICAM, an adhesion ligand of LFA-1 is homologous to the neural adhesion molecule NCAM, *Nature*, **331**: 624–627, 1988.
- [164] SIU G., KRONENBERG M., STRAUSS E., HAARS R., MAK T. W., HOOD L., The structure, rearrangement and expression of D _{β} gene segments of the murine T-cell antigen receptor, *Nature*, **311**: 344–350, 1984.
- [165] SNODGRASS H. R., DEMBIC Z., STEINMETZ M., von BOEHMER H., Expression of T-cell antigen receptor genes during fetal development in the thymus, *Nature*, **315**: 232–233, 1985.
- [166] STINGL G., GUNTER K. C., TSCHACHLER E., YAMADA H., SHEVACH E. M., Thy-1⁺ dendritic epidermal cells belong to the T-cell lineage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 2430–2434, 1987.

- [167] STRAUBINGER B., OSTERHOLZER E., ZACHAU H. G., Three transposed elements in the intron of a human V_{α} immunoglobulin gene, *Nucl. Acids Res.*, **15**: 9567-9575, 1987.
- [168] STRAUSS W. M., QUERTERMOUS T., SEIDMAN J. G., Measuring the human T-cell receptor γ -chain locus, *Science*, **237**: 1217-1219, 1987.
- [169] TAKEDA S., NAITO T., HANA K., NOMA T., HONJO T., Construction of chimaeric processed immunoglobulin genes containing mouse variable and human constant region, *Nature*, **314**: 452-454, 1985.
- [170] THOMPSON C. B., NEIMANN P. E., Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment, *Cell*, **48**: 369-378, 1987.
- [171] TONEGAWA S., Somatic generation of antibody diversity, *Nature*, **302**: 575-581, 1983.
- [172] TOYONAGA B., YANAGI Y., SUCIU-FOCA N., MINDEN M., MAK T. W., Rearrangements of T-cell receptor gene YT35 in human DNA from thymic leukemia T-cell lines and functional T-cell clones, *Nature*, **311**: 385-387, 1984.
- [173] VLIET E., MELIS M., van EWIJK W., Monoclonal antibodies to stromal cell types of the mouse thymus, *Eur. J. Immunol.*, **14**: 524-538, 1984.
- [174] WABL M., BURROWS P. D., GABAIN A., STEINBERG C., Hypermutation at the immunoglobulin chain locus in a pre-B-cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**: 479-482, 1985.
- [175] WAGNER M., A consideration of the origin of processed pseudogenes, *Trends Genet.*, **2**: 134-137, 1986.
- [176] WALDMANN T. A., The arrangement of immunoglobulin and T-cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders, *Adv. Immunol.*, **40**: 247-321, 1987.
- [177] WEISSMAN A. M., SAMELSON L. E., KLAUSNER R. D., A new subunit of the human T-cell antigen receptor complex, *Nature*, **324**: 480-482, 1986.
- [178] WILLIAMS A. F., Immunology. The immunoglobulin family takes shape, *Nature*, **308**: 12-13, 1984.
- [179] WILLIAMS A. F., Immunology. Immunoglobulin-related domains for cell surface recognition, *Nature*, **314**: 579-580, 1985.
- [180] WILLIAMS G., Novel antibody reagents: production and potential, *Trends Biotech.*, **6**: 36-42, 1988.
- [181] WILLIAMS G. T., KINGSTON R., OWEN M. J., JENKINSON E. J., OWEN J. J. T., A single micromanipulated stem cell gives rise to multiple T-cell receptor gene rearrangements in the thymus in vitro, *Nature*, **324**: 63-64, 1986.
- [182] WINOTO A., MJOLSNESS S., HOOD L., Genomic organization of the genes encoding mouse T-cell receptor α -chain, *Nature*, **316**: 832-836, 1985.
- [183] YANCOPOULOS G. D., ALT F. W., Regulation of the assembly and expression of variable genes, *Ann. Rev. Immunol.*, **4**: 339-368, 1986.
- [184] — Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged V_H gene segment, *Cell*, **40**: 271-281, 1985.
- [185] YANCOPOULOS G. D., BLACKWELL T. K., HEIKYUNG S., HOOD L., ALT F. W., Introduced T-cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cells: evidence that B and T cells use a common recombinase, *Cell*, **44**: 251-259, 1986.
- [186] YANCOPOULOS G. D., DESIDERIO S. V., PASKIND M., KEARNEY J. F., BALTIMORE D., ALT F. W., Preferential utilization of the most J_H -proximal V_H gene segments in pre-B-cell line, *Nature*, **311**: 727-733, 1984.
- [187] YOSHIKAI Y., CLARK S. P., TAYLOR S., SOHN U., WILSON B. I., MINDEN M. D., MAK T. W., Organization and sequences of the variable, joining and constant region genes of the human T-cell receptor α -chain, *Nature*, **316**: 832-836, 1985.

- [188] YOSHIKAI Y., REIS M. D., MAK T. W., Athymic mice express a high level of functional γ -chain but greatly reduced levels of α - and β -chain T-cell receptor, *Nature*, **324**: 482–485, 1986.

Otrzymano: 6 maja 1988.

Przyjęto: 13 grudnia 1988.

Adres autora: ul. Chalubińskiego 5, 02-004 Warszawa.

ANALIZA GENU HYDROKSYLAZY FENYLOALANINY W DIAGNOSTYCE FENYLOKETONURII

ANALYSIS OF PHENYLALANINE HYDROXYLASE GENE IN DIAGNOSIS OF PHENYLKETONURIA

Jadwiga JARUZELSKA

Zakład Genetyki Człowieka PAN

Streszczenie. Dotychczas stosowana diagnostyka fenylketonurii (PKU) polegała na badaniu niedoboru aktywności hydroksylazy fenylalaniny (PAH). Obecnie, dzięki poznaniu struktury genu PAH oraz uzyskaniu sekwencji kodującej ten gen, wprowadzono nową metodę wykrywania PKU. Polega ona na analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) locus PAH u rodzin obarczonych tą wadą genetyczną. Diagnostyka PKU poprzez analizę RFLP umożliwia precyzyjniejsze niż dotychczas oznaczanie nosicieli, a także badania prenatalne. Z badań populacyjnych wynika, że częstość występowania alleli o określonych haplotypach RFLP jest zróżnicowana. Niektóre haplotypy są charakterystyczne przede wszystkim dla nieprawidłowych alleli, podczas gdy inne przede wszystkim dla prawidłowych. Dotychczas poznane mutacje w genie PAH są substytucjami nukleotydów i dotyczą dwóch haplotypów najczęściej występujących u chorych na PKU.

Summary. Diagnosis of phenylketonuria has been based on analysis of phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency. At present, due to some new insights into PAH gene structure, another method of PKU testing, is available. It involves analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) of PAH locus. RFLP analysis enables more precise carrier detection and prenatal diagnosis in families with PKU. It has been shown in population studies, that frequencies of alleles with specific RFLP haplotypes are very unequal. Hence, some haplotypes are linked exclusively with affected and some other with normal alleles. Two mutations, in PKU individuals with two most frequent haplotypes, are nucleotide substitutions.

WSTĘP

Fenylketonuria spowodowana jest błędem w strukturze genu hydroksylazy fenylalaniny (PAH). Na skutek niedoboru tego enzymu zahamowana jest przemiana fenylalaniny w tyrozynę, a gromadzące się w zastępczej drodze

metabolicznej toksyczne związki, takie jak fenylooctan, fenylomleczan, fenylpironian oraz fenylalanina, w podwyższonym stężeniu powodują poważne uszkodzenia tkanki mózgowej i niedorozwój umysłowy [5, 8]. Fenylketonuria (PKU), występująca z częstością 1/10 000 urodzeń, jest jedną z najczęstszych wad metabolizmu, uwarunkowanych genetycznie. PKU dziedziczy się jako autosomalną cechę recesywną z częstością występowania nieprawidłowego genu u zdrowych osób 1/50 [6]. Pomimo że defekt genetyczny w PKU znany jest od dawna, a ponadto w większości krajów europejskich stosuje się powszechnie testy przesiewowe, do niedawna nie był rozwiązany problem wykrywania nosicieli PKU (heterozygot) oraz diagnostyka prenatalna. W dotychczas stosowanych do wykrywania nosicieli testach enzymatycznych, polegających na badaniu niedoboru aktywności PAH, niejednokrotnie trudno było odróżnić osoby zawierające oba allele prawidłowe od osób będących nosicielami. Z kolei trudność w prenatalnym diagnozowaniu PKU polegała na tym, że PAH syntetyzowana jest w wątrobie, natomiast nie występuje w leukocytach, fibroblastach oraz komórkach trofoblastu, używanych w prenatalnym diagnozowaniu wad metabolicznych. Nowsze metody diagnostyki PKU polegają na badaniu genu PAH, który występuje we wszystkich zawierających jądro komórkach organizmu, w tym również w komórkach używanych do diagnostyki prenatalnej. Intensywny rozwój technik rekombinacji i sekwencjonowania DNA w ostatnich kilkunastu latach umożliwił poznanie wielu genów, których mutacje wywołują zaburzenia funkcji różnych enzymów. Wyizolowane geny są używane jako tzw. sondy molekularne do wykrywania odpowiadających im nieprawidłowych alleli u rodzin obarczonych ryzykiem genetycznym [17].

IZOLACJA SEKWENCJI KODUJĄCEJ GEN PAH

Gen ludzkiej hydroksylazy fenylalaniny wyizolowano stosując, jak w przypadku innych genów, klonowanie DNA. Technika ta umożliwia izolację genu w dowolnej ilości w czystej postaci. Wyizolowany w ten sposób gen nadaje się do analizy sekwencji, struktury oraz badania ekspresji. W klonowaniu genów najistotniejsze są dwa etapy. Pierwszy polega na uzyskaniu biblioteki genów danego organizmu, natomiast drugi – na izolacji z biblioteki genów poszukiwanej sekwencji DNA. Podobieństwo sekwencji aminokwasów PAH wątroby szczura, małpy i człowieka [15] pozwalało oczekiwać, że również geny PAH tych gatunków mają podobną sekwencję nukleotydów. Przyjmując to założenie przystąpiono najpierw do izolacji genu PAH szczura, aby tą drogą uzyskać sondę hybrydacyjną do identyfikacji ludzkiego genu PAH. Po uzyskaniu przeciwciał przeciwko PAH szczura przeprowadzono immunoprecypitację polisomów, uzyskując w ten sposób mRNA PAH szczura [15]. Na matrycy mRNA zsyntetyzowano cząsteczki komplementarnych do nich DNA (cDNA). Po włączeniu uzyskanych cząsteczek cDNA do plazmidów, rekombinacji

binanty wprowadzono do bakterii. W procesie różnicowej hybrydyzacji zastosowano dwie sondy hybrydyzacyjne: cDNA uzyskany z puli mRNA wzbogaconej w mRNA PAH oraz cDNA uzyskany z puli mRNA nie zawierającej mRNA PAH. Wyselekcjonowano tą drogą klony bakterii, których DNA hybrydyzował z cDNA wzbogaconym w cDNA PAH, a jednocześnie nie hybrydyzował z cDNA nie zawierającym cDNA PAH [16, 18]. Plazmidowy DNA tych klonów bakterii użyto następnie w hybrydyzacji celem wydzielenia ludzkiego cDNA PAH z biblioteki cDNA zsyntetyzowanego na podstawie mRNA ludzkiej wątroby [18]. W ten sposób uzyskano sondę hybrydyzacyjną phPAH247 do badań ludzkiego genu PAH, mającą wszystkie sekwencje kodujące tego genu [9].

Sonda phPAH247 jest bardzo precyzyjnym narzędziem zarówno w badaniu struktury genu PAH, jak i w diagnostyce PKU. Za pomocą tej sondy wykazano, że gen PAH występuje w pojedynczej kopii w haploidalnym genomie, w długim ramieniu chromosomu 12 (12q22–q24.1) [10, 11]. Długość genu PAH wynosi ponad 90 000 pz i ma on strukturę mozaikową – 13 eksonów jest poprzedzielanych 12 intronami. Jest godne uwagi, że eksony kodowane są przez zaledwie 2400 pz, co stanowi niewielką część genu PAH [9]. Stosując sondę phPAH247 w dotychczasowych badaniach genu PAH osób chorych na PKU stwierdzono, że przyczyną niedoboru enzymu są mutacje w genie, a nie jego delecja lub zaburzenia regulacji ekspresji [12].

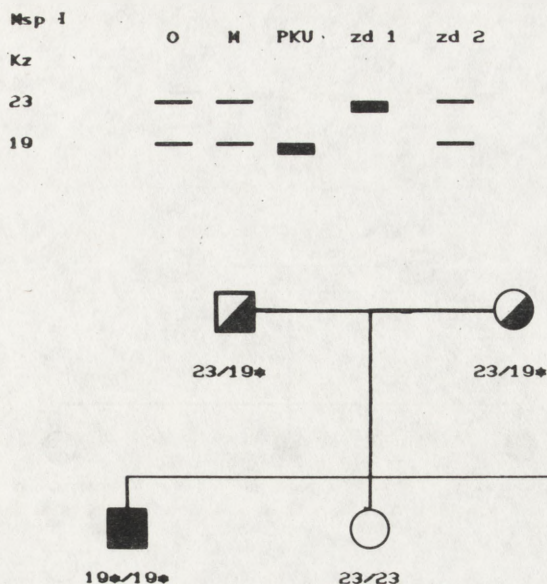
WYKORZYSTANIE POLIMORFIZMU DŁUGOŚCI FRAGMENTÓW RESTRYKCYJNYCH DNA W IDENTYFIKACJI NIEPRAWIDŁOWYCH ALLELI PAH

Aby zdiagnozować chorobę genetyczną przez analizę DNA, należy zidentyfikować nieprawidłowy gen. Bardzo dogodnym narzędziem w analizie struktury genów są enzymy restrykcyjne, które przecinają podwójną nić DNA w miejscach o ściśle określonej sekwencji nukleotydów. Produktami trawienia badanego DNA przez dany enzym restrykcyjny są setki tysiące fragmentów DNA. Fragmenty te są następnie rozdzielane według wielkości metodą elektroforezy w żelu agarozowym, a następnie przenoszone na filtr nitrocelulozowy z zachowaniem elektroforetycznego uporządkowania. Wśród fragmentów restrykcyjnych DNA na filtrze znajdują się również fragmenty zawierające badany gen lub jego części. W hybrydyzacji DNA radioaktywnie znakowana sonda łączy się ze swoim komplementarnym odpowiednikiem – badanym genem – i pozostawia na filtrze w miejscu połączenia radioaktywne piętno, wykrywane autoradiograficznie. Badany gen zostaje uwidoczniony w postaci prążków hybrydyzacyjnych. Z badań DNA wynika, że większość substytucji nukleotydów występujących w ludzkim genomie to tzw. mutacje utajone, czyli mutacje nie powodujące zaburzeń w funkcjonowaniu

genu. Tego typu mutacje mogą być jednak wykryte, jeżeli wystąpią w sekwencji specyficznie rozpoznawanej przez dany enzym restrykcyjny, użyty do trawienia genomowego DNA. Mutacje mogą również spowodować powstanie nowego miejsca wiązania dla danego enzymu restrykcyjnego. Analizując zatem DNA za pomocą enzymów restrykcyjnych oraz radioaktywnie znakowanej sondy hybrydyzacyjnej, uzyskuje się zróżnicowany obraz fragmentów restrykcyjnych (prążków hybrydyzacyjnych) w zależności od występowania specyficznej sekwencji rozpoznawanej przez dany enzym restrykcyjny. Mamy wtedy do czynienia z tzw. polimorfizmem długości fragmentów restrykcyjnych DNA (RFLP). Polimorficzne fragmenty restrykcyjne są bardzo użytecznymi markerami, stosowanymi do wykrywania prawidłowych i nieprawidłowych alleli genu pod warunkiem, że zostanie określone sprzężenie nieprawidłowego allelu z jednym z fragmentów restrykcyjnych DNA w rodzinie obciążonej wadą genetyczną.

W obecnie stosowanej analizie genu PAH stosuje się 8 enzymów restrykcyjnych, za pomocą których można wykryć polimorficzne fragmenty restrykcyjne, wykorzystywane w diagnostyce PKU – Pvu II, Bgl II, EcoR I, EcoR V, Msp I, Xmn I, Hind III oraz Sph I. Analiza RFLP DNA rodzin obciążonych PKU zakłada, że: każdy ze zdrowych rodziców chorego dziecka ma jeden nieprawidłowy allel – jest zatem nosicielem, a chore dziecko dziedziczy od każdego z rodziców po jednym nieprawidłowym allelu. W analizie RFLP bardzo ważne jest, aby oboje rodzice byli heterozygotami w układzie polimorficznych fragmentów restrykcyjnych, uzyskanych przy użyciu danego enzymu restrykcyjnego. Jeżeli tylko jedno z rodziców jest heterozygotą w układzie tych fragmentów, to analiza RFLP w diagnostyce prenatalnej jest mało przydatna [17]. W przypadku PKU, aż w 87% badanych rodzin występuje heterozygotyczny układ polimorficznych fragmentów restrykcyjnych u obojga rodziców [12]. Dla przybliżenia zasady diagnozowania PKU za pomocą analizy RFLP przedstawiono przykładowo kilka takich analiz (ryc. 1):

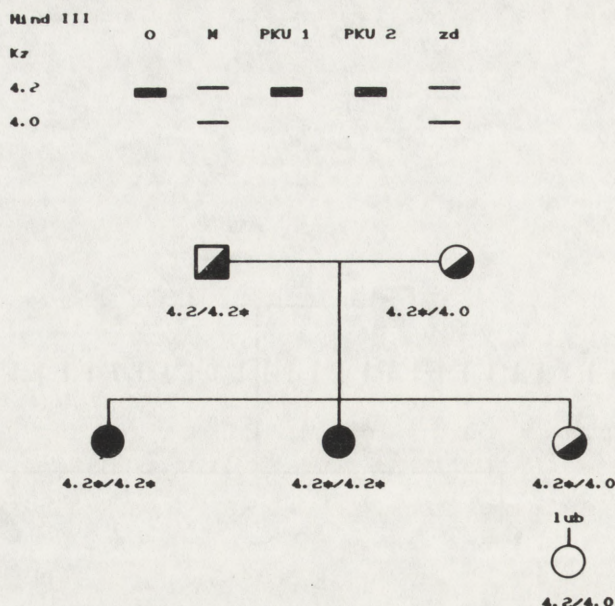
1. DNA badanej rodziny – ojca (O), matki (M), chorego dziecka (PKU) oraz zdrowego rodzeństwa (zd 1, 2) trawiono enzymem restrykcyjnym Msp I. Matka i ojciec są w tym wypadku heterozygotami w układzie polimorficznych fragmentów restrykcyjnych Msp I – 23.0/19.0 kz, chore dziecko jest homozygotą 19,0/19,0 kz, zdrowe dziecko 1 jest homozygotą 23.0/23.0 kz, natomiast drugie zdrowe dziecko – heterozygotą 23.0/19.0 kz, a więc podobnie jak oboje rodzice. Z porównania polimorficznych fragmentów wszystkich badanych członków tej rodziny wynika, że chore dziecko odziedziczyło od każdego z rodziców nieprawidłowy allel sprzężony z fragmentem 19,0 kz; pierwsze zdrowe dziecko odziedziczyło od rodziców prawidłowy allel sprzężony z fragmentem 23.0 kz, natomiast drugie dziecko odziedziczyło od jednego z rodziców prawidłowy allel sprzężony z fragmentem 23.0 kz, a od drugiego z rodziców nieprawidłowy allel sprzężony z fragmentem 19.0 kz – jest więc nosicielem



Ryc. 1. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych DNA w genie PAH uzyskany po trawieniu DNA enzymem restrykcyjnym Msp I i hybrydyzacji z cDNA PAH – phPAH247. DNA O – ojca, M – matki, PKU – dziecka PKU, zd1, zd2 – zdrowych dzieci

PKU. Aby określić prawidłowy i nieprawidłowy allel w tej rodzinie, wystarczyłoby użycie tylko jednego enzymu restrykcyjnego Msp I. W rodzinie tej, w wypadku następnej ciąży, poprzez analizę RLFP/Msp I będzie możliwe ustalenie, czy płód zawiera obydwa nieprawidłowe allele, jest nosicielem PKU, czy też zawiera obydwa prawidłowe allele (ryc. 2).

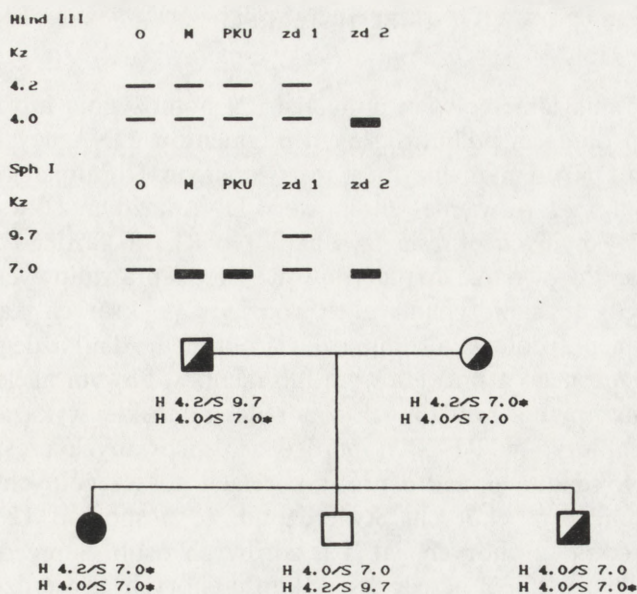
2. Są wypadki, gdzie tylko jedno z rodziców jest heterozygotą w układzie polimorficznych fragmentów uzyskiwanych przez trawienie DNA danym enzymem restrykcyjnym. Drugie z rodziców jest homozygotą w tym układzie fragmentów i dlatego rozróżnienie prawidłowego i nieprawidłowego allelu nie jest możliwe. DNA przedstawionej rodziny, w której występuje dwoje dzieci chorych na PKU (1, 2) oraz jedno zdrowe dziecko, trawiono enzymem restrykcyjnym Hind III. Matka w tej rodzinie jest heterozygotą pod względem układu polimorficznych fragmentów 4.2/4.0 kz, natomiast ojciec jest homozygotą 4.2/4.2 kz. Dzieci chore na PKU (1, 2) są homozygotami 4.2/4.2 kz, a zdrowe dziecko jest heterozygotą 4.2/4.0 kz. Oznacza to, że matczyne nieprawidłowy allel PAH jest sprzężony z fragmentem 4.2 kz. Prawdopodobieństwo, że potomek tej rodziny o układzie polimorficznym fragmentów 4.2/4.0 kz będzie chory, może być wykluczone na tej podstawie, że przynajmniej jeden prawidłowy allel matczyne (sprzężony z fragmentem 4.0 kz) będzie przekazany temu dziecku. Każde dziecko posiadające układ fragmentów 4.2/4.2 kz



Ryc. 2. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych DNA uzyskany po trawieniu DNA enzymem restrykcyjnym Hind III i hybrydyzacji z cDNA PAH – phPAH247. DNA O – ojca, M – matki, PKU 1, PKU 2 – dzieci PKU, zd – zdrowe dziecko

odziedziczy nieprawidłowy allel matki oraz prawidłowy lub nieprawidłowy allel ojca. W konsekwencji będzie ono albo nosicielem PKU, albo chore na PKU, przy czym prawdopodobieństwo choroby u następnego dziecka, posiadającego układ fragmentów 4.2/4.2 kZ, wyniesie 50%, co równe jest prawdopodobieństwu przekazania ojcowskiego nieprawidłowego allelu PAH. Podobne wyniki diagnostyczne poprzez analizę RFLP otrzymuje się również dla innych rodzin, w których tylko jedno z rodziców jest heterozygotą w układzie polimorficznych fragmentów, natomiast drugie z nich jest homozygotą (ryc. 3).

3. Informatywny wynik można uzyskać przez zastosowanie trawienia DNA badanej rodziny dwoma enzymami restrykcyjnymi. Przedstawiono analizę RFLP rodziny, w której występowało jedno chore dziecko oraz zdrowe rodzeństwo 1 i 2. Do analizy użyto dwóch enzymów restrykcyjnych Hind III i Sph I. Matka oraz chore dziecko są w tym przypadku homozygotami pod względem układu polimorficznych fragmentów Sph I 7.0/7.0 kZ, ojciec zaś jest heterozygotą dla 9.7/7.0 kZ. Stąd wniosek, że nieprawidłowy allel ojca jest sprzężony z fragmentem Sph I 7,0 kZ i został on przekazany również zdrowemu dziecku będącemu homozygotą 7.0/7.0 kZ. Ponieważ to dziecko było również homozygotą pod względem układu polimorficznych fragmentów Hind III 4.0/4.0 kZ, można więc wywnioskować, że nieprawidłowy allel ojca jest



Ryc. 3. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych DNA w genie PAH uzyskany po trawieniu DNA enzymami restrykcyjnymi Hind III i Sph I i hybrydyzacji z cDNA PAH phPAH247. DNA O – ojca, M – matki, PKU – dziecko PKU, zd 1, zd 2 – zdrowych dzieci

sprzężony z układem polimorficznych fragmentów H4.0/S7.0 kz, przy czym H i S oznaczają odpowiednio enzymy restrykcyjne Hind III i Sph I. Fakt, że oboje rodzice oraz chore dziecko są heterozygotami pod względem układu polimorficznych fragmentów Hind III H4.2/H4.0 kz sugeruje, że matczyne nieprawidłowy allel jest sprzężony z fragmentami H4.2/S7.0 kz. Układy polimorficznych fragmentów prawidłowych alleli matki i ojca przedstawiają się następująco: matki – H4.0/S7.0 kz, ojca – H4.2/S9.7 kz. Z oznaczenia u rodziców sprzężeń układu polimorficznych fragmentów Hind III i Sph I w obu allelach można wywnioskować, które z układów polimorficznych fragmentów są sprzężone z nieprawidłowymi allelami odziedziczonymi przez chore dziecko. Ponadto stwierdzono, że zdrowe dziecko (2) o układzie fragmentów H4.0/S7.0 kz odziedziczyło nieprawidłowy allel ojca oraz prawidłowy allel matki i stąd jest nosicielem PKU. Natomiast pierwsze zdrowe dziecko odziedziczyło prawidłowe allele od obojga rodziców. Znikomy procent rekombinacji, charakterystyczny dla genu PAH sprawia, że analiza sprzężeń alleli tego genu z polimorficznymi fragmentami uzyskiwanymi w procesie hybrydyzacji sondy phPAH247 z DNA rodzin obarczonych PKU w większości przypadków umożliwia diagnozę [6, 19].

HAPLOTYPY RFLP

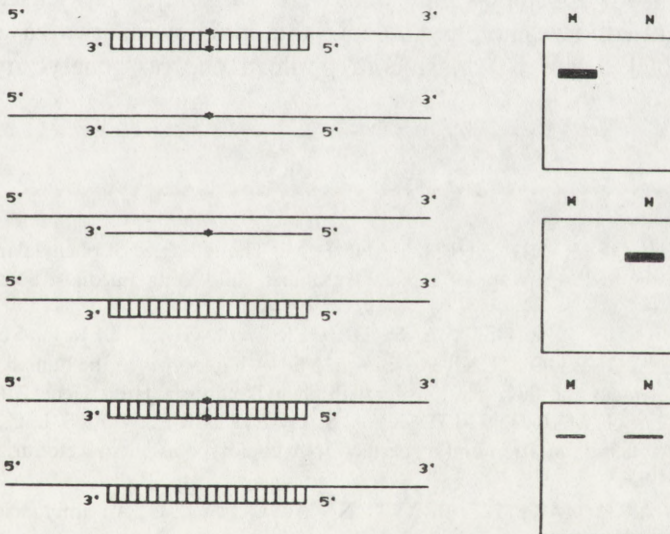
Każdy osobnik jakiegokolwiek populacji jest homozygotą lub heterozygotą pod względem długości polimorficznych fragmentów DNA uzyskiwanych po trawieniu tego DNA danym enzymem restrykcyjnym. Kombinacja fragmentów DNA uzyskana przez trawienie genomowego DNA każdym z 8 wspomnianych enzymów restrykcyjnych określa tzw. haplotyp RFLP każdego z alleli PAH tego osobnika. Porównanie haplotypów RFLP nieprawidłowych alleli PAH chorego dziecka z haplotypami alleli rodziców, z których każdy zawiera prawidłowy i nieprawidłowy allel, umożliwia określenie dla każdego z rodziców haplotypu sprzężonego z prawidłowym lub nieprawidłowym allelem PAH. Na podstawie badań przeprowadzonych w populacji duńskiej wykazano obecność 12 różnych haplotypów RFLP o bardzo zróżnicowanych częstościach występowania. Dokonano ponadto próby korelacji poszczególnych haplotypów ze stanem klinicznym chorych. Stwierdzono, że 6 spośród 12 haplotypów występuje zarówno u chorych, jak i u zdrowych osób, 3 przede wszystkim u zdrowych, a pozostałe 3 przede wszystkim u chorych. Stwierdzono również, że wystąpienie danego haplotypu nie determinuje obecności prawidłowego lub nieprawidłowego allelu PAH. Aż 90% nieprawidłowych alleli ma haplotyp 1, 2, 3 lub 4, a więc w najcięższych przypadkach klinicznych PKU nieprawidłowe genotypy są kombinacjami następujących haplotypów: 2/2, 2/3 lub 3/3 [2-4,6].

ZALEŻNOŚĆ MIĘDZY HAPLOTYPEM A LOKALIZACJĄ DEFektU W GENIE PAH

Ważnym kierunkiem w badaniach genu hydroksylazy fenyloalaniny była identyfikacja mutacji wywołujących niedobór enzymu. U niektórych chorych na PKU po przeprowadzeniu biopsji wątroby stwierdzono niewielką ekspresję PAH, podczas gdy u innych jej nie stwierdzano. Należało zatem oczekiwać, że w genie PAH występują mutacje zlokalizowane w różnych regionach genu. Niedawno zidentyfikowano 2 mutacje, a obecnie trwają poszukiwania następnym. Wymienione mutacje pojawiły się w ewolucji w prawidłowych allelach o specyficznych haplotypach RFLP. Jeżeli czas, który upłynął od ich powstania, nie był wystarczający, aby fragmenty genu zawierające te mutacje rozprzestrzeniły się przez „crossing over”, to specyficzne mutacje pozostają zasocjowane z oryginalnymi haplotypami RFLP. W celu wyjaśnienia tego problemu przystąpiono do identyfikacji zmutowanych miejsc w genie PAH, wybierając do tego celu DNA osób, u których stwierdzono haplotypy RFLP najczęściej występujące u chorych na PKU. Zlokalizowano mutację występującą w allelu PAH o haplocyocie 3 oraz o haplocyocie 2. Analiza nieprawidłowego genu wykazała, że mutacja związana z haplocyociem 3 polega na

substytucji nukleotydu w miejscu istotnym dla prawidłowego łączenia sekwencji kodujących PAH. Powoduje to brak 12 eksonu w dojrzałym mRNA. W rezultacie w karboksylowym końcu białka brak ostatnich 52 aminokwasów i PAH nie spełnia swojej funkcji. Stwierdzono ponadto, że ta mutacja występuje wyłącznie w allelach o haplocyocie 3. Mutacja zaś allelu o haplocyocie 2, będąca również substytucją nukleotydu, powoduje zamianę argininy na tryptofan we fragmencie białka odpowiadającym eksonowi 12 [4, 13]. Obecnie badane są mutacje związane z haplocyotami 1 i 4. W allelach o haplocyocie 4 występują co najmniej dwie różne mutacje, ponieważ chorzy mający allele o tym haplocyocie wykazują łagodne lub bardzo ciężkie zaburzenia [13].

Lokalizacja i określenie mutacji powodujących zaburzenia funkcji PAH oraz wykazanie powiązania tych mutacji z haplocyotami RFLP genu PAH miałyby duże znaczenie diagnostyczne. Po pierwsze, umożliwiłyby to przeprowadzenie analizy DNA danej osoby z pominięciem analizy DNA pozostałych członków rodziny. Po drugie, umożliwiłyby ustalanie nosicielstwa u osób, w których rodzinie nie wystąpiła fenylketonuria. Tą metodą można ustalić, czy potencjalni rodzice, w których rodzinach wystąpiła PKU, są nosicielami. Jeżeli bowiem są nosicielami PKU, to prawdopodobieństwo wystąpienia choroby u potomstwa wynosi 25%. Zlokalizowanie mutacji w genie PAH pozwoli na zastosowanie innego typu diagnozowania PKU na poziomie genu (ryc. 4). Polega on na zastosowaniu uzyskanych na drodze



Ryc. 4. Zastosowanie syntetycznych sond oligonukleotydu do wykrywania mutacji punktowych w genach. Gwiazdką oznaczono mutację punktową w genie. Sonda oligonukleotydu z gwiazdką jest komplementarna do zmutowanego genu, natomiast sonda bez gwiazdki jest komplementarna do prawidłowego genu. W prawej części przedstawiono wyniki hybridacji badanego DNA z prawidłową – N i zmutowaną – M sondą (schemat własny)

syntezy chemicznej fragmentów DNA długości około 20 nukleotydów. Takie oligonukleotydy obejmują miejsce w genie, w którym oczekuje się wystąpienia mutacji. Dla każdej potencjalnej mutacji syntetyzowane są dwa oligonukleotydy odpowiadające prawidłowej i zmutowanej sekwencji genu. Pary oligonukleotydów znakuje się radioaktywnie i niezależnie hybryduje z DNA badanej osoby. Warunki reakcji są tak dobrane, że hybrydyzacja zachodzi tylko wtedy, gdy użyta radioaktywna sonda jest komplementarna na całej swojej długości do badanego miejsca genu. Jeżeli zatem wyłącznie sonda prawidłowa wiąże się z badanym fragmentem genu, to oznacza to, że allele genu PAH badanej osoby są w tym miejscu prawidłowe. Jeżeli jednocześnie sonda komplementarna do tego fragmentu genu, ale zawierająca mutację, nie wiąże się z tym DNA, to mamy dodatkowy dowód na to, że obydwa allele badanej osoby są w tym miejscu prawidłowe. Jeżeli natomiast wykaże się wiązanie tylko sondy odpowiadającej zmutowanemu miejscu w genie, to oznacza to, że obydwa allele są nieprawidłowe i w przypadku diagnostyki prenatalnej badany płód jest chory. Jeżeli wystąpi wiązanie zarówno sondy zmutowanej, jak i prawidłowej, to oznacza to, że dana osoba jest nosicielem PKU [3, 14]. Dalsze badania lokalizacji i określenia mutacji w genie PAH pozwolą na syntezę całego zestawu takich oligonukleotydowych sond, umożliwiając diagnozowanie PKU oraz oznaczanie nosicielstwa przez bezpośrednie wykazanie mutacji w genie PAH.

Przedstawione postępowanie badawcze obejmuje największe zdobycze genetyki i jest jednocześnie przykładem, jakie możliwości stwarza współczesna genetyka molekularna w wyjaśnieniu podłoża chorób genetycznych.

LITERATURA

- [1] BICKEL H., GERRARD J., HICKMANS E. M., The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenylketonuric child, *Acta Paediatr. Scand.*, **43**: 64–67, 1954.
- [2] CHAKRABORTY R., LIDSKY A. S., DAIGER S. P., GUETTLER F., SULLIVAN S., DILELLA A. G., WOO S. L. C., Polymorphic DNA haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase locus and their relationship with phenylketonuria, *Hum. Genet.*, **76**: 40–46, 1987.
- [3] DILELLA A. G., MARVIT J., LIDSKY A. S., GUETTLER F., WOO S. L. C., Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria, *Nature*, **322**: 799–803, 1986.
- [4] DILELLA A. G., MARVIT J., BRAYTON K., WOO S. L. C., An aminoacid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2, *Nature*, **327**: 333–336, 1987.
- [5] FOELLING A., Ueber Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillitaet, *Z. Physiol. Chem.*, **227**: 169–176, 1934.
- [6] GUETTLER F., DILELLA A. G., LIDSKY A. S., KWOK S. C. M., MARVIT J., WOO S. L. C., Molecular biology of phenylketonuria, *Eur. J. Pediatr.*, **101**: 213–218, 1987.

- [7] GUTHRIE R., SUSI A., A simple method for the detection of phenylketonuria in large populations of newborn infants, *Pediatrics*, **32**: 338–343, 1963.
- [8] JERVIS G. A., Deficiency of phenylalanine oxidizing system, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **82**: 514–515, 1953.
- [9] KWOK S. C. M., LEDLEY F. D., DILELLA A. G., ROBSON K. J. H., WOOS. L. C., Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine, hydroxylase, *Biochemistry*, **24**: 556–561, 1985.
- [10] LIDSKY A. S., ROBSON K. J. H., THIRUMALACHARY C., BARKER P. E., RUDDLE F. H., WOO S. L. C., The PKU locus in man is on chromosome 12, *Am. J. Hum. Genet.*, **36**: 527–533, 1984.
- [11] LIDSKY A. S., LAW M. L., MORSE H. G., KAO F. T., RABIN M., RUDDLE F. H., WOO S. L. C., Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**: 6221–6225, 1985.
- [12] LIDSKY A. S., LEDLEY F. D., DILELLA A. G., KWOK S. C. M., DAIGER S. P., ROBSON K. J. H., WOO S. L. C., Extensive restriction site polymorphism at the human phenylalanine hydroxylase locus and application in prenatal diagnosis of phenylketonuria *Am. J. Hum. Genet.*, **37**: 619–634, 1985.
- [13] MARVIT J., DILELLA A. G., BRAYTON K., LEDLEY F. D., ROBSON K. J. H., WOO S. L. C., GA to AT transition at a splice donor site causes skipping of the preceding exon in phenylketonuria, *Nucleic Acids Res.*, **15**: 5613–5628, 1987.
- [14] NUKIWA T., SATOH K., BRANTLY M. L., OGUSHI F., FELS G. A., COURTNEY M., CRYSTAL R. G., Identification of a second mutation in the protein-coding sequence of the Z type alpha 1-antitrypsin gene, *J. Biol. Chem.*, **261**: 15989–15994, 1986.
- [15] ROBSON K. J. H., CHANDRA T., MacGILLIVRAY R. T. A., WOO S. L. C., Polysome immunoprecipitation of phenylalanine hydroxylase mRNA from rat liver and cloning of its cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 4701–4705, 1982.
- [16] ROBSON K. J. H., BEATTIE W., JAMES R. J., COTTON R. C. H., MORGAN F. J., WOO S. L. C., Sequence comparison of the rat liver phenylalanine hydroxylase and its cDNA clones, *Biochemistry*, **23**: 5671–5675, 1984.
- [17] SŁOMSKI R., ZIĘTKIEWICZ E., Zastosowanie technik rekombinacji DNA w genetyce człowieka, *Post. Bioch.*, **33**: 451–472, 1987.
- [18] WOO S. L. C., LIDSKY A. S., GUETTLER F., CHANDRA T., Robson K. J. H., Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows phenylketonuria, *Nature*, **306**: 151–155, 1983.
- [19] WOO S. L. C., Prenatal diagnosis and carrier detection of classic phenylketonuria by gene analysis, *Pediatrics*, **74**: 412–423, 1984.

Otrzymano: 10 sierpnia 1988.

Przyjęto: 28 grudnia 1988.

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

MECHANIZMY REGULACJI BIOSYNTETY BIAŁKA NA PRZYKŁADZIE FERRYTYNY

THE REGULATORY MECHANISM OF FERRITIN BIOSYNTHESIS

Aleksandra KORCZ, Tomasz TWARDOWSKI

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Streszczenie. Przedstawiono mechanizmy regulacji biosyntezy białka na poziomie translacji na przykładzie ferrytyny.

Summary. The authors' present the mechanisms of the protein biosynthesis regulation at the translational level; as the example synthesis of ferritin was chosen.

Wykaz stosowanych skrótów

mRNA _{fer}	– informacyjny mRNA specyficzny dla ferrytyny
mRNA _{glo}	– informacyjny mRNA specyficzny dla globiny
mRNA _{alb}	– informacyjny mRNA specyficzny dla albuminy
mRNP	– nukleoproteid, kompleks mRNA z białkiem
mRNA _{fer-fer}	– kompleks mRNA specyficznego dla ferrytyny z białkiem – ferrytyną
5'NK	– 5' niekodujący koniec mRNA
3'NK	– 3' niekodujący koniec mRNA
cDNA	– DNA komplementarny do mRNA

WSTĘP

Procesy zachodzące w organizmie żywym i w jego komórkach podlegają wielu różnorodnym procesom regulatorowym. Regulacja ekspresji genetycznej u prokariotów jest stosunkowo dobrze poznana i dotyczy przede wszystkim

etapu transkrypcji. Realizowana jest głównie poprzez kontrolę biosyntezy w wyniku:

- zmiany stężenia substratu,
- systemu indukcji i represji enzymatycznej,
- sprzężenia zwrotnego, czyli hamowania przez produkt.

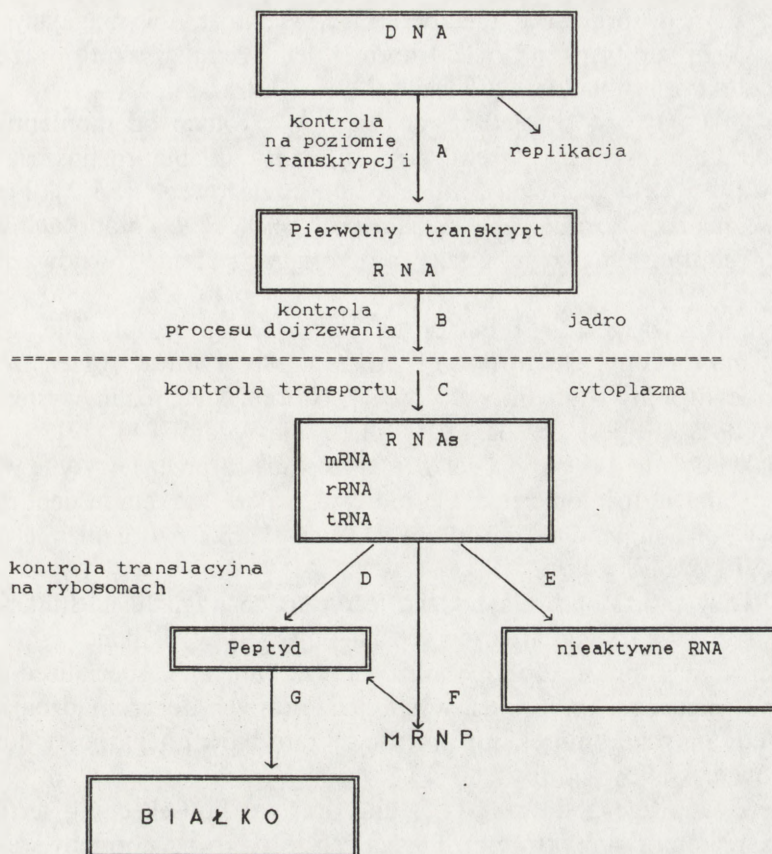
Jednym z najlepiej poznanych przykładów regulacji translacyjnej jest synteza białek rybosomalnych w układach bakteryjnych. Mechanizm inhibicji polega na specyficznym sprzężeniu zwrotnym syntezy danego białka. Sprzężenie to spowodowane jest przez specyficzne oddziaływanie białka z określonym fragmentem własnego mRNA. Asocjacja ma miejsce w pobliżu końca 5' informacyjnego RNA i polega na rozpoznaniu określonej sekwencji i/lub struktury mRNA [46].

W organizmach eukariotycznych procesy transkrypcji i translacji są rozdzielone w przestrzeni i w czasie. Rozdzielenie to determinuje znacznie bardziej złożony mechanizm regulacji ekspresji genetycznej w porównaniu z organizmami prokariotycznymi (ryc. 1). Według hipotezy regulacji kaskadowej Scherrera [52], transkrypcja jest etapem o małej specyficzności: w komórkach dochodzi do transkrypcji także tych genów, które w danym czasie nie podlegają ekspresji, a produkty transkrypcji (pre-mRNA) mogą być magazynowane lub niszczone w etapach posttranskrypcyjnych. Scherrer zakłada, że specyficzność ekspresji genetycznej u eukariotów jest realizowana kaskadowo na wielokrotnych i różnorodnych, kolejno po sobie następujących etapach regulacyjnych (ten właśnie proces nazywany jest przez autora kaskadą etapów regulacyjnych), na których zachodzi stopniowa selekcja informacji dotyczących końcowego produktu genu.

W tym wewnątrzkomórkowym przepływie informacji od genu do jego fenotypowego obrazu Scherrer zakłada istnienie pamięci peryferyjnych, tzn. innych niż pamięć centralna, którą stanowi DNA. Scherrer przypisuje tę funkcję matrycowemu RNA, a jego szczególna rola realizowana ma być poprzez występowanie kompleksów mRNA ze specyficznymi białkami (kompleksy mRNP, zwane również w literaturze informosomami). Dodatkowo należy uwzględnić fakt, że produkty degradacji mogą być również inhibitorami określonych procesów, a w szczególności własnej biosyntezy.

Jednym z potencjalnych czynników dyskryminatorowych lub cechą układu translacyjnego, która może decydować o zróżnicowanej translacji, jest struktura przestrzenna mRNA. Pojawiło się kilka doniesień na temat regulacji translacji przez niekodujące 5' i 3' końce mRNA [2, 11, 30, 33, 34, 47], głównie w konsekwencji oddziaływań III-rzędowych.

W pracy przedstawiono najnowsze poglądy na temat regulacji biosyntezy na poziomie translacji na przykładzie ferrytyny – białka magazynującego i transportującego żelazo.



Ryc. 1. Proces biosyntezy białka w organizmach eukariotycznych może być kontrolowany na wielu etapach: A – transkrypcji, B – dojrzewania cząsteczki RNA (j. ang. processing), C – transportu cząsteczki mRNA przez błonę wewnątrzkomórkową między jądrem i cytoplazmą, D – translacji poprzez wybór właściwego mRNA przez rybosom, E – translacji w wyniku degradacji pewnych mRNA (etap zależny od stabilności mRNA), F – translacji poprzez asocjacje mRNA z białkami, prowadzącą do nieaktywnych translacyjnie kompleksów mRNP

II. WYSTĘPOWANIE I FUNKCJA FERRYTYNY

Ferrytyna występuje powszechnie w świecie organizmów żywych. Jej obecność stwierdzono w komórkach kręgowców i bezkręgowców, u bakterii, grzybów i w roślinach wyższych [1, 44, 59]. Ferrytyna jest wyjątkowym białkiem ze względu na zdolność gromadzenia ogromnych ilości żelaza, tj. do 4500 atomów na cząsteczkę białka [44]. Może służyć jako zbiornik i źródło

żelaza dla wielu procesów metabolicznych komórki, wymagających tego pierwiastka, np. do transportu elektronów i tlenu, redukcji azotu oraz syntezy DNA (redukcja rybonukleotydów).

Rola ferrytyny jest szczególnie znacząca w ewolucji od momentu, kiedy jako produkt fotosyntezy pojawił się tlen, który utlenia rozpuszczalny jon żelazawy (Fe^{2+}) do nierozpuszczalnego jonu żelazowego (Fe^{3+}). Ferrytyna utrzymuje żelazo w formie rozpuszczalnej, której ilość w komórkach wyspecjalizowanych do gromadzenia żelaza może osiągać stężenie równoważne 10^{-5} M [58, 59].

Ferrytyna zwierzęca rozmieszczona jest w całej cytoplazmie, gdzie za pomocą mikroskopii elektronowej można zaobserwować rdzeń żelazowy białka jako drobiny o średnicy 60 Å [3]. Natomiast u roślin występowanie ferrytyny związane jest przede wszystkim z plastydami [40, 59].

Magazynowanie i transport żelaza realizowane są przez ferrytynę w różnorodnych stanach fizjologicznych komórek i zależą od etapu ich rozwoju, obecności hormonów, a także od specjalizacji tkanki w organizmie oraz od warunków stężenia żelaza.

Theil [59] zaproponowała podział ferrytyny ze względu na funkcje, jakie pełni ona w komórkach. Rozróżnia następujące typy białka:

1. Ferrytyna komórek wyspecjalizowanych (z j. ang. specialized-cell ferritin), występująca w komórkach wyspecjalizowanych do gromadzenia żelaza na potrzeby innych komórek, np. erytrocyty zarodków i hepatocyty dorosłych osobników u ssaków i żaby.

2. Ferrytyna „gospodarcza” (z j. ang. normal housekeeping ferritin), tj. ferrytyna w komórkach, które gromadzą żelazo tylko na potrzeby wewnątrzkomórkowe; poziom jej jest więc znacznie niższy niż w komórkach wyspecjalizowanych do gromadzenia żelaza.

3. Ferrytyna „stresowa” (z j. ang. stress housekeeping ferritin) – jest formą „gospodarczą”, przekształconą w funkcjonującą jako „stresową” w warunkach stresu fizjologicznego oraz w wysokich stężeniach żelaza, gdy ferrytyna ma za zadanie detoksyfikację komórki.

Akumulację ferrytyny jako białka stresowego obserwujemy także w tzw. ostrej fazie stanów zapalnych [7]; występuje także w chorobach nowotworowych [16, 44].

III. STRUKTURA FERRYTYNY

Ferrytyna jest dużym białkiem o masie około 450 000 i stałej sedymentacji 17–18 S, składającym się z 24 podjednostek o masie ok. 20 000 [1, 44]. Badania rentgenograficzne i mikroskopia elektronowa wskazują na kulisty spłaszczony kształt białka o zewnętrznej średnicy ok. 12 nm i grubości ok. 1 nm. Żelazo

magazynowane jest wewnątrz płaszczka białkowego w formie wodorotlenku żelazowego ($\text{Fe}^{+3}\text{O}(\text{OH})$) w połączeniu ze zmienną ilością fosforanów [17, 59]. Przy całkowitym naładowaniu żelazem ferrytyna może zwiększyć masę do ok. 900 000; osiąga wtedy współczynnik sedymentacji 24 S [44].

Zwartość struktury zapewnia ferrytynie stabilność w podwyższonych temperaturach oraz wobec enzymów proteolitycznych [1, 44]. Ogólna budowa ferrytyny u różnych organizmów jest zbliżona, co wskazuje na dużą konserwatywność tego białka w ewolucji, zwłaszcza u kręgowców [58, 59].

III.1. BUDOWA FERRYTYNY ZWIERZĘCEJ

Sekwencję aminokwasową oznaczono po raz pierwszy w 1981 r. dla ferrytyny ze śledziona konia [17], składającej się prawie całkowicie (90%) z jednakowych podjednostek [58]. W kulistym płaszczu znajduje się 6 hydrofobowych i 8 hydrofilowych kanałów, gdzie może zachodzić wymiana między rdzeniem żelazowym a cytoplazmą komórki. Ostatnie badania porównawcze sekwencji aminokwasów ferrytyny z żaby, szczura i człowieka wskazują na istnienie sekwencji konserwatywnych, występujących wokół 14 tuneli oraz w interfacie między dimerami podjednostek, gdzie również może zachodzić początek krystalizacji rdzenia żelazowego [58].

Pierwsze badania nad ludzką ferrytyną (z serca i wątroby) dowiodły istnienia dwóch podjednostek oznaczonych jako H (heart) i L (liver), różniących się mobilnością w rozdziale elektroforetycznym. Ciężar podjednostek oznaczony na podstawie elektroforezy wynosi ok. 21 000 (H) i ok. 19 000 (L). Podjednostki te są produktami translacji różnych mRNA, a nie wynikiem modyfikacji posttranslacyjnej [9, 10, 61]. Niedawno stwierdzono, że w niektórych komórkach istnieją 3 typy podjednostek, występujące w różnych proporcjach w śledzionie, wątrobie i sercu prosiaka [12, 13]. Natomiast z erytrocytów kijanek żaby amerykańskiej otrzymano 3 różne cDNA odpowiadające 3 podjednostkom ferrytyny (oznaczonym H, M i L), co świadczy o tym, że ferrytyna może być kodowana przez co najmniej 3 różne mRNA. Obserwacja ta sugeruje jednocześnie możliwość występowania różnych genów, a więc regulacji biosyntezy na poziomie transkrypcji (szczegółowo zagadnienie to omówiono w rozdz. IV). Masy podjednostek przewidziane z sekwencji cDNA wynosiły 20,5, 20,6 oraz 19,9 kD, jednakże nieco rozbieżne wyniki otrzymano na podstawie mobilności białek w żelu denaturującym [19].

Jednym z głównych problemów związanych z badaniem ferrytyny jest heterogenność tego białka. Różnice polegają na zmianach w ładunku, rozmiarze, właściwościach immunologicznych, składzie i proporcjach podjednostek oraz zawartości i szybkości akumulacji żelaza. Są obserwowane również między tkankami i w obrębie tkanki, w zależności od etapu rozwoju,

warunków fizjologicznych i stanu żelaza w komórce [1, 4, 44]. Ostatnie badania nad sekwencjami cDNA, odpowiadającymi podjednostce H ferrytyny człowieka [14, 15] oraz podjednostek H i L szczura [35] dowiodły, że podjednostki typu L i H są produktami różnych genów i wykazują jedynie około 55% homologii w sekwencji aminokwasowej. Uważa się, że heterogenność powodują przede wszystkim różne proporcje między dwoma typami podjednostek [62] oraz modyfikacje posttranslacyjne, takie jak glikozylacja, wiązanie krzyżowe między podjednostkami oraz fosforylacja [4, 44]. Odnotowano również heterogenność spowodowaną łączeniem się podjednostki ferrytyny z innym białkiem [50]. Andrews i wsp. [3, 4] znaleźli ostatnio w siderosomach (terminem tym autorzy określają wtórne lizosomy o dużej zawartości żelaza) szczura podjednostkę o ciężarze 17,3 kD, odmienną od typowych podjednostek L i H. Wydzielili formę ferrytyny o ciężarze 17,3 kD oraz peptyd długości 19 aminokwasów pochodzący z C-końca podjednostki L ferrytyny. Uważają oni, że otrzymanie przez nich nowej formy ferrytyny potwierdza hipotezę o istnieniu szlaku metabolicznego, w którym ferrytyna ulega degradacji do hemosyderyny.

Przedstawione tu dane świadczą o dużej różnorodności ferrytyny zwierzęcej.

III.2. WŁAŚCIWOŚCI FERRYTINY ROŚLINNEJ

Występowanie fitoferrytyny stwierdzono u wielu roślin, jednakże nie jest ona tak dobrze poznana jak zwierzęca. Ferrytynę badano m.in. w następujących roślinach: szpinaku [54], fasoli [38–41], grochu [18], soi [31, 32, 53] oraz w innych roślinach motylkowych, np. akacji, koniczynie [29]. Fitoferrytyna występuje głównie w tkankach nie uczestniczących w fotosyntezie, które mają za zadanie detoksyfikację układu biologicznego w wypadku nadmiaru żelaza, a więc w korzeniach i brodawkach roślin motylkowych, nasionach, w komórkach generatywnych i starzejących się oraz w mezofilu liści aktywnych fotosyntetycznie przy wysokim poziomie żelaza w ksylemie [40, 59].

Ferrytyna roślinna jest cięższa od zwierzęcej. Masa jej wynosi 460000 D w nasionach soi [53], 480000 D w grochu [18], 570000 D w brodawkach soi [32] oraz 510000 D w soczewicy [18]; wielkość podjednostek mieści się w przedziale 20300–29000 D [18, 32].

Ogólna struktura ferrytyny roślinnej podobna jest do zwierzęcej, nie stwierdzono jednak immunologicznych reakcji krzyżowych fitoferrytyny z ferrytyną konia i szczura [32, 53]. Wewnątrzkomórkowo fitoferrytynę zlokalizowano w plastydach, np. amyloplastach soi [53] i innych roślin motylkowych [29], w chloroplastach fasoli [38–41] oraz w tkance brodawek korzeniowych [32]. Van der Mark i wsp. [39] wykazali, że w systemach bezkomórkowych

z zarodków pszenicy i retikulocytów królika przy użyciu frakcji poli A⁺ RNA z liści fasoli jako matrycy ferrytyna syntetyzowana jest w formie prekursora o 5000 D cięższego od występującej w fasoli podjednostki o ciężarze 26 500 D (dane z elektroforezy w warunkach denaturujących). Następnie autorzy przeprowadzili doświadczenie, w którym udowodnili, że prekursor ferrytyny jest transportowany przez nienaruszone chloroplasty do ich wnętrza, gdzie zachodzi jego dojrzewanie. Na podstawie tych doświadczeń Van der Mark i wsp. uważają, że ochronna funkcja ferrytyny przed toksycznym efektem nie związanego żelaza spełniona jest u roślin w chloroplastach lub plastydach. Natomiast fitoferrytyna w brodawkach jest indukowana w różnych warunkach fizjologicznych, gdy funkcja brodawek jest osłabiona. Interesująca wydaje się odwrotnie proporcjonalna zależność między stężeniami fitoferrytyny i hemu w leghemoglobinie [32]. U ssaków oraz płazów istnieją dowody na współzależność biosyntezy hemu z ferrytiną. Być może analogiczna zależność występuje też w przypadku fitoferrytyny i leghemoglobiny, chociaż potwierdzenie tej hipotezy wymagałoby więcej danych eksperymentalnych.

IV. MECHANIZMY REGULACJI BIOSYNTETY FERRYTINY

Ekspresja genów ferrytyny zachodzi w większości komórek, jednakże stężenie tego białka w poszczególnych komórkach może różnić się nawet o 10³ [59]. Obserwacja ta jest ściśle związana z faktem, że ferrytyna spełnia różne zadania: może magazynować żelazo na potrzeby wewnętrznego metabolizmu komórek, jak również gromadzić jony Fe dla innych komórek (np. w retikulocytach lub hepatocytach), a także pełnić funkcje sanitarne poprzez wiązanie nadmiernych ilości żelaza (detoksyfikacja układu biologicznego).

W zależności od funkcji komórki możemy oczekiwać odmiennych mechanizmów biosyntezy i regulacji biosyntezy tego samego białka, np. poprzez syntezę *de novo*, aktywację puli zapasowej czy też degradację nadmiernej ilości. Poza tym można również oczekiwać, że każdy z wymienionych tu procesów może być realizowany na etapie transkrypcji (czyli modulacja biosyntezy odpowiedniego mRNA), translacji (czyli modulacja syntezy białka), jak również poprzez aktywację już istniejącej puli prebiałka (regulacja posttranslacyjna). Modelowe badania nad regulacją syntezy ferrytyny prowadzono głównie w organizmach zwierzęcych, a szczególnie intensywnie badano akumulację ferrytyny w tkankach szczura [5, 6, 22, 35–37, 45, 61, 63–66]. Stwierdzono, że podanie szczurowi żelaza (np. soli lub dekstranu żelaza) powoduje 3,5–7-krotny wzrost syntezy ferrytyny w tkankach serca, nerek i wątroby zwierzęcia [37]. Inne badania porównujące aktywność translacyjną mRNA_{fer} i polisomów izolowanych ze szczurów kontrolnych i traktowanych żelazem w systemach

bezkomórkowych [63] oraz doświadczenia prowadzące do wyjaśnienia lokalizacji poliA⁺mRNA i mRNA_{fer} w komórce [65] doprowadziły do sformułowania przez Zähringera, Baligę i Munro hipotezy o translacyjnej kontroli regulacji syntezy ferrytyny przez żelazo [44]. Autorzy wzięli pod uwagę następujące fakty:

stymulacja syntezy ferrytyny przez żelazo w wątrobie szczura związana jest z dwukrotnym wzrostem ilości polisomalnego mRNA przy nie zmienionej ilości cytoplazmatycznego wolnego mRNA;

aktynomycyna D i kordycepina stosowane w stężeniach hamujących syntezę mRNA oraz dołączenie poliA⁺ do mRNA nie hamują obserwowanej stymulacji;

żelazo stymuluje syntezę ferrytyny w komórkach Hela w ciągu 10 min (mechanizmy transkrypcyjne zazwyczaj wymagają więcej czasu);

cykloheksymid całkowicie znosi efekt żelaza na syntezę ferrytyny, wskazując na niezbędność biosyntezy białka w procesie stymulacji;

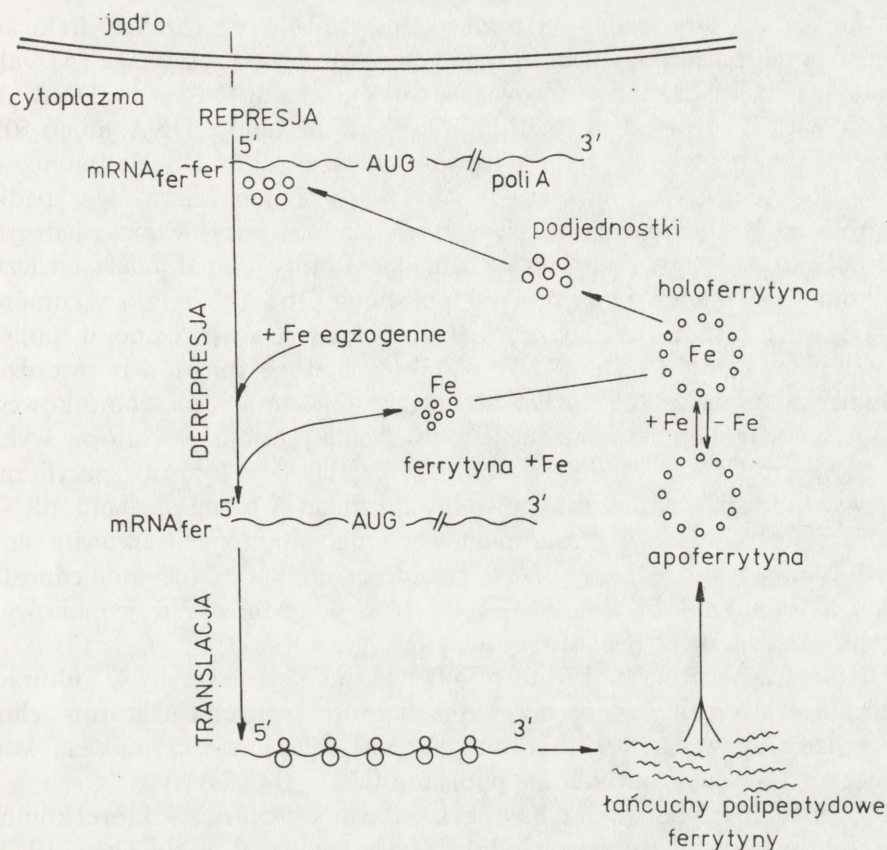
w cytoplazmie linii komórkowych wątroby znajdują się wolne podjednostki ferrytyny, które po dodaniu żelaza agregują w holoferrytynę;

w warunkach *in vitro* żelazo stymuluje przekształcenie podjednostek ferrytyny w holoferrytynę [22].

W warunkach normalnych, czyli przy niskim stężeniu jonów żelaza, znaczna część ferrytynowego mRNA podlega represji, w wyniku asocjacji z białkiem, do formy kompleksu nukleoproteidowego mRNA_{fer} – ferrytyna, który jest nieaktywny w procesie translacji.

Według modelu zaproponowanego przez Zähringera i współpracowników [64], represja mRNA_{fer} spowodowana jest przez interakcję wolnych podjednostek ferrytyny, rozpoznających sekwencje informacyjnego RNA od końca 5' (ryc. 2). Utworzony kompleks mRNP uniemożliwia włączenie informacyjnego RNA do procesu inicjacji biosyntezy białka. Natomiast przy wzroście stężenia żelaza w komórce następuje interakcja żelaza z podjednostkami ferrytyny uprzednio związanymi z mRNA_{fer}; zachodzi proces derepresji. W konsekwencji, po utworzeniu kompleksu żelazo – ferrytyna następuje uwolnienie informacyjnego mRNA, specyficznego dla ferrytyny, w pełni aktywnego biologicznie, który może zostać bezzwłocznie użyty do syntezy białka. Systemy ochronne komórki mogą wykorzystać nową ferrytynę do zwiększenia potencjału obronnego układu biologicznego.

Występowanie kompleksów nukleoproteidowych zaobserwowano w wielu różnych systemach biologicznych, np. w oocytach (układ różnicujący), w retikulocytach, nerkach, mięśniach (a więc w tkankach nieróżnicujących) [5], jak również wówczas, gdy następuje szybkie uaktywnienie układu biologicznego, np. w wyniku zapłodnienia jaj płazów, gdzie również zachodzi natychmiastowa aktywacja informacyjnego mRNA, a więc ma miejsce regulacja na poziomie translacji.



Ryc. 2. Schemat ideowy procesu represji i derepresji biosyntezy ferrytyny

Ważnego, aczkolwiek pośredniego poparcia hipotezy regulacji biosyntezy ferrytyny w procesie represji—derepresji dostarczyły prace porównujące mechanizm biosyntezy albuminy i ferrytyny [66]. Wiadomo, że poziom albuminy pozostaje na stałym, niezmiennym poziomie, co oznacza konieczność przyjęcia założenia o stałej biosyntezie tego białka. Jednocześnie stwierdzono, że $mRNA_{alb}$ występuje w komórce prawie wyłącznie w formie kompleksu polisomalnego, a więc w formie aktywnej biologicznie. Natomiast w przypadku ferrytyny, której synteza jest indukowana obecnością żelaza, w normalnym stanie (tzn. bez podania egzogennej żelaza) większość $mRNA_{fer}$ występuje w formie kompleksów mRNP niezdolnych do biosyntezy białka. Dopiero wprowadzenie do układu żelaza powoduje aktywację $mRNA_{fer}$ w wyniku przemieszczenia $mRNA_{fer}$ z kompleksów mRNP do rybosomów.

Oddzielnym zagadnieniem jest wyjaśnienie, czy wszystkie typy podjednostek ferrytyny w równym stopniu uczestniczą w procesie kontroli translacyjnej.

W wątrobie szczura badano rozmieszczenie mRNA w różnych frakcjach komórkowych przed podaniem i po podaniu zwierzętom soli żelaza [5]. Jako metodę detekcji autorzy zastosowali hybrydyzację mRNA_{fer} z cDNA dla podjednostek L i H z wątroby szczura. Zastosowane sondy cDNA, mimo 50% homologii sekwencji, nie hybrydowały między sobą. Udowodniono, że całkowita ilość mRNA_{fer} nie ulega zmianie pod wpływem żelaza. W wypadku szczurów nie traktowanych żelazem stwierdzono występowanie znacznych ilości mRNA w formie kompleksów z białkiem (mRNP), natomiast nieliczne były kompleksy mRNA z rybosomami (polisomy). Obecność żelaza w komórce spowodowała zasadniczą zmianę; większość mRNA stwierdzono w polisomach, a nie w kompleksach mRNP. Wyniki tych eksperymentów potwierdziły wcześniejszą hipotezę, że żelazo aktywuje pulę totalnego komórkowego mRNA, co znajduje odzwierciedlenie w tworzeniu polisomów. Autorzy wykazali też, że mRNA_{fer} jest aktywowany przez żelazo w sposób specyficzny, ponieważ indukcja żelazem nie spowodowała zmian w rozmieszczeniu mRNA specyficznego dla kinazy pirogronianowej i dla albuminy. Całkowita ilość mRNA_{fer} nie była zróżnicowana w zależności od kodowanej podjednostki białka, a zatem można wnioskować, że obie podjednostki w jednakowym stopniu uczestniczą w regulacji syntezy ferrytyny.

Doświadczenia Rogersa i Munro [49] nad indukcją ferrytyny w kulturach komórkowych wątroby w obecności i nieobecności różnych chelatorów żelaza potwierdziły, że wewnątrzkomórkowe stężenie żelaza jest czynnikiem kontrolującym translację mRNA dla podjednostek H i L ferrytyny.

Innym modelem doświadczalnym była żaba amerykańska, w której komórkach embrionalnych i dojrzałych indukcję ferrytyny badał zespół Theil [19–21, 27, 43, 51, 55–57]. Według tych autorów regulacja syntezy ferrytyny może zachodzić w 2 etapach posttranskrypcyjnych:

- 1) reaktywacja mRNA_{fer} przechowywanego w formie kompleksów mRNP,
- 2) konkurencyjna translacja mRNA_{fer}.

Ostatnio w kilku laboratoriach uzyskano wyniki, które wykazują, że translacja różnych mRNA w warunkach *in vitro* charakteryzuje się ich zróżnicowaną wydajnością. Analogiczne wyniki konkurencyjnej translacji uzyskano w systemach *in vivo*. Zaproponowano dwa modele dla wyjaśnienia podstaw tego zjawiska (por. [23] i prace tam cytowane):

1. Selektywność translacji mRNA spowodowana jest obecnością określonych komponentów układu translacyjnego, które charakteryzują się specyficznym powinowactwem w stosunku do określonych mRNA.

2. Dyskryminacja jest konsekwencją różnic w powinowactwie odmiennych mRNA w stosunku do niespecyficznego komponentu translacji.

Shull i Theil [55] stwierdzili, że w retikulocytach kijanek żaby amerykańskiej pod wpływem zwiększonego stężenia żelaza dochodzi do 40–50 krotnej stymulacji syntezy ferrytyny, która stanowi do 7,4% produktu całkowitej

syntezy białka. Indukcja ta zachodzi bez wzrostu stężenia mRNA w komórkach indukowanych w porównaniu z kontrolnymi. W systemie translacji *in vitro* z zarodków pszenicy mRNA_{fer} jest wykorzystywany ze znacznie większą wydajnością aniżeli inne mRNA obecne w układzie (na tle całkowitej syntezy białka). Obserwacja ta wskazuje na dużą konkurencyjność (kompetytywność) translacyjną tego właśnie mRNA. Do podobnych wniosków doszli ci sami autorzy interpretując wyniki translacyjnej kompetycji w komórkach larw płazów [51] z heterologicznym układem translacyjnym, otrzymanym z zarodków pszenicy *in vitro* [56]. Istotne również było stwierdzenie, że pochodzenie poliA⁺ mRNA (tzn. izolowanych z komórek kontrolnych lub z traktowanych żelazem) nie miało wpływu na konkurencyjność translacyjną między mRNA_{fer} a mRNA_{glo}. Podobne obserwacje, dotyczące kompetytywnej translacji mRNA_{fer}, poczyniono również w odniesieniu do fibroblastów myszy [60].

Zgodnie z wcześniejszymi hipotezami o roli struktury mRNA w regulacji syntezy ferrytyny na poziomie translacji, wielu badaczy podjęło intensywne badania nad strukturą mRNA_{fer} w różnych organizmach [6, 11, 20, 21, 24, 45]. Etapem umożliwiającym badania molekularne nad mRNA_{fer} było otrzymanie klonów cDNA: dla podjednostki H ferrytyny ludzkiej [14, 45] i dla podjednostki L ferrytyny ludzkiej [14], szczura [36] oraz żaby [21]. Badania porównawcze sekwencji dla obu podjednostek ferrytyny pochodzącej z tych organizmów wykazały, że w rejonie niekodującym 5' mRNA podjednostek H i L szczura, człowieka oraz żaby występuje uderzająca zachowawczość sekwencji długości 28 nukleotydów [36]. Sugerowało to, że fragment ten odgrywa rolę w translacyjnej regulacji syntezy ferrytyny. Istotnie, wkrótce po pierwszych doniesieniach o strukturze odcinka 5' NK mRNA_{fer} z różnych organizmów ukazały się prace, w których przedstawiono regulatorowy charakter sekwencji w 5' odcinku niekodującym mRNA w translacyjnej kontroli indukcji syntezy ferrytyny przez żelazo [6, 24, 26]. Hentze i wsp. [26] analizowali koniec 5' NK mRNA_{fer} podjednostki H człowieka. Za pomocą analizy delecyjnej klonu cDNA, zawierającego sekwencje 5' NK mRNA_{fer}, i badaniu ekspresji otrzymanych klonów w transformowanych fibroblastach mysich wykazali, że 5' NK sekwencja liderowa zawiera odcinek konieczny dla zależnej od żelaza regulacji na poziomie translacji. Odcinek ten zlokalizowali między 30 a 186 nukleotydem przed kodonem inicjatorowym translacji. Sekwencja ta była również wystarczająca na przeniesienie zależnej od żelaza regulacji translacyjnej na produkt heterologicznego genu – acetylotransferazy chloramfenikolowej (CAT).

Aziz i Munro [6] również donieśli o znalezieniu sekwencji regulatorowej w obrębie 5' NK mRNA_{fer} dla podjednostki L ferrytyny szczura. Sekwencja ta znajduje się w obrębie początkowych 67 nukleotydów odcinka 5' NK. Regulatorowe znaczenie tej sekwencji udowodniono przez skonstruowanie chimerycznego genu składającego się z sekwencji 5' i 3' NK mRNA podjednos-

tki L szczura i bakteryjnej acetylotransferazy chloramfenikolu (CAT). Ekspresję chimerycznego genu testowano w kulturze transformowanych komórek wątroby. Autorzy obu doniesień, stosując analizy komputerowe (stosując tzw. program Zuckera) struktury II-rzędowej mRNA, wykazali, że w obrębie 5' sekwencji liderowej tworzone być mogą struktury II-rzędowe (stem-loop). Hentze i wsp. uważają, że żelazo mogłoby wpływać na stopień tworzenia się struktury II-rzędowej przez interakcję z cząsteczkami regulacyjnymi i w ten sposób kontrolować translację ferrytyny [24].

Grupa Theil analizowała sekwencje 3' NK mRNA_{fer} z kijanki żaby amerykańskiej [20]. Punktem wyjściowym tych badań było wykrycie, że w warunkach *in vitro* mRNA_{fer} ulega specyficznej represji w lizacie z retikulocytów królika. Celem prowadzonych badań było stwierdzenie, które regiony mRNA są odpowiedzialne za represję w lizacie z retikulocytów niezależną od ich pochodzenia, a dodanie różnych komponentów nie powodowało jej odwrócenia. Przykładowo testowano: heminę, faktory inicjatorowe, tRNA, FeSO₄, kompleks Fe z ATP i transferynę. Pozytywnego efektu nie spowodowało również użycie mRNA innego pochodzenia, np. z wątroby zamiast z krwink. W celu wyjaśnienia przyczyny obniżenia syntezy ferrytyny w lizacie retikulocytów królika analizowano zdolność mRNA_{fer} do formowania polirybosomów. Mieszaniny translacyjne frakcjonowano w gradiencie sacharozy i badano RNA w każdej frakcji przez hybrydyzację z klonami cDNA komplementarnymi do mRNA_{fer} lub przez translację w lizacie z zarodków pszenicy. Wykazano, że mRNA_{fer} i mRNA_{glo} sedymentowały we frakcji polirybosomowej lizatu z zarodków pszenicy, natomiast po frakcjonowaniu lizatu z retikulocytów, mRNA_{fer} znaleziono na szczycie gradientu, co oznacza, że mRNA_{fer} w lizacie z retikulocytów był niezdolny do tworzenia dużych polirybosomów. Represja była więc specyficzna dla mRNA_{fer}. Fakt, że translacja mRNA_{fer} była zahamowana w warunkach *in vitro* oraz że represja nie była zniesiona przez kompleksy żelaza, sugeruje, że efekt żelaza w warunkach *in vitro* może być przynajmniej częściowo pośredni, polegający na interakcji żelaza z cząsteczkami, które z kolei oddziałują z mRNA_{fer}. W celu określenia regionów mRNA_{fer} specyficznych dla represji, otrzymano klony cDNA komplementarnego do mRNA specyficznego dla podjednostki M. Klony cDNA poddawano ukierunkowanej mutagenезie w celu otrzymania delekcji w regionie komplementarnym do odcinka niekodującego 3' mRNA dla podjednostki M. W wyniku mutagenезy otrzymano spektrum klonów cDNA, zawierających różne delekcje w regionie odpowiadającym końcowi 3' NK mRNA_{fer}. Z tego zestawu klonów cDNA otrzymano odpowiadające im spektrum łańcuchów mRNA_{fer} o różnej liczbie nukleotydów w rejonie 3' NK. Analiza translacji tych mRNA wykazała, że mRNA_{fer} z najkrótszym (24 nukleotydy) odcinkiem 3' NK nie ulegał represji w lizacie z retikulocytów królika i był tłumaczony na białko z wydajnością porównywalną do uzyskiwanej w lizacie z zarodków pszenicy.

Wydaje się prawdopodobne, że sekwencje niekodujące z końców 5' i 3' mRNA_{fer} są istotne w procesie regulacji translacyjnej. Jednakże należy uwzględnić również fakt, że biosynteza ferrytyny regulowana jest na kilku etapach posttranskrypcyjnych, a niektóre z nich mogą być niezależne od żelaza [58]. Pewne znaczenie ma również regulacja transkrypcyjna [48]. Długie liniowe dystanse między regionami 5' i 3' NK potwierdzają rolę struktur II- i III-rzędowych mRNA w procesach interakcji decydujących o regulacji translacyjnej. Podobne obserwacje, dotyczące regionu niekodującego 3', stwierdzono w przypadku represji translacyjnej β -interferonu ludzkiego [33].

Frits van der Mark [38] przedstawił hipotezę, że w materiale roślinnym, w przeciwieństwie do materiału zwierzęcego, mamy do czynienia z transkrypcyjną kontrolą biosyntezy ferrytyny. W swych pracach prowadzonych na liściach fasoli (*Phaseolus vulgaris*) analizował ilości zsyntetyzowanej de novo ferrytyny w obecności żelaza. Ilościowe oznaczenia apoferrytyny były wykonane poprzez immunoprecypitację z przeciwciałem dla ferrytyny. Na podstawie takiego określenia ilości białka autor wnioskował o ilości informacyjnego RNA, specyficznego dla ferrytyny, zdolnego do ekspresji w translacji in vitro. Należy podkreślić, że do realizowanych testów stosowano produkty translacji w różnych ilościach ocenianych na podstawie radioaktywności po precypitacji zsyntetyzowanego białka kwasem trójchlorooctowym. Fasolę hodowano na pożywce o różnej zawartości żelaza w formie wersenianu (autorzy nie podają dokładnie stosowanych stężeń) w taki sposób, że końcowa ilość żelaza w tkance liści wynosiła 0,9–22 nmoli/mg suchej masy.

Analizowano trzy warianty warunków:

1. bez żelaza,
2. w obecności normalnego stężenia żelaza,
3. w roślinie „przeładowanej” żelazem.

Autor stwierdził, że zarówno w liściach, jak i w wyniku translacji in vitro otrzymuje ilości ferrytyny będące w takiej samej relacji ilościowej jak mRNA pozyskany z tego materiału, a mianowicie: 0,25:1:3,7. Na podstawie tego wyniku wysunięto wniosek, że zależnie od stężenia żelaza w układzie biologicznym ilość mRNA specyficznego dla ferrytyny w układzie natywnym jest zmienna, a zatem regulacja biosyntezy ferrytyny zachodzi na poziomie transkrypcji.

Z przeprowadzonych eksperymentów został wyciągnięty bardzo zasadniczy, wręcz fundamentalny dla tego problemu wniosek. Jednakże przedstawione rozumowanie opierało się na kilku przesłankach nie w pełni poprawnych. Po pierwsze, wiarygodna wycena ilości mRNA możliwa jest przez zastosowanie techniki hybrydyzacji. Po drugie, wątpliwy wydaje się argument, że do reakcji translacji in vitro użyto równe ilości mRNA, bowiem wycenę ilościową prowadzono na podstawie zliczeń w precypitacie uzyskanym za pomocą kwasu trójchlorooctowego. Po trzecie, wycenę ilościową zsyntetyzo-

wanej *in vitro* apoferrytyny prowadzono za pomocą przeciwciała dla ferrytyny.

W świetle przedstawionych uwag krytycznych konkluzja eksperymentów Fritsa van der Marka, mówiąca o transkrypcyjnej regulacji biosyntezy roślinnej ferrytyny, nie wydaje się w pełni udowodniona. Ponieważ w pracach van der Marka [38, 39] brakuje danych hybrydyzacyjnych, zmiana więc w ilości aktywnego w translacji mRNA_{fer} może być przypisana również aktywacji zgromadzonego nieaktywnego mRNA_{fer}. Ponadto system translacji *in vitro*, stosowany w doświadczeniu, pochodzi z roślin (z zarodków pszenicy) i może zawierać endogenne czynniki regulatorowe dla syntezy ferrytyny [58]. Wydaje się jednak, że żelazo magazynowane w liściach (które były materiałem badań) jest gromadzone z przeznaczeniem dla potrzeb wewnątrzkomórkowych (czyli rola ferrytyny sprowadzona jest do białka „gospodarczego”) i dlatego synteza ferrytyny może być regulowana zupełnie inaczej niż w komórkach wyspecjalizowanych do gromadzenia żelaza. Praca van der Marka jest do tej pory jedynym doniesieniem o regulacji syntezy ferrytyny roślinnej. Trudno więc porównywać jej wyniki z danymi dotyczącymi regulacji u zwierząt. Istotny jest jeszcze jeden fakt różniący syntezę ferrytyny roślinnej od zwierzęcej – fitoferrytyna jest syntetyzowana jako prekursor, który następnie ulega transportowi i dojrzewaniu w chloroplastach [33].

Można sformułować hipotezę, że gdy ferrytyna gromadzona jest na wewnętrzne potrzeby komórki, synteza białka może być regulowana na poziomie transkrypcji. Przykładowo w komórkach białaczkowych linii HL-60 stwierdzono 25 – 40-krotny wzrost ilości hybrydyzowalnego mRNA w ciągu 3 dni różnicowania się komórek do końcowych neutrofilów lub makrofagów. Jednocześnie zmienił się stosunek ilościowy syntetyzowanych podjednostek H:L od 2–7:1 do 16:1 [58]. Natomiast w dojrzewających komórkach białaczkowych (erythroleukemia) indukowanych dwumetylosulfotlenkiem stwierdzono 2–3-krotny wzrost zdolnego do hybrydyzacji mRNA, kodującego podjednostkę H. Nie stwierdzono natomiast zmiany w ilości mRNA specyficznego dla podjednostki L; również w tym przypadku stosunek H:L uległ zwiększeniu [58].

O charakterze regulacji ekspresji genetycznej decyduje również rodzaj komórek, w których zachodzi ekspresja ferrytyny. Świadczą o tym zmiany w stężeniu ferrytyny w tych samych komórkach na różnych etapach rozwojowych. Porównanie dojrzałych krwinek żaby, dojrzewających *in vivo*, z linią komórkową jej komórek embrionalnych wykazało, że ilość mRNA (sprawdzona przez hybrydyzację z cDNA oraz translację *in vitro*) dla obu podjednostek H i L zmniejszyła się ok. 5-krotnie przy przejściu z etapu rozwojowego, w którym komórki specjalizują się w gromadzeniu żelaza, do etapu dojrzałego, w którym żelazo zużywane jest wyłącznie na potrzeby własne [19]. Poza tym, w przeciwieństwie do komórek embrionalnych, indukcja syntezy ferrytyny przez żelazo w dojrzałych komórkach prowadzi do akumulacji

cji ferrytyny, której towarzyszy wzrost stosunku mRNA specyficznego dla podjednostki L w stosunku do mRNA specyficznego dla podjednostki H [19].

V. ORGANIZACJA GENÓW FERRYTYNY

Występowanie 3 typów podjednostek ferrytyny (H, L, M) oraz specyficzne komórkowe różnice w I-rzędowej strukturze białka wskazują na kodowanie ferrytyny przez rodzinę wielogenową. Znalaziono sekwencje hybrydujące do sond cDNA dla podjednostek H i L w genomie człowieka, szczura i żaby [8, 21, 28].

Liczba fragmentów genowych dla łańcucha H waha się od 4 do 10 [25], a dla L od 4 do 27 [42, 58]. Rodzina genów podjednostki L człowieka wydaje się mniejsza od rodziny kodującej podjednostkę H. Natomiast stosunkowo duża ilość sekwencji kodujących podjednostkę L u szczura może być przypisana występowaniu dojrzałych pseudogenów.

Rozmieszczenie genów ferrytyny w ludzkich chromosomach zbadano przez fuzję komórek. Gen dla podjednostki H zlokalizowany jest na chromosomie 11 [25], a dla podjednostki L na chromosomie 19 [58]. Doświadczenia z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ* wskazują na szerokie występowanie sekwencji genowych podjednostek H i L na 12 chromosomach, włączając chromosom szósty, na którym znajduje się jeden z genów odpowiedzialnych za metabolizm żelaza [58].

VI. PODSUMOWANIE

Regulacja syntezy białka jest preferowana na poziomie translacji, jeśli ma miejsce szybka adaptacja komórki do określonych warunków. Aktywacja już istniejących, nie ulegających translacji mRNA (uwolnienie mRNA z kompleksu mRNP), może spowodować znacznie szybszą syntezę białka niż aktywacja genu, bowiem konieczna jest wówczas nie tylko synteza nowego informacyjnego mRNA, ale także jego dojrzewanie, transport do cytoplazmy, a dopiero potem translacja. Kontrola translacyjna może być preferowana również w sytuacjach, gdy po indukcji niezbędne jest szybkie przerwanie biosyntezy (np. faza „recovery” po szoku termicznym). W przypadku ferrytyny regulacja na poziomie translacji ma dodatkowy, niezwykle istotny aspekt. Komórki wyspecjalizowane do gromadzenia ferrytyny są w stanie udzielić szybkiej odpowiedzi na zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia żelaza (przez syntezę apoferrytyny), bez konieczności wnikania żelaza do jądra komórki. Wiąże się to bezpośrednio z detoksyfikacyjnym charakterem ferrytyny przede

wszystkim w celu ochrony genetycznego materiału komórki. Zagrożenie to wynika z faktu, że żelazo degradowuje gen przez katalizowanie reakcji utworzenia jonów nadtlenkowego lub ponadtlenkowego, które powodują, jako wolne rodniki, hydrolizę DNA, a przez to są niebezpieczne dla żywych komórek. W odróżnieniu od DNA, cząsteczka RNA jest stosunkowo odporna wobec wolnych rodników. Rola ochronna ferrytyny polega więc na związaniu żelaza na terenie cytoplazmy, która jest miejscem syntezy białka. W komórkach zwierzęcych błona jądrowa zapewne stanowi przeszkodę dla migracji żelaza i większości jego pochodnych. Bariera, jaką tworzy błona jądrowa, może zostać przełamana przez działanie bleomycyny – glikoproteidu stosowanego jako środek antynowotworowy, który wiąże żelazo w formę aktywującą tlen i doprowadza aktywowany kompleks do pozycji umożliwiającej cięcie DNA [58].

Translacyjny mechanizm regulacji ferrytyny istotny jest jeszcze z innego punktu widzenia. Równie ważne, jak szybki spadek wewnątrzkomórkowego stężenia żelaza w wyniku związania jonów Fe przez nowo syntetyzowane białko, może być również zahamowanie dalszej syntezy białka. Uważa się, że żelazo uwalniane jest wolniej z ferrytyny niezupełnie naładowanej żelazem niż z ferrytyny nasyconej żelazem.

Gdy zmiany w regulacji syntezy ferrytyny wynikają z etapu rozwojowego (wzrostu lub różnicowania) organizmu, sygnały pobudzające syntezę nie muszą być związane ze stężeniem żelaza [58] i regulacja może zachodzić na poziomie transkrypcji. Również w komórkach gromadzących żelazo jedynie na wewnątrzkomórkowe potrzeby regulacja translacyjna może być wyłączona przypuszczalnie dlatego, że stężenie żelaza jest zbyt niskie, aby uruchomić systemy detoksyfikacyjne, lub aby wysycić nośniki żelaza.

Biosynteza ferrytyny jest jeszcze jednym przykładem na to, że mechanizmy regulacji syntezy białka są bardzo złożone, szczególnie dla peptydów, których ekspresja jest specyficzna komórkowo.

LITERATURA

- [1] AISEN P., LISTOWSKY I., Iron transport and storage proteins, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**: 357–393, 1980.
- [2] ADRIAN G. S., KORINEK B. W., BOWMAN B. H., YANG F., The human transferrin gene: 5' region contains conserved sequences which match the control elements regulated by heavy metals glucocorticoids and acute phase reaction, *Gene*, **49**: 167–175, 1986.
- [3] ANDREWS C. A., TREFFRY A., HARRISON P. M., Siderosomal ferritin, *Biochem. J.*, **245**: 439–446, 1987.
- [4] – A new form of ferritin heterogeneity explained, *ibid.*, **245**: 447–453, 1987.
- [5] AZIZ N., MUNRO H. N., Both subunits of rat liver ferritin are regulated at a translational level by iron induction, *Nucl. Acid. Res.*, **14**: 915–927, 1986.

- [6] – Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 8478–8482, 1987.
- [7] BAYNES R., BEZWODA W., BOTHWELL T., KHAN Q., MANSOOR N., The nonimmune inflammatory response: serial changes in plasma iron, iron binding capacity, lactoferrin, ferritin and C-reactive protein, *Scand. J. Clin. Invest.* **46**: 695–704, 1986.
- [8] BOYD D., VECOLI C., BELCHER D. M., JAIN K. J., DRYSDALE J. W., Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones, *J. Biol. Chem.*, **260**: 11755, 1985.
- [9] BOYD D., JAIN S. K., CRAMPTON J., BARRETT K. J., DRYSDALE J., Isolation and characterization of a cDNA clone for human ferritin heavy chain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 4751–4755, 1984.
- [10] BROWN A. J., LEIBOLD E. A., MUNRO H. N., Isolation of cDNA clones for the light subunit of rat liver ferritin: evidence that the light subunit is encoded by a multigene family, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**: 1265–1269, 1983.
- [11] CASEY J. L., HENTZE M. W., KOELLER D. M., CAUGHMAN S. W., ROUAULT T. A., KLAUSNER R. D., HARFORD J. B., Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation, *Science*, **240**: 924–928, 1988.
- [12] COLLAWN J. F., FISH W. W., The distribution of ferritin subunit types in porcine tissues, *Comp. Biochem. Physiol.*, **78 B**: 653–656, 1984.
- [13] COLLAWN J. F., GOWAN L. K., CROW H., SCHWABE C., FISH W. W., Isolation and partial amino acid sequences of three subunits species of porcine spleen ferritin: evidence of multiple H subunits, *Arch. Biochem. Biophys.*, **259**: 105–113, 1987.
- [14] CONSTANZO F., COLOMBO M., STAEMPELI S., SANTORO C., MARONO M., FRANK R., DELIUS H., CORTESE R., Structure of gene and pseudogene of human apoferritin H chain, *Nucl. Acids Res.*, **14**: 721–736, 1986.
- [15] CONSTANZO F., SANTORO C., COLANTUONI V., BENSI G., RAUGEI G., ROMANO V., CORTESE R., Cloning and sequence of a full length cDNA coding for human apoferritin H chain, *EMBO J.*, **3**: 23–27, 1984.
- [16] CONSTANZO F., SANTORO G., COLOMBO M., CORTESE R., Ferritin as a tumour marker: expression of ferritin genes, *Bull. Mol. Biol. Med.*, **10**: 73–79, 1985.
- [17] CRICHTON R. R., CHARLOTEAUX-WAUTERS M., Iron transport and storage, *Eur. J. Biochem.*, **164**: 485–506, 1987.
- [18] CRICHTON R. R., PONCE-ORTIZ Y., KOCH M. H. J., PARFAIT R., STUHRMANN B., Isolation and characterization of phytoferritin from pea (*Pisum sativum*) and lentil (*Lens esculenta*), *Biochem. J.*, **171**: 349–356, 1978.
- [19] DICKEY L. F., SREEDHARAN S., THEIL E. C., DIDSBURY J. R., WANG Y-H., KAUFMAN R. E., Differences in the regulation of messenger RNA for housekeeping and specialized-cell ferritin, *J. Biol. Chem.*, **262**: 7901–7907, 1987.
- [20] DICKEY L. F., WANG Y-H., SHULL G. E., WORTMAN I. A., THEIL E. C., The importance of the 3'-untranslated region in the translational control of ferritin mRNA, *J. Biol. Chem.*, **263**: 3071–3074, 1988.
- [21] DIDSBURY J. R., THEIL E. C., KAUFMAN R. E., DICKEY L. F., Multiple red cell ferritin mRNAs, which code for an abundant protein in the embryonic cell type, analyzed by cDNA sequence and by primer extension of the 5'-untranslated regions, *J. Biol. Chem.*, **261**: 949–955, 1986.
- [22] DRYSDALE J. W., SCHAFFRITZ D. A., In vitro stimulation of apoferritin synthesis by iron, *Biochem. Biophys. Acta*, **383**: 97–105, 1975.
- [23] GEHRKE L., Differential translation of eukaryotic messenger RNAs, [w] Translational regulation of gene expression, ed. ILAN J., Plenum P. C. 1987.
- [24] HENTZE M. W., CAUGHMAN S. W., ROUAULT T. A., BARRIOCANAL J. G.,

- DANCIS A., HARFORD J. G., KLAUSNER R. D., Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA, *Science*, **238**: 1570–1573, 1987.
- [25] HENTZE M. W., KEIMS., PAPADOPOULUS P., O'BRIEN S., MODI W., DRYSDALE J., LEONARD W. J., HARFORD J. B., KLAUSNER R. D., Cloning characterization, expression, and chromosomal localization of a human ferritin heavy-chain gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 7226–7230, 1986.
- [26] HENTZE M. W., ROUAULT T. A., CAUGHMAN S. W., DANCIS A., HARFORD J. B., KLAUSNER R. D., A cis-acting element is necessary and sufficient for translational regulation of human ferritin expression in response to iron, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**: 6730–6734, 1987.
- [27] IHARA K., MAEGUCHI K., YOUNG C. T., THEIL E. C., Cell-specific properties of red cell and liver ferritin from bullfrog tadpoles probed by phosphorylation in vitro, *J. Biol. Chem.*, **259**: 278–283, 1984.
- [28] JAIN S. K., BARRETT K. J., BOYD D., FAVREAU M. F., CRAMPTON J., DRYSDALE J. W., Ferritin L and H chains are derived from different multigene families, *J. Biol. Chem.*, **260**: 11762–11768, 1985.
- [29] JOBSON S., KNOX R. B., KENRICK J., DUMAS C., Plastid development and ferritin content of stigmas of the legumes *Acacia*, *Lotus* and *Trifolium*, *Protoplasma*, **116**: 213–218, 1983.
- [30] KANEDA S., TAKEISHI K., AYUSAWA D., SHIMIZU K., SENO T., ALTMAN S., Role in translation of a triple tandemly repeated sequence in the 5'-untranslated region of human thymidylate synthase mRNA, *Nucl. Acids Res.*, **15**: 1259–1270, 1987.
- [31] KO M. P., HUANG P. Y., HUANG J. S., BARKER K. R., Accumulation of phytoferritin and starch granules in developing nodules of soybean roots infected with *Heterodera glycines*, *Phytopathology*, **75**: 159–164, 1985.
- [32] – The occurrence of phytoferritin and its relationship to effectiveness of soybean nodules, *Plant Physiol.*, **83**: 299–305, 1987.
- [33] KRUYLS V., WATHELET M., POUPART P., CONTRERAS R., FIERIS W., CONTENT J., HUEZ G., The 3' untranslated region of the human interferon — mRNA has an inhibitory effect on translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6030–6034, 1987.
- [34] LAWSON T. G., RAY B. K., DODDS J. T., GRIFO J. A., ABRAMSON R. D., MERRICK W. C., BETSCH D. F., WEITH H. L., THACH R. E., Influence of 5' proximal secondary structure on the translational efficiency of eukaryotic mRNAs and on their interaction with initiation factors, *J. Biol. Chem.*, **261**: 13979–13989, 1986.
- [35] LEIBOLD E. A., AZIZ N., BROWN A. J. P., MUNRO H. N., Conservation in rat liver of light and heavy subunit sequences of mammalian ferritin, *J. Biol. Chem.*, **259**: 4327–4334, 1984.
- [36] LE BOLD E. A., MUNRO H. N., Characterization and evolution of the expressed rat ferritin light subunit gene and its pseudogene family, *J. Biol. Chem.*, **262**: 7335–7341, 1987.
- [37] LINDER-HOROWITZ M., RUETTINGER R. T., MUNRO H. N., Iron induction of electrophoretically different ferritins in rat liver, heart and kidney, *Bioch. Bioph. Acta.* **200**: 442–448, 1970.
- [38] Van der MARK F., BIENFAIT F., Van den ENDE A., Variable amounts of translatable ferritin mRNA in bean leaves with various iron contents, *Bioch. Bioph. Res. Com.*, **115**: 463–469, 1983.
- [39] Van der MARK F., Van der BRIEL W., HUISMAN H. G., Phytoferritin is synthesized in vitro as a high molecular weight precursor, *Biochem. J.*, **214**: 943–950, 1983.
- [40] Van der MARK F., Van der BRIEL M. L., Van OERS J. W. A. M., Ferritin in bean leaves with constant and changing iron status, *Planta*, **156**: 341–344, 1982.

- [41] Van der MARK F., Van den BRIAL W., Purification and partial characterization of ferritin from normal and iron-loaded leaves of *Phaseolus vulgaris*, *Plant Science*, **39**: 55–60, 1985.
- [42] Mc GILL J. R., NAYLOR S. L., SAKAGUCHI A. Y., MOORE C. M., BOYD D., BARRET K. J., SHOWS T. B., DRYSDALE J. W., Human ferritin H and L sequences lie on ten different chromosomes, *Hum. Genet.*, **76**: 66–72, 1987.
- [43] MERTZ J. R., THEIL E. C., Subunit dimers in sheep spleen apoferritin, *J. Biol. Chem.*, **258**: 11719–11726, 1983.
- [44] MUNRO H. N., LINDER M. C., Ferritin: structure, biosynthesis and role in iron metabolism, *Physiol. Rev.*, **58**: 317–396, 1978.
- [45] MURRAY M. T., WHITE K., MUNRO H. N., Conservation of ferritin heavy subunit gene structure: implications for the regulation of ferritin gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 7438–7442, 1987.
- [46] NOMURA M., GOURSE R., BAUGHMAN G., Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components, *Ann. Rev. Biochem.*, **53**: 75–117, 1984.
- [47] REEVES R., ELTON T. S., NISSEN M. S., LEHN D., JOHNSON K. R., Posttranscriptional gene regulation and specific binding of the nonhistone protein HMG-I by the 3' untranslated region of bovine interleukin 2 cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6531–6535, 1987.
- [48] ROUAULT T. A., HENTZE M. W., DANCIS A., CAUGHMAN W., HAROFRD J. B., KLAUSNER R. D., Influence of altered transcription on the translational control of human ferritin expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6335–6339, 1987.
- [49] ROGERS J., MUNRO H. N., Translation of ferritin light and heavy subunit mRNA is regulated by intracellular chelatable iron levels in rat hepatoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2277–2281, 1987.
- [50] SANTAMBROGIO P., MASSOVER W. H., Protein heterogeneity in rabbit liver ferritin: two types of molecular dimers, *Bioch. Bioph. Res. Com.*, **148**: 1363–1369, 1987.
- [51] SCHAEFER F. V., THEIL E. C., The effect of iron on the synthesis and amount of ferritin in red blood cells during ontogeny, *J. Biol. Chem.*, **256**: 1711–1715, 1981.
- [52] SCHERRER K., A cascade hypothesis revised, [w] CRC Rev. ed. Kolodny G. M., 169–219, 1980.
- [53] SCZEKAN S. R., JOSHI J. G., Isolation and characterization of ferritin from soyabeans (*Glycine max*), *J. Biol. Chem.*, **262**: 13780–13788, 1987.
- [54] SECKBACH J., Studies on the deposition of plant ferritin as influenced by iron supply to iron-deficient beans, *J. Ultrastruct. Res.* **22**: 413–423, 1968.
- [55] SHULL G. E., THEIL E. C., Translational control of ferritin synthesis by iron embryonic reticulocytes of the bullfrog, *J. Biol. Chem.*, **257**: 14187–14191, 1982.
- [56] – Regulation of ferritin mRNA: a possible gene-sparing phenomenon. *J. Biol. Chem.*, **258**: 7921–7923, 1983.
- [57] THEIL E. C., Amphibian red blood cell ferritin, *J. Biol. Chem.*, **248**: 622–628, 1973.
- [58] – Storage and translation of ferritin messenger RNA, in *Transl. Reg. of Gene Expression*, ed. Ilan J. Plenum Publ. Corp., 1987.
- [59] – Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**: 289–315; 1987.
- [60] WALDEN W. E., THACH R. E., Translational control of gene expression in normal fibroblast. Characterization of a subclass of mRNAs with unusual kinetic properties, *Biochem.*, **25**: 2033–2041, 1986.
- [61] WATANABE N., DRYSDALE J., Evidence for distinct mRNAs for ferritin subunits, *Bioch. Bioph. Res. Com.*, **98**: 507–511, 1981.
- [62] – Studies on heterogeneity in ferritin subunits, *Bioch. Bioph. Acta*, **743**: 98–105, 1983.

- [63] ZHRINGER J., KONIJN A. M., BALIGA B. S., MUNRO H. N., Mechanism of iron induction of ferritin synthesis, *Bioch. Bioph. Res. Com.*, **65**: 583–590, 1975.
- [64] ZHRINGER J., BALIGA B. S., MUNRO H. N., Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 857–861, 1976.
- [65] – Subcellular distribution of total poly(A)-containing RNA and ferritin mRNA in the cytoplasm of rat liver, *Bioch. Bioph. Res. Com.* **68**: 1088–1093, 1976.
- [66] ZHRINGER J., BALIGA B. S., DRAKE R. L., MUNRO H. N., Distribution of ferritin mRNA and albumin mRNA between free and membrane-bound rat liver polysomes, *Bioch. Bioph. Acta*, **474**: 234–244 1977.

Otrzymano: 9 listopada 1988.

Przyjęto: 28 grudnia 1988.

Adres autorów: ul. Noskowskiego 12, Poznań 61-704.

TERMINALNE KOMPLEKSY SYNTEZY CELULOZY

THE TERMINAL COMPLEXES OF CELLULOSE SYNTHESIS

Krystyna KUDLICKA

Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Streszczenie. W błonie komórek syntetyzujących celulozę znajdują się prawidłowo ułożone granularne struktury związane z syntezą łańcuchów glukanowych i krystalizacją mikrofibryli celulozowych. Układy tych granul nazwano kompleksami terminalnymi. Są one prawdopodobnie enzymami katalizującymi syntezę celulozy. Wyróżniono dwa główne typy strukturalne ułożenia podjednostek w kompleksie: układy liniowy i rozetkowy.

Syntetyzowane na powierzchni błony komórkowej mikrofibryle są układane według określonego wzoru determinowanego przypuszczalnie przez układ mikrotubul. Są jednakże pewne prace kwestionujące słuszność tej hipotezy.

Celuloza syntetyzowana w dużej ilości przez *Acetobacter xylinum* jest wydalana na zewnątrz komórki i może być otrzymana z kultury bakteryjnej prawie w chemicznie czystej formie. Prowadzone są badania mające na celu wykorzystanie kultur *Acetobacter* do przemysłowej produkcji celulozy.

Summary. It is assumed that the synthesis of cellulose in the cell is carried out by protein structures — terminal complexes — situated in cell membrane. Among a diversity of plant types only a limited number of specialized cellulose synthesizing complexes exist; these can be divided into two basic groups: complexes of subunits with a rosette configuration or complexes of subunits that form a linear pattern.

In walls of many algae and in the secondary walls of higher plants, microfibril deposition is highly oriented. The microfibrils are often deposited parallel to each other. The role of microtubules in directing this orientation is now disputed by many authors.

Acetobacter xylinum, unlike algae or higher plants, synthesizes cellulose not as a cell wall component but as an extracellular secretion. The synthesis is catalysed by enzymes located linearly along the main axis of the cell. Cellulose microfibrils, secreted through pores in cell envelope, associate into bands, which finally form one ribbon. Obtaining *Acetobacter xylinum* cellulose in purified form is relatively easy, therefore, this organism has attracted the attention of industry in recent years.

WSTĘP

Celuloza jest jednym z najbardziej obficie występujących naturalnych polimerów (polikondensatów) wykorzystywanych na dużą skalę w przemyśle. Gromadzi się ona głównie w ścianach komórek drewna większości roślin, we włóknach lnu, a także duże ilości celulozy pochodzą z włosków bawełny, zwanych potocznie włóknami. Ściany komórkowe nie są zbudowane z czystej celulozy, ale zawierają też pektyny, hemicelulozę oraz ligninę i dlatego w przemyśle składnik celulozowy musi być ekstrahowany i oczyszczany. Rocznie na ziemi syntetyzuje się i degraduje przeszło 10 mld t celulozy [4].

W roku 1985 światowa produkcja masy celulozowej wynosiła 140 mln, a produkcja bawełny około 17,5 mln t [7]. Produkty zawierające dużo celulozy przez wieki były wykorzystywane na opał, do wytwarzania ubrań oraz do budowy domów; jej użyteczność w świecie, mimo ogromnie rozbudowanego przemysłu włókien sztucznych, wzrasta. Ze względu więc na to laboratoria wielu krajów badają strukturę i mechanizmy syntezy celulozy w żywych komórkach. Podejmuje się też liczne próby syntezy celulozy *in vitro* z komórkowych ekstraktów, ale dotychczas nie udało się uzyskać wydajnej i prostej techniki takiej syntezy [12, 13, 42].

Celuloza jest homopolimerem (według ścisłej nomenklatury produktem kondensacji) złożonym z dziesiątków tysięcy podjednostek złączonych wiązaniami β -1,4 glukozydowymi w łańcuchy glukanowe. Podjednostka ta składa się z dwu cząsteczek glukozy połączonych ze sobą w taki sposób, że jedna jest obrócona o 180° w stosunku do drugiej (ryc. 1A). Między bocznymi grupami hydroksylowymi łańcuchów glukanowych tworzą się wiązania wodorowe, które umożliwiają łączenie się przylegających łańcuchów w krystaliczne mikrofibryle – podstawowe jednostki budujące ściany komórkowe (ryc. 1B).

Wymiary (grubość) mikrofibryli znajdujących u różnych roślin, a nawet w różnych stadiach rozwoju komórki mogą być różne:

1. Najmniejsze mikrofibryle, nazwane subelementarnymi fibrylami, mają grubość 1,5 nm; były one obserwowane w kambium różnych roślin [25] i w śluzie pigwy [17].

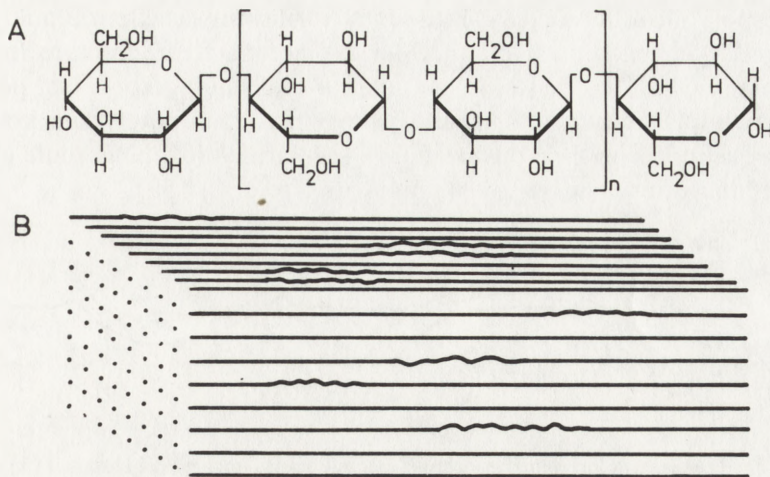
2. Elementarne fibryle grubości 3,5 nm występują w pierwotnych ścianach roślin wyższych [54] oraz syntetyzowane są przez *Acetobacter xylinum* [10].

3. Mikrofibryle grubości 5–10 nm znajdowane były we wtórnych ścianach drewna [33].

4. Mikrofibryle grubości 10–20 nm występują we włóknach ramii (za [12]).

5. Duże mikrofibryle, grubości 50–200 nm, występują w ścianach komórek glonów morskich [54].

Mikrofibryle celulozowe można zobaczyć dopiero w mikroskopie elektronowym; obserwował je po raz pierwszy (w 1933 r.) we włoskach bawełny Ernst



Ryc. 1. A. Strukturalny wzór wycinka łańcucha celulozy. B. Równoległe ułożenie łańcuchów glukanowych w mikrofibryli

Ruska z Uniwersytetu w Berlinie [61]. Ten pierwszy biologiczny obiekt, badany w mikroskopie elektronowym, jest prawie czystą celulozą. Ruska nie widział zbyt wielu szczegółów. Zauważono je dopiero kilka lat później, kiedy zaczęto kontrastować preparaty i robić repliki powierzchni ściany komórkowej.

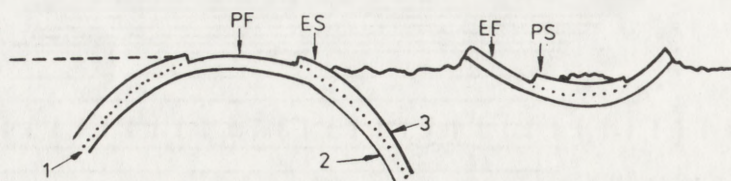
Ze względu na gospodarcze i biologiczne znaczenie celulozy prowadzono wiele badań nad strukturą i rozwojem mikrofibryli celulozowych oraz nad syntezą celulozy. Jednak problemy te nie są całkiem wyjaśnione i pozostają nadal bez odpowiedzi trzy główne pytania:

1. Jak mikrofibryle są syntetyzowane?
2. Jak w trakcie syntezy mikrofibryle są układane na powierzchni błony komórkowej?
3. Jak ułożenie mikrofibryli wpływa na wzrost i rozwój komórki?

LOKALIZACJA I STRUKTURA KOMPLEKSÓW TERMINALNYCH

Pierwsza, do dziś aktualna hipoteza wyjaśniająca mechanizm syntezy mikrofibryli pochodzi sprzed 30 lat [60]. Przypuszczano wtedy, że syntezę katalizuje enzym zlokalizowany na rosnącym wierzchołku mikrofibryli. Ta hipoteza została w 1964 r. uzupełniona przez Prestona, a przedstawiony model nazwano hipotezą uporządkowanych granul [53]. Była ona oparta na wynikach analizy preparatów kontrastowo nasypanych. Na wewnętrznej warstwie ściany splazmolizowanych komórek glonu *Chaetomorpha* obserwowano granu-

larne zespoły ułożone w rzędy, które były w bliskim sąsiedztwie mikrofibryli. W późniejszych badaniach glonu *Oocystis* metodą freeze-fracture (mrożenia i łamania) wykazano, że takie granularne elementy zespołu są połączone z błoną cytoplazmatyczną i uznano je wówczas za hipotetyczne kompleksy syntetazy celulozowej. Przypuszczano, że regularnie ułożone granule określają ułożenie mikrofibryli w ścianie komórkowej (ryc. 2) [59].

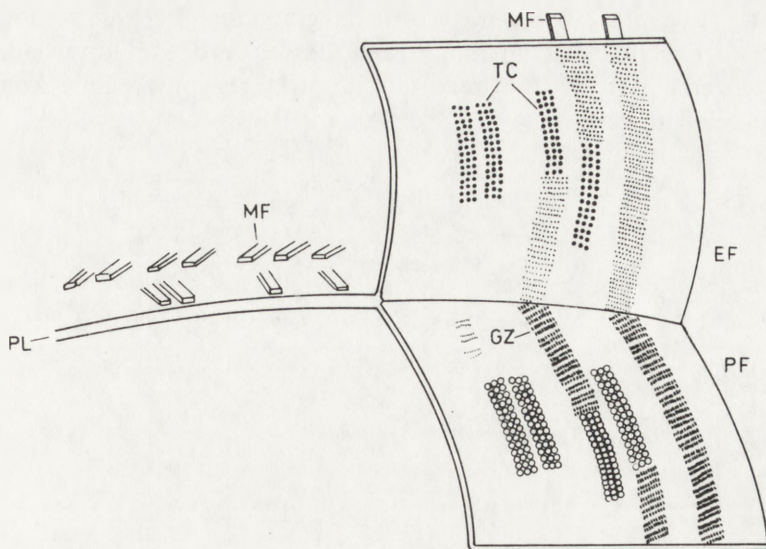


Ryc. 2. Błony komórkowe przelamane techniką freeze-fracture (mrożenia i łamania) [3]. Technika ta obejmuje szybkie mrożenie tkanki, rozłamanie podwójnej warstwy lipidowej błony komórkowej, odsłonięcie warstw wewnętrznych i odparowanie lodu z powierzchni. W ten sposób uzyskuje się 4 powierzchnie: PS — powierzchnia od strony cytoplazmy, PF — wewnętrzna warstwa wewnętrznej błony komórkowej, EF — wewnętrzna warstwa zewnętrznej błony lipidowej, ES — zewnętrzna powierzchnia. 1 — podwójna warstwa lipidowa błony komórkowej, 2 — błona wewnętrzna plazmalemy, 3 — błona zewnętrzna plazmalemy, - - - - - — powierzchnia łamania, ~~~~~ — powierzchnia odparowania lodu

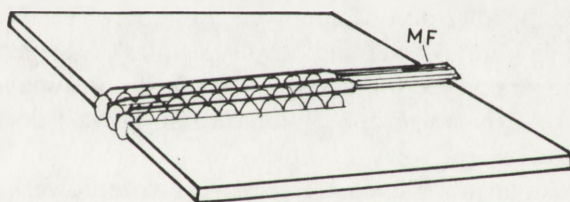
Położenie tych granularnych podjednostek dokładnie opisali Brown i Montezinos z Zakładu Botaniki Uniwersytetu w Teksasie [9, 47]. Podjednostki te znajdują się na wewnętrznej powierzchni wewnętrznej warstwy błony komórkowej (PF), a wewnętrzna warstwa styka się z cytoplazmą (ryc. 3).

Dodatkowo na wewnętrznej powierzchni zewnętrznej warstwy (EF) autorzy obserwowali nieco inny typ liniowo uporządkowanych granul, przypuszczalnie białkowych, przy których prawie zawsze widoczne były końce mikrofibryli. Taki liniowo ułożony zespół struktur białkowych nazwali terminalnym kompleksem i jest on do dziś uważany za właściwą syntetazę celulozy. Natomiast zespoły struktur granularnych w wewnętrznej warstwie błony, opisane dawniej [59], mają jedynie wpływ na kierunek wydłużania się mikrofibryli [47], a nie są kompleksami enzymatycznymi, jak przypuszczano.

W komórkach dużych morskich glonów *Valonia* i *Boergesenia* liniowe kompleksy terminalne są inaczej umiejscowione w błonie komórkowej niż u organizmów już opisanych, co pokazuje ryc. 4 [35, 36, 40, 41]. Podjednostki kompleksu terminalnego są nieco wydłużone i tkwią w błonie komórkowej, tak że jeden wierzchołek podjednostki jest na poziomie zewnętrznej powierzchni, a drugi wystaje nad wewnętrzną powierzchnię błony i jest zagłębiony w cytoplazmie. Liniowe kompleksy terminalne były obserwowane u *Oocystis apiculata* [9], *Oocystis solitaria* [55, 57], *Glaucozystis nostochinearum* [68], *Valonia*



Ryc. 3. Hipotetyczne, liniowe kompleksy terminalne w błonie komórkowej glonu *Oocystis*. Z lewej strony przekrój poprzeczny przez plazmalemę (PL), z prawej – błona komórkowa jest rozdzielona metodą freeze-fracture i widoczne są wewnętrzne powierzchnie EF i PF. Na powierzchni EF – czarne kropki – podjednostki ułożone w liniowe kompleksy terminalne – TC. W odpowiadających podjednostkom miejscach na powierzchni PF – kuleczki – zagłębienia po podjednostkach kompleksów. GZ – granularne zespoły na powierzchni PF i ich odciski w postaci drobnych kropek na EF. MF – mikrofibryle na powierzchni błony komórkowej

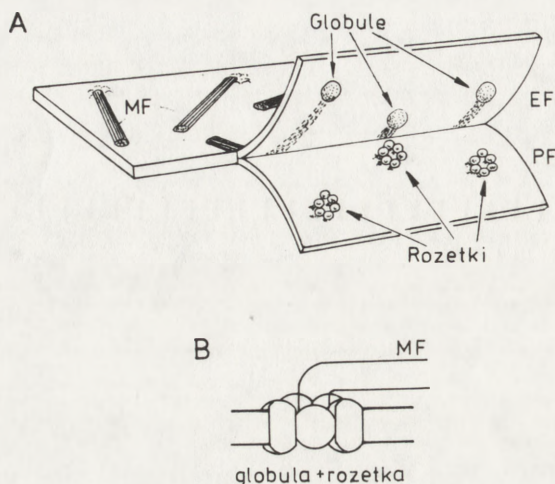


Ryc. 4. Podjednostki tworzące liniowy kompleks terminalny w błonie komórkowej *Valonia* i *Boergesenia*. MF – mikrofibryla powstająca z łączących się łańcuchów glukanowych wychodzących z podjednostek

macrophysa [35], *Boergesenia forbesii* [36, 40, 41], *Boodlea coacta* [46], *Microdictyon* i *Chaetomorpha* [5].

Inaczej niż u wymienionych roślin wyglądały kompleksy terminalne w błonie komórkowej glonu *Micrasterias*, badanego również metodą freeze-fracture [18]. Kompleks taki składa się z 3–175 heksagonalnych rozetek ułożonych w rzędy na wewnętrznej warstwie błony komórkowej (PF). Każda rozетка składa się z sześciu kulistych części. Niekiedy podobne, ale pojedyncze kuliste

cząstki, nazwane przez Muellera i Browna globulami [49], są widoczne na zewnętrznej (EF) powierzchni błony komórkowej (ryc. 5). Odpowiadają one centrom rozetek i razem z rozetkami stanowią przypuszczalnie kompleksy syntetyzy celulozowej [18, 49].



Ryc. 5. Rozetkowe kompleksy terminalne uwidocznione techniką freeze-fracture, występujące u niektórych glonów, mszaków, paprotników i roślin nasiennych. A. Rozetki i globule na odpowiadających sobie powierzchniach PF i EF błony komórkowej. B. Pojedynczy kompleks składający się z rozetki i globuli i wychodząca z niego mikrofibryla (MF)

Z wcześniejszych badań może wynikać, że kuliste struktury kompleksu pochodzą z pęcherzyków diktiosomalnych [14, 37, 38]. Na preparatach bowiem, przy ścianie komórkowej, znajdowały się płaskie pęcherzyki z małymi, 20 nm granulkami, prawdopodobnie pochodzenia diktiosomalnego. Niektóre z tych pęcherzyków były połączone z błoną komórkową i dostarczały w ten sposób prekursorów do budowy kompleksów terminalnych.

Poza wspomnianym już glonem *Micrasterias*, rozetkowe kompleksy były także obserwowane w komórkach glonów *Closterium* [34] i *Spirogyra* [29], mchu *Funaria* [56], paprotników *Adiantum* [66], *Psilotum* [5], skrzypu *Equisetum* [15] i w komórkach roślin nasiennych: *Ginkgo* [5], niektórych zbóż [49–51], soi [32], fasoli [30], rzodkiewki [63] i we włoskach bawełny [67]. Najwyraźniejsze rozetkowe kompleksy były widoczne w komórkach glonów, prawdopodobnie dlatego, że mikrofibryle celulozowe w ścianach tych komórek są dużo większe niż w ścianach pozostałych roślin [12].

Pomimo dużej różnorodności przebadanych roślin wyróżniono tylko dwa główne typy strukturalne kompleksów terminalnych: liniowe i rozetkowe [5].

Należy również wspomnieć o zupełnie innych poglądach na temat syntezy mikrofibryli celulozowych wyrażonych w pracach Grouta [19], a silnie

popieranych przez Colvina [11]. Grout uważał, że nie ma żadnych kompleksów terminalnych w komórkach roślinnych. Synteza celulozy odbywa się przez stosunkowo wolne gromadzenie jej prekursorów w zewnętrznej części błony komórkowej, następnie prekursory te szybko precypitują i krystalizują w rosnącą mikrofibryłę bez udziału enzymów. Poglądy te były oparte na badaniu metodą deep-etching (głębokiego rytowania) zewnętrznej powierzchni błony komórkowej protoplastów tytoniu, regenerujących ścianę komórkową. Po 16 godz. autor nie widział kompleksów terminalnych w błonie komórkowej, chociaż na powierzchni były mikrofibryle. Wiadomo jednak, że kompleksy, jeśli są wtopione w błonę komórkową, mogą być widoczne tylko wtedy, kiedy zostanie odsłonięta wewnętrzna powierzchnia błony przez rozdzielenie jej części zewnętrznej od wewnętrznej, jak w metodzie freeze-fracture.

KOMPLEKSY TERMINALNE JAKO SYNTETAZY CELULOZOWE

Nie ma bezpośrednich dowodów na to, że kompleksy terminalne są rzeczywiście enzymami syntetyzującymi celulozę, ale wiele faktów przemawia za słusznością takiego przypuszczenia. Po pierwsze, kompleksy liniowe były obserwowane w połączeniu z końcami mikrofibryli [5, 9, 35, 36, 40, 41, 55, 57]. Po drugie, czynniki przerywające lub zakłócające syntezę celulozy (EDTA u *Oocystis* [48]) albo barwniki do wykrywania celulozy – czerwień Kongo czy Calcofluor (kwas 4,4'-bis (4-anilino-6-bis-(2-hydroksyetylo)amino-s-triazyno (-2-ylamino)-2-2'-stilbeno)-disulfonowy) u *Boergesenia* [36] i *Oocystis* [57] powodują zmianę struktury lub zanik kompleksów terminalnych. Kiedy synteza była wznawiana, pojawiały się ponownie normalnie zbudowane kompleksy. Po trzecie, liczba podjednostek w tych kompleksach jest zbliżona do liczby łańcuchów glukanowych w powstających mikrofibrylach [9, 36]. Po czwarte, kompleksy liniowe u *Valonia* i *Boergesenia* są większe niż u *Oocystis* i ta różnica jest zgodna z rozmiarem ich mikrofibryli.

Nieco trudniej wyjaśnić, jak funkcjonują kompleksy typu rozetkowego. Związek takich kompleksów z mikrofibrylami jest często trudny do stwierdzenia. Nawet w błonie najdokładniej zbadanego pod tym względem glonu *Micrasterias*, w pobliżu rozetek widoczne były tylko rowkowate zagłębienia będące odciskami mikrofibryli, które prawdopodobnie stykały się z rozetkami [18].

Najbardziej przekonującego jak dotąd dowodu, że rozetki i globule na przeciwnych powierzchniach błony mogą być częściami kompleksu syntetazy celulozowej dostarczył Hearsh [31]. Metodą podwójnej repliki analizował on rozmieszczenie takich kompleksów w rozwijających się elementach ksylemu u *Lepidium sativum*. Liczne, mało wyraźne globule znajdowały się na powierz-

chni warstwy wewnętrznej (EF), a wyraźne rozetki — na powierzchni zewnętrznej (PF) błony komórkowej. Najważniejszy jest fakt, że rozetki i globule były ograniczone do regionu, gdzie tworzy się ściana wtórna i tempo syntezy celulozy jest najwyższe.

Organizmy mające syntetazy celulozowe w postaci małych rozetek i globul zawierają też małe elementarne fibryle. W organizmach z większymi mikrofibrylami rozetki i globule są połączone w większe kompleksy. Duże, krystaliczne mikrofibryle znajduje się u organizmów mających kompleksy liniowe. Wskazuje to na istnienie związku między syntezą mikrofibryli a układem podjednostek w kompleksach terminalnych różnego typu i wielkości [13].

ROLA MIKROTUBUL W UŁOŻENIU MIKROFIBRYLI

W ścianach wielu glonów i we wtórnych ścianach roślin wyższych mikrofibryle są ułożone w bardzo regularne warstwy. Ściana wtórna niektórych elementów ksylemu jest zbudowana z mikrofibryli tworzących charakterystyczne spirale. Wielu badaczy sądzi, że na ułożenie mikrofibryli wpływają w jakiś sposób mikrotubule [20, 26, 27, 40, 43, 44, 58, 62–64]. W mikroskopie elektronowym bowiem często widać, że mikrotubule leżą równolegle do nowo zsyntetyzowanych mikrofibryli. Proces układania się mikrofibryli w regularne warstwy może być zaburzony przez kolchicynę i inne związki, które niszczą mikrotubule [13].

Według ostatnich badań kompleksy terminalne nie są bezpośrednio połączone z mikrotubulami. Sugeruje to, że kompleksy terminalne nie są przesuwane przez mikrotubule, lecz funkcję tę pełnią siły wytwarzane podczas polimeryzacji łańcuchów glukanowych w mikrofibryle, czyli kompleksy terminalne są przesuwane wzdłuż błony komórkowej przez wydłużające się mikrofibryle [13]. Koncepcja ta jest popierana obrazami filmowymi ruchów, które wykonują komórki *Acetobacter xylinum* podczas syntezy celulozy [10]. Syntetyzowane mikrofibryle celulozowe wydostając się z komórki odpychają ją w przeciwnym kierunku. Można więc wysunąć wniosek, że ruch komórki jest powodowany przez siły wytwarzane w czasie polimeryzacji i krystalizacji mikrofibryli. Skoro zatem siły uwalniane w czasie krystalizacji mikrofibryli są wystarczające do nadania ruchu całej komórce bakterii, to powinny również wystarczyć do przemieszczania kompleksów terminalnych w błonie komórkowej, te zaś układają mikrofibryle we wzór właściwy ścianie komórkowej [28].

Chociaż kompleksy terminalne i mikrotubule nie są bezpośrednio połączone, to mogą być położone blisko siebie. Czasem w rosnących komórkach glonów mikrotubule przylegają ściśle do błony komórkowej. Wskutek ich nacisku błona ulega pofałdowaniu i tworzą się rowkowate zagłębienia. Mogą

one nadawać kierunek przesuającym się wewnątrz błony terminalnym kompleksom syntetazy, stanowiącym element błony [13].

Techniką immunofluorescencji badano zróżnicowanie elementów ksylemu w hodowli komórek rośliny ozdobnej *Zinnia* [16, 45]. Dostarczono nowych dowodów, które potwierdzają zależności między układem mikrotubul a powstawaniem mikrofibryli. W różnicujących się elementach ksylemu układ powierzchniowych mikrotubul przypominał późniejszy spiralny układ mikrofibryli celulozy w ścianie wtórnej. Jeżeli traktować komórki syntetyzujące ścianę wtórną odpowiednimi chemikaliami (taksolem), to można nie dopuścić do wytworzenia się spiralnego układu mikrotubul. Wtedy mikrotubule pozostają w ustabilizowanym siatkowym wzorze i wówczas w ścianie wtórnej nie wytworzy się spiralny układ mikrofibryli [13]. Na tej podstawie wysunięto wniosek, że spiralnie ułożone mikrotubule warunkują odpowiednie spiralne zgrubienie w komórkach ksylemu [43–45].

Inne badania wykazują, że taki spiralny układ zgrubień jest wynikiem samoistnego montażu, w którym nie biorą udziału mikrotubule [52, 65]. Nie działają one również przy tworzeniu zewnętrznych szkieletów zwierząt [2]. Tak samoistnie mogą się montować tylko wydłużone cząsteczki, zawierające krótkie i elastyczne boczne łańcuchy. Celuloza nie spełnia tych warunków, ale w połączeniu z innymi polisacharydami ściany (ksyloglukan [24] lub glukuronoksylan [65]) mogłaby przybrać strukturę zbliżoną do struktury warunkującej tworzenie spiralnego kształtu. Hipotezę tę podtrzymują obserwacje drewna lipy, w którym stwierdzono, że spiralne zgrubienia znajdowane są tylko w regionach ściany, gdzie jest zawsze obecny glukuronoksylan [65]. W omawianym teraz modelu bezpośredni udział mikrotubul w ułożeniu kompleksów syntetazy celulozowej jest więc odrzucany. Mikrotubule natomiast mogą kierować do powierzchni komórki pęcherzyki zawierające polisacharydy lub nowo zsyntetyzowane komponenty kompleksów syntetazy celulozowej [13].

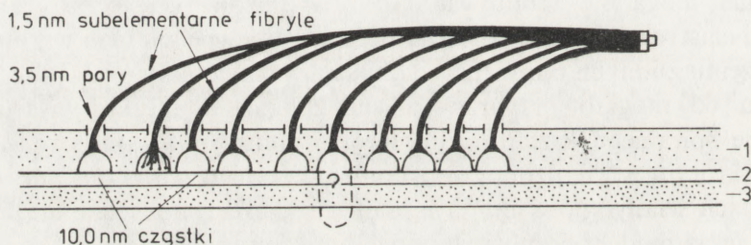
SYNTEZA CELULOZY PRZEZ *ACETOBACTER XYLINUM*

Acetobacter xylinum syntetyzuje wysoce krystaliczne mikrofibryle celulozowe i wydala je na zewnątrz w postaci długiej wstążki, która zostaje przyczepiona do boku wydłużonej komórki [10]. Inne rodzaje, oprócz *Acetobacter*, z tej samej grupy bakterii Gram-ujemnych (*Alcaligenes*, *Rhizobium*) również syntetyzują celulozę, ale w mniejszych ilościach [6, 12]. Do syntezy celulozy *Acetobacter* jako substratu zużywa glukozę [10]. Kiedy jego komórki hodowane są w płynnej, nie mieszanej pożywce, na powierzchni powstaje galeretowata warstwa złożona z poplątanych wstążek celulozy i komórek. Celuloza jest najobficiej syntetyzowana na powierzchni takiej warstwy. Przez cały czas

hodowli część komórek z warstwy powierzchniowej jest spychana w dół i przechodzi stopniowo w coraz głębsze warstwy kultury, w których aktywność syntetyzująca znacznie maleje, a nawet ustaje [39].

W mikroskopie elektronowym celuloza *Acetobacter* jest widoczna jako skręcona spiralnie wstążka. Skręty te powstają w czasie syntezy na skutek obrotu komórki dokoła własnej osi [10].

Metodą freeze-fracture wykazano w otoczce komórkowej rząd cząstek ułożonych wzdłuż długiej osi komórki [6, 7, 22]. Cząstki te są przypuszczalnie podjednostkami kompleksów syntetyzujących łańcuchy glukanowe. Kompleksy te nie przemieszczają się w błonie komórkowej, tak jak kompleksy w błonie komórek glonów i roślin wyższych, dlatego nazwano je stacjonarnymi kompleksami terminalnymi [6, 7, 21]. Są one położone nad porami perforującymi lipopolisacharydową otoczkę bakterii [70]. Pory takie są zatem kanałami, przez które wydostają się pojedyncze mikrofibryle. Mikrofibryle z sąsiednich otworków łączą się formując wiązki, a te z kolei tworzą wstążkę. (ryc. 6) [21, 22].

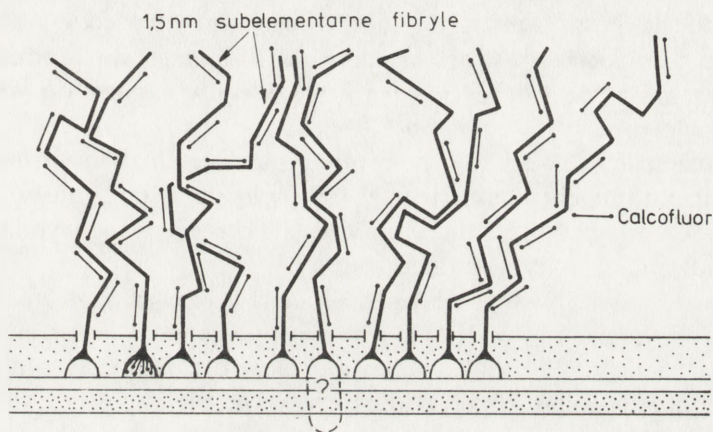


Ryc. 6. Proponowany model syntezy celulozy przez *Acetobacter xylinum*. W jednej podjednostce kompleksu łańcuchy glukanowe łączą się w subelementarne mikrofibryle, które wychodząc przez pory na zewnątrz komórki łączą się w wiązki, a te z kolei we wstążkę; 1 - lipopolisacharydowa otoczka, 2 - przestrzeń peryplazmatyczna, 3 - plazmalemma, 10 nm cząstki - podjednostki kompleksów terminalnych, ? - nie wiadomo dokładnie, czy kompleksy terminalne są umieszczone tylko w otoczce lipopolisacharydowej, czy także w błonie komórkowej

Ukazało się wiele publikacji Colvina dotyczących syntezy celulozy przez *Acetobacter xylinum*, które nie są zgodne z opisanym poglądem [11]. Według niego, enzymy w komórce produkują rozpuszczalne prekursory celulozy, które są wydzielane na zewnątrz komórki i w jakiś sposób przetwarzane do formy krystalicznej celulozy bez udziału enzymów. Ale badania metodą freeze-fracture i na materiale utrwalonym chemicznie nie potwierdzają tych poglądów, lecz dostarczają dowodów na istnienie enzymów w lipidowej warstwie otoczki bakteryjnej [1, 22, 39, 70].

PERSPEKTYWY

W ostatnich latach przemysł wykazuje duże zainteresowanie celulozą syntetyzowaną przez *Acetobacter*, ponieważ można ją stosunkowo łatwo otrzymać w czystej formie. Oprócz tego, w czasie syntezy z powstającymi łańcuchami glukanowymi mogą wiązać się niektóre związki chemiczne, np. optyczny prześwielacz – Calcofluor, barwnik czerwień kongo czy karboksymetyloceluloza (CMC). Komponenty te dodane do pożywki w czasie syntezy współzawodniczą w tworzeniu wiązań wodorowych i zmieniają otrzymany produkt (ryc. 7) [1, 8, 21, 23].



Ryc. 7. Model syntezy celulozy w obecności Calcofluoru. Związek ten łączy się z zespołami łańcuchów glukanowych, wychodzących przez pory i zapobiega tworzeniu wiązań wodorowych, nie dopuszczając do wytworzenia wstawki

Obserwacje te są bardzo interesujące z teoretycznego i praktycznego punktu widzenia. Reakcje z Calcofluorem wskazują, że polimeryzacja i krystalizacja są procesami ściśle połączonymi, ale niezależnymi od siebie. Kiedy krystalizacja zostaje przerwana przez wspomniane czynniki, wówczas tempo polimeryzacji wzrasta [1]. Wskazuje to, że krystalizacja jest procesem limitującym syntezę. Reakcja z Calcofluorem jest całkowicie odwracalna, ponieważ związek ten działa przypuszczalnie tylko na powierzchnię komórki w pobliżu miejsca polimeryzacji łańcuchów glukanowych. Po wymyciu go buforem synteza normalnej celulozy zostaje wznowiona [23].

Być może w przyszłości *Acetobacter xylinum* będzie stosowany do przemysłowej produkcji celulozy, ponieważ ma on wiele zalet. Po pierwsze, wysuszona warstwa hodowlana przypomina cienki pergaminowy papier. Można jej nadać dowolny kształt, stosując odpowiednie naczynie hodowlane. Po drugie, warst-

wa ta, oprócz komórek bakterii, zawiera czystą celulozę; nie wymaga więc skomplikowanego procesu oczyszczania. Po trzecie, własności celulozy mogą być zmienione w czasie syntezy, dlatego można otrzymać wiele nowych produktów przez kontrolowane zaburzanie procesów krystalizacji i polimeryzacji. Mikrofibryle celulozowe mogą również łączyć się z innymi polimerami, stając się w ten sposób syntetyczno-naturalnym produktem o nowych właściwościach [7]. Po czwarte, tempo syntezy celulozy jest bardzo wysokie. Jeśli np. udało się stworzyć ciągłą hodowlę bakteryjną o powierzchni 1 akra (0,4 ha), to w ciągu jednego roku można otrzymać 11 350 kg celulozy. Natomiast 1 akr uprawy bawełny daje w ciągu roku 300 kg celulozy. A więc wydajność syntezy celulozy bakteryjnej jest około 35 razy wyższa niż plon bawełny [4, 7]. Ale proces biotechnologiczny w tej chwili jeszcze jest zbyt kosztowny, głównie ze względu na koszt substratu glukozowego. Na niewielką skalę celuloza bakteryjna jest obecnie wykorzystywana na Filipinach do produkcji deseru pod nazwą „Nata de Cocoa” i przez firmę Sony w Japonii do wytwarzania membran głośnikowych.

Coraz częściej są podejmowane próby syntezy celulozy *in vitro* za pomocą enzymów izolowanych z bakterii [13, 42]. Wydajność tej syntezy jest jednak zbyt mała w porównaniu z syntezą *in vivo*, ale otrzymywane wyniki zachęcają do prowadzenia tego typu badań.

Przypuszcza się również, że będzie można izolować z *Acetobacter* geny kodujące enzymy odpowiedzialne za syntezę celulozy i przenieść je do samożywnej sinicy *Nostoc*. Celuloza mogłaby być wówczas syntetyzowana kosztem glukozy pochodzącej z fotosyntezy [4, 6].

PODZIĘKOWANIE

Dziękuję serdecznie prof. Bohdanowi Rodkiewiczowi za cenne uwagi i pomoc przy opracowaniu niniejszej pracy.

LITERATURA

- [1] BENZIMAN M., HAIGLER C. H., BROWN R. M. Jr., WHITE A. R., COOPER K. M., Cellulose biogenesis: Polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, No 11: 6678–6682, 1980.
- [2] BOULIGAND Y., Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases. Tissue Cell, 4: 189–217, 1972.
- [3] BRANTON D., BULLIVANT S., GILULA N. B., KARNOWSKY M. J., MOOR H., MUHLETHALER K., NORTHCOTE D. H., PACKER L., SATIR B., SPETH U., STAEHELIN L. A., STEER P. L., WEINSTEIN R. S., Freeze-etching nomenclature, Science, 190: 54–56, 1975.
- [4] BROWN R. M. Jr., Biogenesis of Cellulose: — Bacteria, plants, and animals can all synthesise

- the most abundant macromolecule on this planet, *Discovery – Research and Scholarship at the University of Texas at Austin*, 9 (4), Austin, Texas, USA, 1985.
- [5] – Cellulose microfibril assembly and orientation: recent developments, *J. Cell Sci. Suppl.*, **2**: 13–32, 1985.
- [6] – Microbial synthesis of cellulose, [w] *Bio Expo. 85*, O. R. Zaborsky Ed., Cahners Exposition Group, Stamford, Connecticut, 1985, 325–335.
- [7] – Sources of cellulose: A different perspective, (w) *TAPPI Proceedings – International Dissolving Pulps Conference*, 1987, 1–5.
- [8] BROWN R. M. Jr., HAIGLER C. H., Experimental induction of alters nonmicrofibrillar cellulose, *Science*, **218**: 1141–1142, 1982.
- [9] BROWN R. M. Jr., MONTEZINOS D., Cellulose microfibrils: Visualization of biosynthetic and orienting complexes in association with the plasma membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 143–147, 1976.
- [10] BROWN R. M. Jr., WILLISON R. H. M., RICHARDSON C. L., Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurements of the in vivo process, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 4565–4569, 1976.
- [11] COLVIN J. R., Biosynthesis of cellulose, [w] *The biochemistry of plants*, J. Priess Ed., Academic Press, New York 1980, 543–570.
- [12] DELMER D. P., Biosynthesis of cellulose, *Adv. in Carbohydrate Chem. and Biochem.*, **41**: 105–151, 1983.
- [13] – Cellulose biosynthesis, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **38**: 259–290, 1987.
- [14] DOBBERSTEIN B., KIERMAYER O., Das Austreten eines besonderen Types von Golgivesikeln während der Sekundarwandbildung von *Micrasterias*, *Protoplasma*, **75**: 185–194, 1972.
- [15] EMONS A. M. C., Plasma membrane rosettes in root hairs of *Equisetum hyemale*, *Planta*, **163**: 350–359, 1985.
- [16] FALCONER M. M., SEAGULL R. W., Immunofluorescent and Calcofluor White staining of developing tracheary elements in *Zinnia elegans* L. cultures, *Protoplasma*, **125**: 190–198, 1985.
- [17] FRANKE W. W., ERMEN B., Negative staining of plant slime cellulose: an examination of the elementary fibril concept, *Z. Naturforsch.*, **246**: 918–922, 1969.
- [18] GIDDINGS T. H. Jr., BROWER D. L., STAEHELIN L. A., Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils in the primary and secondary cell walls, *J. Cell Biol.*, **84**: 327–339, 1980.
- [19] GROUT B. B. W., Cellulose microfibril deposition at the plasmalemma surface of regenerating tobacco mesophyll protoplasts: A deep-etch study, *Planta*, **123**: 275–282, 1975.
- [20] GUNNING B. E. S., HARDHAM A. R., Microtubules, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**: 651–698, 1982.
- [21] HAIGLER C. H., The functions and biogenesis of native cellulose, [w] *Cellulose Chemistry and its Applications*, Chichester U. K. Horwood, **2**: 30–83, 1985.
- [22] HAIGLER C. H., BENZIMAN M., Biogenesis of cellulose I microfibrils occurs by cell-directed self-assembly in *Acetobacter xylinum*, [w] *Cellulose and Other Natural Polymer System*, R. M. Brown Jr. Ed., 1982, 273–297.
- [23] HAIHLER C. H., BROWN R. M. Jr., BENZIMAN M., Calcofluor White ST alters in vivo assembly of cellulose microfibrils, *Science*, **210**: 903–906, 1980.
- [24] HAYASHI T., MACLACHLAN G., *Pea xyloglucan* and cellulose. I. Macromolecular organisation, *Plant Physiol.*, **75**: 596–604, 1984.
- [25] HANNA R. B., COTE W. A. Jr., The sub-elementary fibril of plant cell wall cellulose, *Cytobiologie*, **10**: 102–116, 1974.

- [26] HEATH I. B., A unified hypothesis for the role of membrane bound enzyme complexes and microtubules in plant cell wall synthesis, *J. Theor. Biol.*, **48**: 445-449, 1974.
- [27] HEATH I. B., SEAGULL R., Oriented cellulose fibrils and the cytoskeleton, [w] *The Cytoskeleton in Plant Growth and Development*, C. W. Lloyd Ed., Academic Press, London 1982.
- [28] HERTH W., Calcofluor White and Congo Red inhibit chitin microfibril assembly of *Poterioochromonas*: Evidence for a gap between polymerisation and microfibril formation, *J. Cell Biol.*, **87**: 442-450, 1980.
- [29] – Arrays of plasma membrane „rosettes” involved in cellulose microfibril formation of *Spirogyra*, *Planta*, **159**: 347-356, 1983.
- [30] – Oriented “rosette” alignment during cellulose formation in mung bean hypocotyl, *Naturwissenschaften*, **71**: 216-217, 1984.
- [31] – Plasma membrane rosettes involved in localized wall thickening during xylem vessel formation of *Lepidium sativum* L., *Planta*, **164**: 12-21, 1985.
- [32] HERTH W., WEBER G., Occurrence of the putative cellulose synthesizing “rosettes” in the plasma membrane of *Glycine max* suspension culture cells, *Naturwissenschaften*, **71**: 133-154, 1984.
- [33] HODGE A. J., WARDROP A. B., An electron-microscopic investigation of the cell-wall organisation of *Conifer tracheids*, *Nature*, **165**: 272-279, 1950.
- [34] HOGETSU T., Distribution and local activity of particle complexes synthesizing cellulose microfibrils in the plasma membrane of *Closterium acerosum* (Schrank) Ehrenberg, *Plant Cell Physiol.*, **24**: 777-781, 1983.
- [35] ITOH T., BROWN R. M. Jr., The assembly of cellulose microfibrils in *Valonia macrophysa* Kunz, *Planta*, **160**: 372-381, 1984.
- [36] ITOH T., O'NEIL R. M., BROWN R. M. Jr., Interference of cell wall regeneration of *Boergeresia forbesii* protoplasts by Tinopal LPW, a fluorescent brightening agent, *Protoplasma*, **123**: 174-183, 1984.
- [37] KIEMAYER O., DOBBERSTEIN B., Membrankomplexe dictyosomaler Herkunft als “Matrizen” für die extraplasmatische Synthese und Orientierung von Mikrofibrillen, *Protoplasma*, **77**: 437-451, 1973.
- [38] – Cytoplasmic basis of morphogenesis in *Micrasterias*, [w] *Cytomorphogenesis of plants*, Kiermayer O. Ed., **8**: 147-189. Springer, New York, 1981.
- [39] KUDLICKA K. 1986 – nie publikowane.
- [40] – Visualization of cellulose synthesizing structures in sectioned material, [w] *TAPPI Proceedings – International Dissolving Pulps Conference*, 1987, 121-124.
- [41] KUDLICKA K., WARDROP A. B., ITOH T., BROWN R. M. Jr., Further evidence from sectioned material in support of the existence of a linear terminal complexes in cellulose synthesis, *Protoplasma*, **136**: 96-103, 1987.
- [42] LIN F. C., BROWN R. M. Jr., COOPER J. B., DELMER D. P., Synthesis of fibrils in vitro by solubilized cellulose synthase from *Acetobacter xylinum*, *Science*, **230**: 822-825, 1985.
- [43] LLOYD C. W., Toward a dynamic helical model for the influence of microtubules on wall patterns in plants, *Int. Rev. Cytol.*, **86**: 1-51, 1984.
- [44] – The plant cytoskeleton: the impact of fluorescence microscopy, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **38**: 119-139, 1987.
- [45] LLOYD C. W., SEAGULL R. W., A new spring for plant cell biology: microtubules as dynamic helices, *Trends Biochem. Sci.*, **10**: 476-478, 1985.
- [46] MIZUTA S., Assembly of cellulose synthesizing complexes on the plasma membrane of *Boodlea coacta*, *Plant Cell Physiol.*, **26**: 1443-1453, 1985.
- [47] MONTEZINOS D., BROWN R. M. Jr., Surface architecture of the plant cell: Biogenesis of

- the cell wall, with special emphasis on the role of the plasma membrane in cellulose biosynthesis, *J. Supramol. Struct.*, **5**: 277–290, 1976.
- [48] – Cell wall biogenesis in *Oocystis*: Experimental alteration of microfibril assembly and orientation, *Cytobios*, **23**: 119–139, 1979.
- [49] MUELLER S. C., BROWN R. M. Jr., Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants, *J. Cell Biol.* **84**: 315–326, 1980.
- [50] – The control of cellulose microfibril deposition in the cell wall of higher plants, *Planta* **154**: 489–515, 1982.
- [51] MUELLER S. C., BROWN R. M. Jr., SCOTT T. K., Cellulosic microfibrils nascent stages of synthesis in a higher plant cell, *Science*, **194**: 949–951, 1976.
- [52] NEVILLE A. C., LEVY S., The helicoidal concept in plant cell wall ultrastructure and morphogenesis, [w] *Biochemistry of Plant Cell Walls* C. T. Brett, J. R. Hillman Ed., Cambridge Univ. Press, Cambridge 1985, 99–124.
- [53] PRESTON R. D., Structural and mechanical aspects of plant cell walls with particular reference to synthesis and growth. [w] *Formation of Wood in Forest Trees*, M. H. Zimmermann Ed., Academic Press, London, New York, 1964, 169–188.
- [54] – The physical biology of plant cell walls, Chapman and Hall, London 1974.
- [55] QUADER H., ROBINSON D. G., *Oocystis solitaria*: a model organism for understanding the organisation of cellulose synthesis, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **94**: 75–84, 1981.
- [56] REISS H. D., Schnepf E., HERTH W., The plasma membrane of the *Funaria caudonema* tip cell: morphology and distribution of particle rosettes, and the kinetics of cellulose synthesis, *Planta*, **160**: 428–435, 1984.
- [57] ROBINSON D. G., QUADER H., Structure, synthesis, and orientation of microfibrils. IX. A freeze-fracture investigation of the *Oocystis* plasma membrane after inhibitor treatment, *Eur. J. Cell Biol.*, 278–288, 1981.
- [58] ROBINSON D. G., QUADER H., The microtubule – microfibril syndrome, [w] *The Cytoskeleton in Plant Growth and Development*, C. W. Lloyd E., 1982, 109–126.
- [59] ROBINSON D. G., PRESTON R. D., Plasmalemma structures in relation to microfibril biosynthesis in *Oocystis*, *Planta*, **104**: 234–246, 1972.
- [60] ROELOFSEN A., Cell wall structure as related to surface growth, *Acta Bot. Neerl.*, **7**: 77–89, 1958.
- [61] RUSKA E., The early development of electron lenses and electron microscopy, Ed. S. Hirzel, Verlag, Stuttgart, 1985.
- [62] SEAGULL R. W., Changes in microtubule organization and wall microfibril orientation during in vitro cotton fiber development: an immunofluorescent study, *Can. J. Bot.*, **64**: 1373–1381, 1986.
- [63] SEAGULL R. W., HEATH I. B., The organization of cortical microtubule arrays in the radish root hair, *Protoplasma*, **103**: 205–229, 1980.
- [64] STAEHELIN L. A., GIDDINGS T. H., Membrane-mediated control of cell wall microfibrillar order, [w]: *Developmental Order: Its Origin and Regulation*, New York 1982.
- [65] VIAN B., REIS D., MOSINIAK M., ROLAND J. C., The glucuronoxylans and the helicoidal shift in cellulose microfibrils in linden wood: Cytochemistry in muro and on isolated molecules, *Protoplasma*, **131**: 185–199, 1986.
- [66] WADA M., STAEHELIN L. A., Freeze-fracture observation on the plasma membrane, the cell wall and the cuticle of growing protonemata of *Adiantum capillus-veneris* L., *Planta*, **151**: 462–468, 1981.
- [67] WILLISON J. H. M., BROWN R. M. Jr., An examination of the developing cotton fiber: Wall and plasmalemma, *Protoplasma*, **92**: 21–41, 1977.

- [68] — Cell wall structure and deposition in *Glaucocystis nostochinearum*, J. Cell Biol., **77**: 103–119, 1978.
- [69] WILLISON J. H. M., GROUT B. W. W., Further observation on cell wall formation around isolated protoplasts of tobacco and tomato, Planta, **140**: 53–58, 1978.
- [70] ZAAR K., The visualization of pores (export sites) correlated with cellulose production in the envelope of the Gram-negative bacterium *Acetobacter xylinum*, J. Cell Biol., **80**: 773–777, 1979.

Otrzymano: 24 kwietnia 1988.

Przyjęto: 8 stycznia 1989.

Adres autorki: ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.

ZASTOSOWANIE ENDONUKLEAZ W BADANIACH CYTOGENETYCZNYCH

APPLICATION OF ENDONUCLEASES IN CYTOGENETICAL STUDIES

Maria J. OLSZEWSKA, Dorota GERNAND

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie. Omówiono trzy grupy metod stosowanych ostatnio w badaniach cytoogenetycznych in situ: wrażliwość na DN-azę I, nick-translation oraz trawienie enzymami restrykcyjnymi. Metody te umożliwiają analizę strukturalną i funkcjonalną chromatyny jąder interfazowych i chromosomów mitotycznych. Wyniki badań z użyciem przedstawionych technik wykazały różnice między niektórymi kategoriami heterochromatyny pod względem strukturalnym i funkcjonalnym.

Summary. Three groups of methods recently applied in cytogenetical studies in situ: DNase I sensitivity, nick-translation and restriction enzymes digestion have been discussed. The above methods enable structural and functional analysis of interphase nuclei and mitotic chromosomes. Results obtained with these techniques show structural and functional differences between some heterochromatin fractions.

1. WPROWADZENIE

Metody biologii molekularnej są stosowane do materiału izolowanego, tj. przygotowanego w sposób uniemożliwiający zwykle wgląd w poszczególne komórki na różnych etapach ich wzrostu i różnicowania. Skłoniło to cytoogenetyków do przystosowania niektórych metod biologii molekularnej do badań in situ, w których analizie mikroskopowej poddawane są poszczególne komórki i chromosomy metafazowe. Użycie tych metod umożliwia pogłębienie wiedzy w zakresie:

1. charakterystyki jąder w różnych tkankach, będących na rozmaitych etapach różnicowania;
2. określenia funkcji, jaką spełniają poszczególne frakcje chromatyny;
3. badanie struktury molekularnej DNA chromosomów metafazowych.

W pracy omówiono trzy grupy metod: wrażliwość na DN-azę I, technikę nick-translation, która może być uzupełniona trawieniem DN-azą I, oraz efekt trawienia enzymami restrykcyjnymi. Wrażliwość na DN-azę I, która rozcina DNA w obszarze aktywnej i potencjalnie aktywnej chromatyny, jest metodą wskazującą na te miejsca w chromatynie, które mogą mieć znaczenie w funkcjonowaniu genów. Nick-translation wskazuje – w zależności od modyfikacji – lokalizację i względną liczbę aktywnych lub potencjalnie aktywnych genów. Restryktazy rozpoznają i rozcinają DNA w miejscach specyficznych ze względu na sekwencję nukleotydów; metoda ta umożliwia lokalizację odcinków DNA ograniczonych przez sekwencje docelowe dla danego enzymu restrykcyjnego.

2. ZASTOSOWANIE DN-azy I

2.1. METODY

Materiał utrwała się w sposób rutynowy dla badań chromosomowych (mieszanina etanolu lub metanolu z kwasem octowym lodowatym). Następnie poddaje się trawieniu DN-azą I i dokonuje oceny ubytku DNA. W zależności od obiektu badań, którym mogą być jądra interfazowe lub chromosomy mitotyczne, stosuje się różne sposoby analizy wyników.

W badaniach jąder interfazowych przeprowadza się pomiary cytofotometryczne po reakcji Feulgena lub po zabarwieniu wybiórczym dla DNA fluorochromem – jodkiem propidyny [8, 16]. Istotne w tej metodzie jest zastosowanie fluorochromu, który nie wiąże się specyficznie z parami AT lub GC, ponieważ użycie fluorochromu wiążącego się wybiórczo z parami AT, jak np. barwnik Hoechst 33258, nie daje wyników jednoznacznych ze względu na wzmózoną fluorescencję heterochromatyny bogatej w pary AT [10]. Ubytki produktu reakcji Feulgena lub fluorescencji w porównaniu z jądrami nie poddanymi działaniu DN-azy I wskazują na względną ilość DNA podatną na działanie tego enzymu. Druga grupa metod mających zastosowanie tylko do komórek proliferujących polega na inkubacji *in vivo* badanego materiału z ^3H tymidyną, utrwaleniu i poddaniu części preparatów działaniu DN-azy I; wytrawione fragmenty DNA ekstrahuje się kwasem trójchlorooctowym [11]. W autoradiogramach ocenia się ubytek ziaren srebra w preparatach trawionych w porównaniu z preparatami kontrolnymi.

Analizę efektu DN-azy I w chromosomach metafazowych można przeprowadzić także na chromosomach izolowanych, nie utrwalonych [2]. Po trawieniu DN-azą I, preparaty barwi się bez wstępnego traktowania barwnikiem Giemsa.

2.2. WYNIKI TRAWIENIA DN-azą I

Wiadomo, że struktura chromatyny jest jednym z czynników uczestniczących w regulacji aktywności transkrypcyjnej. Chromatyna skondensowana nie jest aktywna transkrypcyjnie; dekondensacja jest jednym z warunków transkrypcji. Badania biochemiczne wykazały, że transkrypcyjnie aktywne odcinki DNA wykazują szczególną konformację, która sprawia, że są one podatne na trawienie DN-azą I. Ponadto DN-aza I może rozpoznawać wybiórczo wrażliwe na nią te obszary chromatyny, które uczestniczą w kontroli aktywności genów [15].

Wrażliwość na DN-azę I była wykorzystana w badaniach zmian konformacyjnych chromatyny w przebiegu cyklu komórkowego oraz podczas różnicowania komórek.

W odniesieniu do cyklu komórkowego stwierdzono [11], że chromatyna jąder w fazie G_1 jest najbardziej podatna na DN-azę I. Począwszy od wczesnej fazy S chromatyna staje się coraz mniej wrażliwa na tę endonukleazę. Jednak porównanie wyników uzyskanych tą metodą z wynikami otrzymanymi po zastosowaniu innych technik cytochemicznych i ultrastrukturalnych (wiązanie ^3H aktynomycyny D, morfometryczna analiza ilości chromatyny skondensowanej podczas cyklu komórkowego) [6] wskazuje, że metoda pomiaru podatności chromatyny na trawienie DN-azą I jest techniką mniej czułą niż procedury stosowane wcześniej.

Ocena wrażliwości na DN-azę I z zastosowaniem reakcji Feulgena wykazała, że chromatyna jąder cebuli w korzeniach w okresie spoczynku charakteryzuje się znacznie większą odpornością na DN-azę I niż chromatyna w okresie proliferacji [8]. Wyniki pomiarów fluorescencji również dowiodły, że proliferujące komórki białaczki Rauchera są bardziej podatne na DN-azę I niż normalne komórki śledziony [16].

Badania efektów DN-azy I w chromosomach metafazowych polegają na znalezieniu obszarów opornych na ten enzym (ryc. 1). W zasadzie odcinki euchromatynowe chromosomów metafazowych są podatne na trawienie DN-azą I, w przeciwieństwie do heterochromatyny. Oczekiwane wyniki, tj. oporność przycentromerowej heterochromatyny, zostały uzyskane w nieutrwalonych izolowanych chromosomach myszy [2]. W utrwalonych chromosomach heterochromatyna przycentromerowa jest oporna na DN-azę I w koncentracji 10 ng/ml, ale interstycjalny prążek heterochromatynowy w jednym z chromosomów był podatny na DN-azę I już w koncentracji 2 ng/ml [1]. Podatność pewnych frakcji heterochromatyny na działanie DN-azy I jest faktem raczej zaskakującym. Analogiczne wyniki otrzymano przy metodzie nick-translation (por. 3.2).

Przy ocenie wartości tej metody trzeba stwierdzić, że jest ona obiecująca



Ryc. 1. Przykład wrażliwych i niewrażliwych na DN-azę I regionów chromosomu metafazowego; a – chromosom zabarwiony jednolicie barwnikiem Giemsy bez wstępnego traktowania; b – wynik metody prążków C, ujawniającej ciemno zabarwioną heterochromatynę przycentromerową i prążek interstycjalny; c – zabarwienie barwnikiem Giemsy po trawieniu DN-azą I: oporna jest tylko heterochromatyna przycentromerowa

w odniesieniu do chromosomów metafazowych, jednak nie jest obecnie dostatecznie opracowana do użytku w badaniach cytochemicznych jąder interfazowych, a zasób informacji uzyskanych tą drogą jest niezwykle skromny w porównaniu z wiedzą zgromadzoną w wyniku badań biochemicznych.¹

3. NICK-TRANSLATION

Metoda ta jest oparta na obecności w natywnym DNA odcinków jednoliniowych, tzw. nicks, które reprezentują strukturalne zmiany chromatyny związane z aktualną aktywnością transkrypcyjną. Wykrycie tych odcinków odbywa się poprzez stwierdzenie ich replikacji w materiale utrwalonym. Poddanie obiektu badań działaniu DN-azy I zwiększa zakres informacji o zawartości potencjalnie aktywnej chromatyny (por. 2.2.).

3.1. METODY

Technika nick-translation in situ jest dobrze opracowana. Polega ona na inkubacji utrwalonego materiału w mieszaninie wszystkich czterech trójfosforanów deoksynukleozydów, z których jeden jest znakowany trytem lub biotyną, w obecności polimerazy DNA I, ewentualnie z dodaniem – w zależności od celu badań – DN-azy I. Wizualizacja produktu reakcji następuje bądź metodą autoradiograficzną, bądź metodą ABC (kompleks awidy-

na-biotyna-peroksydaza), w której ostatecznie stosuje się reakcję DAB, wykrywającą aktywność peroksydazy.

Z badań porównawczych przeprowadzonych przez Iseki [4] (tab. 1) wynika zgodność rezultatów uzyskanych techniką autoradiograficzną i metodą ABC.

TABELA 1.

Wyniki nick-translation in situ (bez DN-azy I) w różnych organach szczura [4], wybrane przykłady

Organ	Rodzaj komórek	Metoda	
		autoradiograficzna, liczba ziaren	ABC
Skóra	naskórek tkanka łączna	50	+
		9,5 ± 9,5	±
Szypik kostny kości udowej	krwiotwórcze	33,7 ± 18,7	±
Grasica	limfocyty korowe limfocyty rdzeniowe	14,2 ± 5,1	±
		50	+
Żołądek	gruczołowe mięśnie gładkie	32,2 ± 18,0	±
		4,8 ± 4,2	-
Jelito czcze	nabłonek kosmkowy nabłonek kryptowy	4,6 ± 2,5	-
		50	+

± w preparatach znajdowały się jądra wybarwione i nie wybarwione

W komórkach, których jądra zawierały ponad 50 ziaren srebra w metodzie autoradiograficznej, wynik metody ABC był zawsze pozytywny. Przy liczbie ziaren w autoradiogramach od ok. 34 do 5, tylko w niektórych jądrach wyniki metody ABC były dodatnie. Jądra z liczbą ziaren poniżej 5 nie zawierały brązowych plamek w metodzie ABC; taki wynik należy uznać za negatywny. Metoda autoradiograficzna wydaje się bardziej przydatna w badaniach porównawczych ilościowych jąder interfazowych i jest bardziej czuła. Do analizy chromosomów mitotycznych nadaje się lepiej metoda ABC ze względu na lepszą rozdzielczość lokalizacji produktu reakcji.

3.2. WYNIKI METODY NICK-TRANSLATION

W jądrach interfazowych komórek proliferujących myszy linii A9 metoda nick-translation po zastosowaniu DN-azy I i autoradiografii wykazała — zgodnie z oczekiwaniem — brak wyznakowania w obszarach heterochromatynowych [14]. Jądra komórek szczura z różnych organów będących na rozmaitych

etapach zróżnicowania i wykazujących odmienną aktywność transkrypcyjną były obiektem badań, gdzie zastosowano metody autoradiograficzną i ABC [4]. Wybrane przykłady są zamieszczone w tab. 1. Przedstawione wyniki wskazują, że komórki o wysokim stopniu zróżnicowania nie zawierały jednociowych fragmentów DNA (nicks) w przeciwieństwie do komórek proliferujących lub o znacznej aktywności transkrypcyjnej [4].

Chromosomy metafazowe badano po trawieniu DN-azą I. U ssaka *Microtus agrestis* euchromatyna w aktywnym chromosomie X jest wrażliwa na DN-azę I, podczas gdy w nieaktywnym chromosomie X (w tej samej płytce metafazowej) jest ona niewrażliwa, z wyjątkiem wcześniej replikującego wąskiego obszaru znajdującego się w dystalnej części tego chromosomu. Wrażliwość na DN-azę I sugeruje obecność w tym regionie potencjalnie aktywnej konformacji DNA (tj. genów, które nie zostały dezaktywowane). Podobny wąski region wrażliwy na DN-azę I znaleziono w nieaktywnym chromosomie X u *Gerbillus gerbillus* [14].

W komórkach hybrydowych mysz/*Microtus agrestis* otrzymano aneuploidalną linię o pojedynczym aktywnym, chromosomie X. Wykazywał on w autoradiograficznej metodzie nick-translation z zastosowaniem DN-azy I takie same właściwości, jak opisany tu aktywny chromosom X w fibroblastach *Microtus agrestis*. W linii zawierającej pojedynczy nieaktywny chromosom X nie był on radioaktywny na całej długości. W linii, w której nastąpiła spontaniczna aktywacja genu HPRT (fosforybozylotransferaza hipoksantyna: guanina), zlokalizowanego w chromosomie X, pojawiła się wrażliwość na DN-azę I; rozmieszczenie ziaren autoradiograficznych było takie samo, jak w linii zawierającej aktywny chromosom X [5].

Wrażliwość na DN-azę I obszarów euchromatynowych stwierdzono także w chromosomach człowieka z zastosowaniem zarówno trójfosforanów nukleozydów znakowanych trytem, jak i biotyną [9].

U myszy heterochromatynowy prążek interstycjalny wrażliwy na DN-azę I (por. 2.2) ulegał nick-translation. Był on wyraźnie widoczny po zastosowaniu techniki znakowania biotyną. Podobnie wyznakowane były obszary euchromatynowe [1].

Z otrzymanych rezultatów wynika, że istnieją wyraźne różnice w liczbie miejsc obecnie i potencjalnie aktywnych transkrypcyjnie między jądrami komórek na różnych etapach różnicowania. W chromosomach metafazowych, zgodnie z oczekiwaniem, metoda nick-translation z zastosowaniem DN-azy I wykazuje potencjalną aktywność transkrypcyjną regionów euchromatynowych. Interesujące wyniki otrzymane w odniesieniu do chromosomów X. Dezaktywacja jednego z tych chromosomów (u ssaków płci żeńskiej) pociąga za sobą zanik wrażliwości na DN-azę I, natomiast aktywacja przywraca mu tę wrażliwość. Niektóre heterochromatynowe prążki C w autosomach i w chromosomach X u ssaków wydają się potencjalnie aktywne transkrypcyjnie.

Wyniki te skłaniają do przypuszczenia, że heterochromatyna wykrywana metodą prążków C nie jest jednorodna funkcjonalnie; pewne nieliczne jej frakcje wydają się potencjalnie aktywne transkrypcyjnie.

4. ZASTOSOWANIE ENDONUKLEAZ RESTRYKCYJNYCH

4.1. METODY

W metodzie tej analizie poddaje się chromosomy izolowane, nie utrwalone lub materiał utrwalony i przygotowany w sposób powszechnie przyjęty do badań chromosomów metafazowych. Po przeprowadzeniu trawienia restryktazą preparaty barwi się barwnikiem Giemsy lub jodkiem propidyny. Należy podkreślić, że niekiedy w preparatach kontrolnych były obserwowane prążki wywołane, jak wykazano, obecnością resztek glicerolu dodawanego w wysokich stężeniach do buforu, w którym przechowywane są restryktazy [12]. W wyniku wytrawienia przez restryktazę pewnych fragmentów chromosomów metafazowych pojawiają się w nich miejsca nie barwiące się; są to tzw. prążki negatywne. Pozostałe obszary chromosomów, odporne na działanie zastosowanej restryktazy, widoczne są jako tzw. prążki pozytywne, tj. intensywnie barwiące się (barwnik Giemsy) lub fluoryzujące (jodek propidyny, ryc. 2).

Dobór enzymu zależy od rodzaju poszukiwanych sekwencji specyficznie ciętych przez daną restryktazę. U niektórych gatunków, których DNA jest przynajmniej częściowo sklonowany, dysponuje się istotną metodycznie wska-



Ryc. 2. Przykład ujawnienia prążków negatywnych w euchromatynie chromosomu metafazowego działaniem restryktazy; a – chromosom zabarwiony jednolicie barwnikiem Giemsy bez wstępnego traktowania; b – ujawnienie heterochromatyny metodą prążków C; c – ujawnienie w euchromatynie wąskich prążków negatywnych po trawieniu restryktazą i zabarwieniu barwnikiem Giemsy

zówką dotyczącą występowania sekwencji docelowych dla danej restryktazy. Badania można poprzedzić lub zweryfikować poprzez ustalenie restrykcyjnego wzoru DNA badanego gatunku. Np. u muntjaka spośród pięciu enzymów restrykcyjnych, dla których sekwencje docelowe zawierały wyłącznie G i C, jedynie Hae III (tab. 2) powodował wzór prążkowy negatywny (ryc. 2). Autorzy

TABELA 2
Sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne

Enzym	Rozpoznawana sekwencja 5'—3'
Alu I	AG ↓ CT
EcoR I	G ↓ AATTC
Hae III	GG ↓ CC
Hind III	A ↓ AGCTT
Hinf I	G ↓ ANTC

[17] potwierdzili ten wynik na izolowanym DNA wykazując, że prążki restrykcyjne po elektroforezie na żelu agarozowym powstawały tylko po trawieniu Hae III. Fragmenty DNA rozcięte przez Hae III u muntjaka były różnej długości od 200 do 3000 par zasad [17].

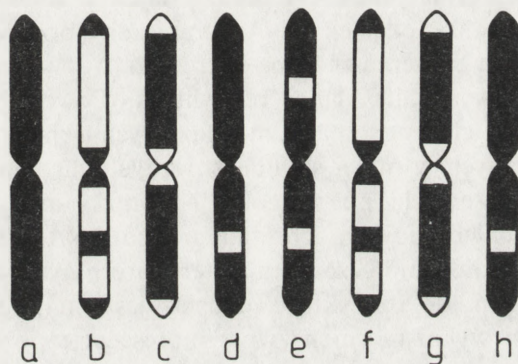
Należy zwrócić uwagę, że restryktazy specyficzne dla sekwencji czteronukleotydowych (tab. 2) rozcinają DNA na fragmenty krótsze niż restryktazy atakujące sekwencje sześcionukleotydowe. W rezultacie, w wyniku trawienia łatwiej wypłukiwane są z chromosomów stosunkowo krótkie odcinki DNA (od 100 do 200 par zasad), wycięte przez enzymy restrykcyjne, rozcinające sekwencje złożone z czterech nukleotydów. Fragmenty od długości 1000 par zasad i dłuższe pozostają w chromatynie. W konsekwencji prążki nie mogą być uwidocznione.

4.2. WYNIKI TRAWIENIA ENZYMAMI RESTRYKCYJNYMI

Otrzymane wyniki dotyczące euchromatynowych części chromosomów metafazowych wykazują istnienie w nich obszarów podatnych na działanie danej restryktazy. Wyraża się to pojawieniem prążków negatywnych o rozmaitej szerokości (ryc. 2). Zwykle takie prążki otrzymuje się po działaniu enzymami restrykcyjnymi, które nie atakują heterochromatyny z powodu braku w niej sekwencji docelowych. W wielu przypadkach obserwowano wytrawienie jednorodne całej euchromatyny, w rezultacie czego jedynymi obszarami barwiącymi się, np. w chromosomach komórek L myszy, są obszary heterochromatyny przycentromerowej [2]. Autorzy ci [2] stosując Alu I i EcoR I (tab. 2) uzyskali w izolowanych chromosomach metafazowych niemal

całkowite strawienie DNA euchromatyny. Na podstawie takich wyników, a także wyników trawienia DN-azą I, (por. 2.2) został wyciągnięty dosyć istotny wniosek, a mianowicie, że na indukcję prążków C nie wpływa utrwalanie [2]. U muntjaka wykazano, że enzymy restrykcyjne, nie rozcinające w atakowanej sekwencji G i C, powodują pojawienie się w euchromatynie prążków bogatych w pary AT i odwrotnie [17]. Wytrawianie fragmentów euchromatynowych przez restryktazy stwierdzono u wielu gatunków zwierząt, np. konik polny, kilka gatunków płazów, pstrąg tęczowy, mysz, muntjak [1, 2, 3, 7, 12, 17]. Zwolennicy zastosowania metody restryktaz do analizy chromosomów metafazowych są nawet zdania, że jest to metoda prostsza niż powszechnie dotąd używane metody prążkowe.

Pozornie zaskakujące wyniki otrzymano w odniesieniu do heterochromatyny. Na podstawie rozróżnienia heterochromatyny bogatej w pary AT lub GC (ryc. 3, c, d) można było oczekiwać, że enzymy restrykcyjne, rozcinające DNA



Ryc. 3. Przykłady występowania w chromosomie metafazowym regionów trawionych różnymi restryktazami; a – chromosom zabarwiony barwnikiem Giemsy bez wstępnego traktowania; b – ujawnienie heterochromatyny telomerowej, przycentromerowej i interstycjalnej metodą prążków C; c – fluorescencja po DAPI lub fluorochromie Hoechst 32258: heterochromatyna telomerowa i przycentromerowa jest bogata w pary AT; d – fluorescencja po chromomycynie A_3 lub mitramycynie: prążek interstycjalny jest bogaty w pary GC; e – szerokie prążki negatywne (jasne) i pozytywne (ciemne) po wytrawieniu EcoR I; f – obszary wytrawione (jasne) i odporne (heterochromatyna, por. b) na Alu I; g – obszary wytrawione (jasne) przez Hind III: heterochromatyna bogata w pary AT (por. c) została strawiona; h – prążek wytrawiony (jasny) przez Hae III: heterochromatyna bogata w pary GC (por. d) została strawiona; e – h: zabarwienie barwnikiem Giemsy

między A i T, będą powodowały obniżenie lub zanik zabarwienia heterochromatyny bogatej w te pary zasad, natomiast restryktazy atakujące sekwencje bogate w pary GC spowodują zmniejszenie intensywności lub zanik zabarwienia w obszarach bogatych w GC. Wyniki zgodne z oczekiwaniami otrzymano u płazów [12]. Przycentromerowa heterochromatyna u ropuchy

Buffo americanus jest bogata w pary GC i ulega całkowitemu strawieniu przez Hae III (tab. 2). U konika polnego heterochromatyna przy organizatorze jąderkowym (NOR) jest bogata w pary GC; ulega ona wytrawieniu przez Alu I, Hae III oraz Hinf I (tab. 2). Natomiast segmenty heterochromatynowe bogate w pary AT nie ulegały wytrawieniu przez Hind III (tab. 2) [3]. Hind III nie powodował również pojawienia się prążków negatywnych w obszarach euchromatynowych, co mogłoby być związane z sześci nukleotydową sekwencją atakowaną przez tę restryktazę (tab. 2). U konika polnego wykazano ponadto [3], że heterochromatyna bogata w pary AT jest trawiona przez Alu I oraz Hinf I (tab. 2).

Z przytoczonych rezultatów badań wynika pewna sprzeczność między stwierdzoną dominacją par AT lub GC w heterochromatynie a brakiem efektu restryktaz rozcinających DNA w miejscach zawierających A lub T i odwrotnie – skuteczność restryktaz atakujących sekwencje składające się z G i C w heterochromatynie bogatej w pary AT. Są co najmniej dwie przyczyny tych sprzeczności. Po pierwsze, odcinek DNA ograniczony przez sekwencje bogate np. w pary GC może zawierać znaczne liczby par AT we fragmencie między sekwencjami docelowymi dla danej restryktazy. Po drugie, wiadomo, że heterochromatyna w chromosomach metafazowych składa się z wielu tzw. subprążków widocznych w mniej skondensowanych chromosomach profazowych lub prometafazowych; poszczególne subprążki mogą się różnić pod względem składu nukleotydowego ich satelitarnego DNA. U muntjaka prążek C w jednym z chromosomów zawiera heterochromatynę wrażliwą na Alu I (tab. 2) i oporną na tę restryktazę, chociaż jest on bogaty w pary AT, ponieważ w całości wykazuje intensywną fluorescencję po barwieniu DAPI [17].

Otrzymane wyniki wykazują, że zastosowanie in situ restryktaz stanowi cenną metodę umożliwiającą analizę struktury molekularnej DNA chromosomów metafazowych. W wyniku działania enzymów restrykcyjnych pojawiają się w chromosomach metafazowych prążki negatywne, powstałe jako rezultat wycięcia fragmentów cząsteczki DNA ograniczonych specyficznymi sekwencjami nukleotydów i o swoistym miejscu cięcia w ich obrębie. Trzeba podkreślić, że pojedynczo rozmieszczone sekwencje po ich wycięciu nie powodują powstania wzoru prążkowego [13].

LITERATURA

- [1] ADOLPH S., In situ nick-translation distinguishes between C-band positive regions on mouse chromosomes, *Chromosoma*, **96**: 102–106, 1988.
- [2] BURKHOLDER G. D., SCHMIDT G. J., Endonuclease banding of isolated mammalian metaphase chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **164**: 379–387, 1986.

- [3] GOSÁLVEZ J., BELLA J. L., LÓPEZ-FERNÁNDEZ C., MEZANOTTE R., Correlation between constitutive heterochromatin and restriction enzyme resistant chromatin in *Arcyptera tornosi* (Orthoptera), *Heredity*, **59**: 173–180, 1987.
- [4] ISEKI S., DNA breaks in rat tissues as detected by in situ nick-translation, *Exp. Cell Res.*, **167**: 311–326, 1986.
- [5] KEREM B.-S., KOTTUSCH-GEISELER V., KALSCHUEER V., GOITEIN R., SPERLING K., MARCUS M., DNase I sensitivity of *Microtus agrestis* active, inactive and reactivated X chromosomes in mouse-*Microtus agrestis* cell hybrids, *Chromosoma*, **96**: 227–230, 1988.
- [6] KWIATKOWSKA M., Zmiany struktury jądra a jego aktywność replikacyjna i transkrypcyjna w przebiegu cyklu komórkowego, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 199–234, 1982.
- [7] LLOYD M. A., THORGAARD G. H., Restriction endonuclease banding of rainbow trout chromosomes, *Chromosoma*, **96**: 171–177, 1988.
- [8] MORENO M. L., PAGÉS M., PALAU J., de la TORRE C., Susceptibility of chromatin to nuclease digestion in dormant and proliferating meristems of *Allium cepa* roots, *Ann. Bot.*, **51**: 347–352, 1983.
- [9] MURER-ORLANDO M. L., PETERSON A. C., In situ nick translation of human and mouse chromosomes detected with a biotinylated nucleoside, *Exp. Cell Res.*, **157**: 322–334, 1985.
- [10] PELLICIARI C., MARCHESI G., BOTTONE M. G., MANFREDI ROMANINI M. G., Kinetics of DNase I digestion of interphase chromatin in differentiated cell nuclei of the mouse: a flow cytometric study, *Basic and Appl. Histochem.* **31**: 501–509, 1987.
- [11] PRENTICE D. A., TOBEY R. A., GURLEY L. R., Cell cycle variations in chromatin structure detected by DNase I, *Exp. Cell Res.* **157**: 242–252, 1985.
- [12] SCHMID M., ALMEIDA C. G., Chromosome banding in Amphibia. XII. Restriction endonuclease banding, *Chromosoma*, **96**: 283–290, 1988.
- [13] SCHUBERT I., RIEGER R., Characterization of plant chromosomes by means of banding techniques, differential incorporation of base analogues, and in situ hybridization, [w] *The eukaryotic chromosome – structural and functional aspects*, red. G. Obe i A. Sobbi, w druku, 1989.
- [14] SPERLING K., KEREM B.-S., GOITEIN R., KOTTUSCH V., CEDAR H., MARCUS M., DNase I sensitivity in facultative and constitutive heterochromatin, *Chromosoma*, **93**: 38–42, 1985.
- [15] STEINMÜLLER K., APEL K., A simple and efficient procedure for isolating plant chromatin which is suitable for studies of DNase I-sensitive domains and hypersensitive sites, *Plant Molec. Biol.*, **7**: 87–94, 1986.
- [16] SZABÓ G., DAMJANOVICH S., SÜMEGI J., KLEIN G., Overall changes in chromatin sensitivity to DNase I during differentiation, *Exp. Cell Res.*, **169**: 158–168, 1987.
- [17] UEDA T., IRIE S., KATO Y., Longitudinal differentiation of metaphase chromosomes of Indian muntjac as studied by restriction enzyme digestion, in situ hybridization with cloned DNA probes and distamycin A plus DAPI fluorescence staining, *Chromosoma*, **95**: 251–257, 1987.

Otrzymano: 21 grudnia 1988.

Przyjęto: 9 stycznia 1988.

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

WIELOETAPOWA PATOGENEZA CHŁONIAKÓW

MULTIFACTORIAL PATHOGENESIS OF HUMAN LYMPHOMAS

Danuta ROŻYŃKOWA, Zofia Monika RUPNIEWSKA

Samodzielna Pracownia Genetyki Człowieka AM w Lublinie

Streszczenie. Chłoniaki charakteryzuje niekontrolowana proliferacja komórek limfopoetycznych, przy równoczesnym zahamowaniu różnicowania i dojrzewania. Etiologia tych chorób jest jeszcze niedostatecznie znana, chociaż dla ich powstania konieczne jest współdziałanie wielu mechanizmów, jak:

translokacje chromosomowe być może wywołane błędem w działaniu enzymów, które w prawidłowych warunkach katalizują fizjologiczne rekombinacje w toku tkankowo swoistego dojrzewania;

aktywacja niektórych proto-onkogenów oraz współdziałanie co najmniej dwu proto-onkogenów;

autokrylna stymulacja wzrostu komórki;

udział wirusa Epsteina-Barr i innych wirusów;

wpływ przewlekłej malarii i innych zakażeń pasożytniczych;

upośledzenie nadzoru immunologicznego.

Mechanizmy te zostały omówione w kolejnych rozdziałach niniejszej pracy.

Summary. B derived lymphomas are characterized by uncontrolled high lymphoid cell proliferation with concomitant low or suppressed maturation and differentiation activities. While the etiology of these malignancies is, as yet, not completely elucidated, several below listed mechanisms are known to be involved in the development of lymphomas:

chromosome translocations, possibly resulting from errors in recombinase functions which play physiologic role in the tissue specific genomic rearrangements of differentiating lymphocytes;

activation of some proto-oncogenes with at least two c-onc genes engaged in cooperation;

stimulation of cell autocrine growth;

the involvement of Epstein-Barr virus and of other viruses;

the role of chronic malaria and other parasitic infections;

deficient immunologic surveillance.

Recent advances in above topics are discussed in details.

1. WPROWADZENIE

Chłoniaki, podobnie jak i białaczki limfatyczne, charakteryzują się niekontrolowaną proliferacją komórek limfopoetycznych przy równoczesnym zahamowaniu różnicowania i dojrzewania. Etiologia tych chorób jest jeszcze niedostatecznie znana, chociaż wiadomo, że dla ich powstania konieczne jest współdziałanie wielu mechanizmów patogennych. Zostaną one przedstawione na przykładzie chłoniaka Burkitta (Burkitt lymphoma, w skrócie BL), który stanowi model do badań nad patogenezą chłoniaków B-komórkowych [108, 109]. BL jest nowotworem o charakterystycznej strukturze morfologicznej, który jest zaliczany według Working Formulation of Non-Hodgkin's Lymphomas [145] do chłoniaków o wysokim stopniu złośliwości, wychodzącym z małych nierozszczepionych komórek (small non-cleaved cells).

2. POSTACIE EPIDEMIOLOGICZNE I PATOGENETYCZNE CHŁONIAKA BURKITTA

W aspekcie epidemiologicznym i patogenetycznym rozróżnia się obecnie trzy postacie BL: endemiczną, sporadyczną i niedawno opisaną postać związaną z zespołem nabytego braku odporności (w skrócie AIDS), tzw. AIDS-BL [183].

Postać endemiczna BL występuje w Afryce podzwrotnikowej i Nowej Gwinei. Jest ona etiologicznie związana z wirusem Epsteina-Barr (w skrócie EBV) [53], przy czym bardzo ważnym czynnikiem ryzyka jest endemiczna malaria oraz inne zakażenia pasożytnicze. Jednakże dla powstania nowotworu konieczne są jeszcze dodatkowe zmiany genetyczne, które tłumaczą monoklonalność nowotworu i różnice fenotypowe między komórkami BL zawierającymi genom EBV a komórkami limfoidalnymi unieśmiertnionymi *in vitro* przez EBV [90].

Postać sporadyczna BL występująca w Europie, Ameryce Północnej i Japonii, nie jest związana z zakażeniem EBV [20] i stanowi typowy przykład rzadkiego nowotworu o całkowicie nieznannej etiologii.

Obraz kliniczny postaci endemicznej BL jest nieco odmienny od postaci sporadycznej. Mianowicie w tej pierwszej – pierwotną lokalizacją guza jest zuchwa i stosunkowo rzadko występuje białaczka, natomiast w postaci sporadycznej – guz początkowo jest zlokalizowany w jamie brzusznej, a konwersja białaczkowa zachodzi często.

AIDS-BL, podobnie jak postać endemiczna, jest związana z genomem EBV [129, 172, 183], przy czym prawdopodobne role wirusów różnie są objaśniane. Jedna z hipotez zakłada, że ludzki wirus zespołu nabytego braku odporności (Human Immunodeficiency Virus, w skrócie HIV, wcześniej nazywany Lymph-

adenopathy-Associated Virus, w skrócie LAV, lub Immunodeficiency-Associated Virus, w skrócie IDAV, względnie HTLV III) odpowiada za rozwój immunosupresji, EBV zaś za rozwój BL. Tę sugestię potwierdza obserwacja, że HIV zakaża i replikuje również w komórkach B, jeśli w ich DNA znajduje się genom EBV; komórki B nie zakażone EBV nie są komórkami docelowymi dla HIV, który – jak powszechnie wiadomo – zakaża pomocnicze limfocyty T [1]. Inne wyjaśnienie przyjmuje, że powstanie i rozwój klonu komórki B stransformowanej przez EBV jest następstwem upośledzonego nadzoru immunologicznego wskutek zakażenia limfocytów T pomocniczych [1].

Przed dwoma laty został wykryty w pracowni Gallo w USA nowy wirus – ludzki wirus limfotropowy B (Human B-Lymphotropic Virus, w skrócie HBLV), podobny do wirusów z rodziny *Herpetoviridae* [81]. Wirus ten został wyizolowany z komórek od chorych na nieziarnicze chłoniaki lub z nienowotworowym przerostem węzłów chłonnych, w tym dwu chorych HIV serododatnich [80, 149]. Z odkryciem tym wiążą się dodatkowe możliwości współdziałania między HBLV a EBV w patogenezie zaburzeń immunoregulacyjnych i transformacji nowotworowej limfocytów B.

3. TRANSLOKACJE CHROMOSOMOWE W CHŁONIAKU BURKITTA I W INNYCH CHŁONIAKACH

Wszystkie trzy postacie BL wiążą się z nieprzypadkowymi, powtarzającymi się translokacjami chromosomów. W 75–85% przypadków zarówno endemicznych, jak i sporadycznych BL można znaleźć translokację t/8; 14/ /q24/ / q32/. Ta zmiana kariotypu jest zarówno w komórkach zakażonych EBV, jak i w komórkach EBV ujemnych; nie zależy więc od obecności wirusa.

W 15–25% przypadków BL występują dwa inne warianty translokacji, w których uczestniczy chromosom 8 (prążek q24). W częstszym wariantcie (ok. 10% przypadków) jest to translokacja t/8; 22//q24; q11/, w rzadszym (ok. 5% przypadków) jest to translokacja t/2; 8/p12; q24/ [74].

W niewielkim procencie chorych zarówno w sporadycznej, jak i endemicznej postaci BL nie udało się wykryć żadnej z tych trzech typowych translokacji [12, 14, 48], co mogłoby sugerować, że nie są one konieczne do rozwoju BL. Klein i Klein [91] mają zdecydowanie odmienne zdanie sądząc, że istnieje prawie 100% związek między jedną z trzech podstawowych translokacji a BL.

Oprócz tych podstawowych translokacji zdarzają się w BL, podobnie zresztą jak i w innych nowotworach, dodatkowe aberracje chromosomowe. Według Berger i Berheima [11] spotyka się je w około 70% przypadków, przy czym najczęściej polegają na rearanżacjach struktury długich ramion chromosomu 1.

W znacznym procencie chłoniaków i białaczek innych niż BL, które są częściej spotykane w Europie i Ameryce, występują charakterystyczne translokacje dotyczące długich ramion chromosomu 14. Translokacje te spotykano zarówno w chłoniakach B, jak i T-komórkowych. W długich ramionach chromosomu 14 znajdują się:

locus łańcucha alfa receptora komórki T (w skrócie T alfa R) – 14q11,
locus łańcucha ciężkiego Ig (w skrócie Ig_H) – 14q32 [74].

Natomiast loci łańcuchów lekkich Ig (w skrócie Ig_L) leżą w chromosomach 2 i 22, które, jak to już wspomniano, uczestniczą w translokacjach spotykanych w BL, a także w translokacjach występujących w ostrych białaczkach B-komórkowych. W chromosomie 2p11 znajduje się locus Ig_L kappa, w 22q11 zaś locus Ig_L lambda [74]. Udział genów Ig i genów receptora komórki T w translokacjach chromosomowych występujących w chłoniakach i białaczkach przedstawiono w tab. 1.

Jednakże w nowotworach limfoidalnych, podobnie zresztą jak we wszystkich nowotworach, uczestniczą jeszcze inne geny, zwane proto-onkogenami lub onkogenami komórkowymi (w skrócie *c-onc*). *C-onc* są genami starymi ewolucyjnie. Zdaniem Bishopa [16] są one przechowywane podczas ewolucji od ponad 1000 milionów lat. Wykryto je u niższych eukariontów ewolucyjnie tak odległych od człowieka, jak drożdże piwne i muszka owocowa. Ekspresja *c-onc* występuje w różnych okresach wzrostu i różnicowania prawidłowych komórek. Istnieją ścisłe powiązania między *c-onc* a pozakomórkowymi czynnikami wzrostowymi. Powiązania te są albo bezpośrednie, ponieważ niektóre *c-onc* kodują czynniki wzrostowe, albo pośrednie, ponieważ inne *c-onc* kodują receptory dla czynników wzrostowych i hormonów, lub uczestniczą w innych mechanizmach regulujących wzrost komórek. W tab. 2 przedstawiono *c-onc*, które przypuszczalnie uczestniczą w etiologii nieziarniczych chłoniaków. Rola tych *c-onc* była oceniana trzema odmiennymi metodami:

analizą najczęściej występujących punktów złamań rozpoznawanych metodami cytogenetycznymi,

techniką transfekcji w linię komórkową NIH 3T3, wyprowadzoną z fibroblastów myszy,

badaniami ekspresji genu.

4. TRANSLOKACJE CHROMOSOMOWE A MIEJSCA ŁAMLIWE I EKSPOZYCJA NA MUTAGENY

Punkt złamania w chromosomie 8 w komórkach BL pokrywa się z miejscem powszechnie łamliwym (common chromosomal fragile sites, w skrócie *c-fra*). *C-fra*, których w chromosomach człowieka jest około 110 po indukcji

TABELA 1

Udział genów immunoglobulinowych (Ig) i genów receptora komórki T w translokacjach chromosomowych występujących w chłoniakach i białaczkach limfatycznych

Gen	Lokalizacja chromosomowa	Translokacja	Nowotwór
Locus łańcucha ciężkiego Ig	14q32	t /8; 14/ /q24; q32/ t /11; 14/ /q13; q32/ t /2; 14/ /p13; q32/ t /14; 18/ /q32; q21/	85% przypadków chłoniaka Burkitta i ostrych białaczek B-komórkowych Przewlekła białaczka B-komórkowa (postać u dorosłych), szpiczak plazmocytowy Przewlekła białaczka B-komórkowa (postać dziecięca) Chłoniak guzkowy
Locus łańcucha lekkiego lambda	22q11	t /8; 22/ /q24; q11/	10% przypadków chłoniaka Burkitta i ostrych białaczek B-komórkowych
Locus łańcucha lekkiego kappa	2p11	t /2; 8/ /p12; q24/	5% przypadków chłoniaka Burkitta i ostrych białaczek B-komórkowych
Locus genu łańcucha alfa receptora komórki T	14q11	t /8; 14/ /q24; q11/ (analogiczna do translokacji w chłoniaku Burkitta) t /10; 14/ /q24; q11/ t /11; 14/ /p13; q11/ inv /14/ /q11; q32/ t /14; /q11; q32/	Ostre białaczki T-komórkowe Ostre białaczki T-komórkowe Ostre białaczki T-komórkowe (opisano jednak przypadek ostrej białaczki z komórek pre-B) Ostre białaczki T-komórkowe i przewlekłe białaczki, chłoniaki T-komórkowe Ostre białaczki T-komórkowe i przewlekłe białaczki, chłoniaki T-komórkowe oraz choroby z ataksia telangiectasia (u kilku z nich z inv /14/, lub t /14; 14/ rozwinęła się przewlekła białaczka T-komórkowa)
Locus genu łańcucha beta	7q34-35	t /7; 11/ /q35; 13/	Ostra białaczka – chłoniak T komórkowa u dziecka
Locus genu gamma	7p14-15		
Locus genu łańcucha delta	wewnątrz locus łańcucha alfa, ok. 85 kb powyżej (upstream) rejonu stałego locus alfa w chromosomie 14 (68a, 158 a)		

TABELA 2
Onkogeny, które wydają się odgrywać rolę w patogeniezie chłoniaków i białaczek limfatycznych

Onkogeny, które ulegają przemieszczeniu (translokacje chromosomowe)				
c-onc	Homologia z v-onc retrowirusa	Lokalizacja chromosomowa	Translokacja	Nowotwór
c-myc	mielocytomatozy ptaków; MC 29, CM II, OK 10, MH 2	8q24	t/8; 14/ t/2; 8/ t/8; 22/	Chłoniak Burkitta i ostre białaczki limfoblastyczne
c-bcl-1 (od B-cell) lymphoma (leukemia-1)	nie znana	11q13	t/11; 14/	Przewlekła białaczka limfatyczna B-komórkowa, szpiczak plazmocytowy
c-bcl-2 przypuszczalny onkogen	nie znana	18q21	t/14; 18/	Chłoniak guzkowy
c-tcl-1 (od T-cell) leukemia (lymphoma-1)	nie znana	14q32	inv/14/	Przewlekłe białaczki/chłoniaki T-komórkowe
c-tcl-2 przypuszczalny onkogen	nie znana	11p13	t/11; 14/	Ostre białaczki T komórkowe
c-ets-1	erytroblastozy ptaków E 26	11q23-24	t/4; 11/	Białaczka bifenotypowa (niekiedy wrodzona)
c-abl	białaczki Abelsona myszy	9q34	del/11/, lub dup/11/ t/9; 22/	Chłoniaki B-komórkowe
				Ostre białaczki limfoblastyczne wychodzące z prekursorowych komórek B, lub T (rzadko) powszechnie ostre białaczki limfoblastyczne

Onkogeny, które mogą być aktywne w chłoniakach (za czym przemawiają wyniki transfekcji)

<p>c-dbl (od diffuse B-cell lymphoma c-N-ras (od neuroblastoma ras)</p>			<p>Chłoniak B-komórkowy o rozlanym typie proliferacji</p>
<p>c-Blym-1 (od B-lymphoma)</p>	<p>1p11-13</p>		<p>Linia komórkowa Ramos wyprowadzona z chłoniaka Burkitta, ostre białaczki limfoblastyczne</p>
<p>c-Tlym-1 (od T-lymphoma)</p>	<p>1p32</p>		<p>Chłoniak Burkitta i 6 linii komórkowych wyprowadzonych z tego nowotworu Chłoniaki T-komórkowe</p>

Onkogeny, których zwiększoną ekspresję obserwowano w chłoniakach i białaczkach limfoblastycznych

<p>c-myc c-fos c-myb c-Ha-ras c-Ki-ras</p>	<p>14q21-31 6q22-24 11p15 6p11-12</p>		<p>Linie komórkowe wyprowadzone z chłoniaka Burkitta, ostre białaczki limfoblastyczne (w nowotworach tych często stwierdza się mutacje punktowe onkogenów ras)</p>
<p>c-abl c-est-1 c-erb-B c-pim-1</p>	<p>7p11-12 6p21</p>	<p>mięśnaka kości (FBJ) myszy erythroblastozy ptaków E 26 mięśnaka Harvey'a szczurów mięśnaka Kirstena szczurów</p> <p>erythroblastozy ptaków nie znana</p>	<p>Linie komórkowe wyprowadzone z chłoniaka Burkitta, linie limfoblastoidalne, linie wyprowadzone z komórek ostrych białaczek szpikowych jak K-562, KG-1</p>

ekspresji *in vitro*, należą do grupy zjawisk ewolucyjnie bardzo dawnych. Łamliwość tych miejsc wzmacnia się gwałtownie, gdy hodowane komórki zostaną poddane działaniu mutagenów lub karcinogenów [99, 180]. Lokalizacja 72% znanych proto-onkogenów pokrywa się z c-fra, przy czym te ostatnie pokrywają się często z punktami złamań poprzedzającymi translokację chromosomów [181].

Po znalezieniu generalnej korelacji między lokalizacją: c-fra, proto-onkogenów i punktów złamań w chromosomach translokacyjnych, cechujących niektóre nowotwory, rozwinęła się intrygująca hipoteza, że c-fra mogłyby odpowiadać miejscom superpodatnej chromatyny aktywnych genów o dużej (60–80%) zawartości guaniny, jak np. rejonom promotorowym czynników wzrostowych, onkogenów, genów podstawowej przemiany komórki (housekeeping) oraz sekwencjom regulatorowym.

Yunis i wsp. [181] indukowali c-fra za pomocą 16 różnych mutagenów działających poprzez różne mechanizmy, m.in. antyfolianów, benzenu, cytostatyków i promieniowania gamma. Szczególną wymowę mają mikrofotografie defektów chromosomowych indukowanych *in vitro* promieniowaniem gamma, busulfanem i fluorouracylem z kofeiną w limfocytach krwi obwodowej zdrowych dawców. Te chromosomy translokacyjne są nie do odróżnienia zarówno od niektórych defektów w chromosomach komórek chłoniakowych, jak i komórek innych nowotworów, np.:

t/11; 14/q 23;q 32.3/ – którą spotyka się w przewlekłej białaczce limfatycznej i chłoniaku limfocytowym B komórkowym,

inv/14//q11.2;q32.3/ – jak w białaczce limfatycznej T komórkowej;

del/6//q21;q25/ – jak w nieziarnicznym chłoniaku wielokomórkowym Heim i Mitelman [74] podają, że aż 15% nieziarnicznych chłoniaków ma 6q –).

W świetle tych doświadczeń translokacje chromosomowe w dalszym ciągu pozostają kluczowym zdarzeniem w chromosomowej ewolucji nowotworów człowieka. Nasuwają się dwa zasadnicze pytania: Co powoduje specyficzne translokacje lub inwersje? Kiedy w procesie złośliwej transformacji komórek zachodzą translokacje albo inne aberracje chromosomowe?

Według obecnych teorii realizacja aberracji chromosomowych może być wynikiem pomyłkowych reakcji enzymatycznych, które w prawidłowych warunkach katalizują fizjologiczne rekombinacje w toku tkankowo swoistego dojrzewania [71]. Teoria ta zostanie tu omówiona w szczegółach.

Jaka jest rola c-fra w predyspozycji do rearanżacji chromosomów i transformacji nowotworowej? Czynniki indukujące c-fra uszkodzają także replikację DNA, blokując przesuw widełek replikacyjnych i/lub hamują procesy naprawcze DNA [100]. Obserwowana zmienność ekspresji c-fra *in vitro* może odzwierciedlać indywidualną zdolność do naprawy DNA. Szczegółowych wyjaśnień na postawione pytanie można spodziewać się po badaniach populacyjnych określających częstość c-fra u ludzi zdrowych i chorych na nowotwory

i po znajomości sekwencji DNA w c-fra oraz porównaniu struktury molekularnej c-fra z sekwencjami złamań specyficznych dla komórek transformowanych.

5. WRODZONE TRANSLOKACJE CHROMOSOMOWE

Istnieje jeszcze jedno źródło informacji o zależnościach pomiędzy translokacjami chromosomowymi a transformacją nowotworową. Są to obserwacje chorych z wrodzonymi translokacjami chromosomów. Niektórzy spośród nosicieli wrodzonych wymiennych translokacji, dotyczących chromosomów 13 i 14, są predysponowani do białaczek T- lub B-komórkowych. Szczegółowa analiza chromosomów translokacyjnych u dwu takich chorych wykazała punkt złamania w prążku q11 chromosomu 14. U 17-letniego chłopca z translokacją 9;14 rozwinął się chłoniak limfoblastyczny T-komórkowy, a u 35-letniego mężczyzny z translokacją 13;14 – białaczka T-komórkowa [127]. W 14q11 znajduje się locus T alfa R. Według teorii Pathaka [127] translokacja typu tandem 13;14 z miejscem złamania w prążku q32 chromosomu 14, czyli w pozycji locus Ig_H lub z inwersją tego rejonu, może stanowić genetyczną predyspozycję do nowotworów wychodzących z komórek B.

6. KOMÓRKOWY PROTO-ONKOGEN *myc* I JEGO ROLA W CHŁONIAKU BURKITTA

Proto-onkogen *myc* (cellular *myc*, w skrócie c-*myc*) znajduje się w dystalnej części długich ramion chromosomu 8/8q24/. W pobliżu c-*myc* leży jeszcze drugi proto-onkogen *mos* /8q11 lub 8q22/ [75], homologiczny z onkogenem retrowirusa mięsaka Moloney'a myszy i niedawno wykryty gen lub geny *mrs* (od myeloid-related sequence) /8q21.1-22/ [110]. C-*myc* jest komórkowym prekursorem wirusowego onkogeny *myc* (viral *myc*, w skrócie v-*myc*), który występuje w genomie czterech szybko transformujących retrowirusów mielocytomatozy ptaków, a mianowicie w MC 29, MH 2, CM II i OK 10 [50]. MH 2 jest retrowirusem o dwóch onkogenach: v-*myc* i v-*mil*, działających synergistycznie w procesie transformacji [63, 86, 182].

Jednakże v-*myc* jest w istocie nowym genem nie występującym w prawidłowych komórkach [49, 50, 168]. Badania v-*myc* retrowirusa MC 29 wykazały, że jest on genetyczną hybrydą złożoną z delecyjnego genu retrowirusa *gag*, który koduje białka wnętrza wirionu oraz c-*myc*, ale pozbawionego całego pierwszego egzonu, czyli egzonu od strony 5' [168]. Tego samego egzonu 5' nie mają także trzy pozostałe retrowirusy mielocytomatozy ptaków: MH 2 [86, 182], CM II i OK 10 [50, 72]. Fakt, że ten sam egzon uległ wybiórczej delekcji

podczas transdukcji przez różne retrowirusy wskazuje, że jego utrata jest krytycznym warunkiem dla czynności transformującej **v-myc**.

C-myc w genomie człowieka składa się z trzech egzonów rozdzielonych dwoma intronami [32, 169]. Tylko drugi i trzeci egzon ulegają translacji. Pierwszy egzon, mimo że nie kodujący, jest uderzającą cechą struktury **c-myc**. Jest to dosyć duży odcinek DNA złożony z ponad 550 nukleotydów, który zawiera dwa promotory [169] i kodony terminacyjne we wszystkich trzech ramkach odczytu, nie ma jednak kodonów inicjujących [7]. Mimo braku potencjału kodowania pierwszy egzon przetrwał ewolucyjne przemiany i jest obecny w genomach tak odległych ewolucyjnie, jak gryzoni i ludzie [7, 13]. Nie wykluczone, że egzon ten pełni czynności typu regulatorowego.

Poznanie mechanizmów rządzących fizjologiczną regulacją **c-myc** jest niezwykle ważne, ponieważ wykazano, że rozregulowanie ekspresji **c-myc**, np. w następstwie złamania i translokacji międzychromosomowych, wystarczy dla konwersji tego proto-onkogenu w onkogen. Badania ekspresji **c-myc** prowadzone metodą transkrypcji w izolowanych jądrach komórkowych w różnych typach komórek człowieka [9, 23, 52] i myszy [111, 123] wykazały, że transkrypcję pierwszego nie kodującego egzonu udaje się aktywować częściej niż dwu pozostałych kodujących egzonów. Jest to szczególnie widoczne, gdy komórka zostaje pobudzona do końcowego różnicowania i transkrypcja dwu kodujących egzonów jest znamienne zredukowana [9, 52, 111]. Przy interpretacji tych wyników przyjęto, że w warunkach prawidłowych transkrypcja **c-myc** ulega przedwczesnemu wygaszeniu już w miejscu połączenia pierwszego egzonu z pierwszym intronem, co ma znaczenie w regulacji ekspresji genu. Wykryto kilka rejonów regulatorowych w obrębie pierwszego egzonu [26, 105, 143, 175]. Transkrypcja **c-myc** ma być inicjowana przez główny promotor (P 2) z egzonu pierwszego, przy czym reakcja ta, zdaniem Chunga i wsp. [27], jest katalizowana, przynajmniej w warunkach *in vitro* przez polimeryzację RNA III, podczas gdy Bentley i Groudine [10] wymieniają polimerazę RNA II.

Produktem **c-myc** jest fosfoproteina 65–68 kd o krótkim półokresie trwania, która znajduje się w jądrze komórkowym i odznacza się dużym powinowactwem do chromatyny, a przynajmniej *in vitro* wiąże DNA [131]. Ekspresja **c-myc** pozostaje w ścisłym związku z cyklem komórkowym. Gen jest nieaktywny w fazie spoczynkowej G_0 , natomiast w komórkach dzielących się następuje gwałtowny wzrost ekspresji **c-myc**. W prawidłowych limfocytach stymulowanych mitogenem lub czynnikiem wzrostu następuje już w ciągu pierwszej godziny około 20-krotny wzrost poziomu **c-myc** mRNA i powolny powrót do poziomu „spoczynkowego” po około 18 godz. Ekspresję **c-myc** poprzedzała w tych doświadczeniach jeszcze bardziej dramatyczna ekspresja **c-fos** przy 50-krotnym wzroście mRNA w ciągu 30 min po zadziałaniu stymulatora i gwałtownym spadku podczas następnych 90 min [21, 31, 66, 88,

93, 121]. Uważa się, że wzrost poziomu c-fos mRNA jest następstwem aktywacji transkrypcji, natomiast stężenie c-myc mRNA jest kontrolowane przez mechanizmy posttranskrypcyjne, przede wszystkim przez wpływ na stabilność c-myc mRNA [17]. Produkt c-fos nie ma większego znaczenia w indukcji c-myc [31, 66, 121].

C-myc mRNA i białko c-myc są łatwo wykrywalne we wszystkich fazach cyklu życiowego komórek. Stwierdzono je:

w limfocytach B stymulowanych lipopolisacharydem lub przeciwciałami antyimmunoglobulinowymi [88, 94];

w spoczynkowych limfocytach T stymulowanych mitogennymi lektynami [88, 141] oraz w zaktywowanych limfocytach T traktowanych interleukiną 2 [142];

w fibroblastach pobudzonych do proliferacji dodatkiem surowicy [88];

w hepatocytach po częściowej hepatektomii [62].

Doświadczenia z przeniesieniem c-myc w mysie fibroblasty linii NIH 3T3 wykazały, że w sposób istotny zostaje zmniejszone zapotrzebowanie tych komórek podczas proliferacji na płytkowy czynnik wzrostu [4]. Ekspresja c-myc czyni komórkę kompetentną, tj. uniezależnia ją od czynników kompetencji wzrostu (np. czynnik wzrostu fibroblastów lub czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego). Dla wzrostu komórki konieczne są nadal czynniki progresji (np. somatomedyna C lub naskórkowy czynnik wzrostu).

Sugeruje się, że c-myc odgrywa również rolę w późniejszych fazach cyklu komórkowego, ponieważ wykazano, że mikroiniekcja białka c-myc moduluje aktywność polimerazy DNA i jest ono konieczne do syntezy DNA w izolowanych jądrach komórkowych [155].

Jądrowa lokalizacja białka c-myc i jego zdolność wiązania DNA in vitro pozwalają przypuszczać, że myc uczestniczy w regulacji ekspresji genów [115]. Na podstawie podobieństw czynnościowych i podobnej lokalizacji jądrowej sugeruje się, że c-myc, tak jak gen E1A adenowirusa typu 12, działa jako aktywator transkrypcji [96].

W układach komórkowych (komórki hemopoetyczne szpiku), w których można badać etapy końcowego różnicowania in vitro, v-myc blokuje dojrzewanie i ułatwia samoodnowę, chociaż nie wywołuje nieograniczonego wzrostu [55, 84]. Nie jest więc wykluczone, że przynajmniej w niektórych okresach prawidłowego rozwoju komórki ekspresja c-myc reguluje wskaźnik podziałów komórkowych i/lub blokuje dojrzewanie [96].

Wysoka i stała ekspresja c-myc występuje w komórkach różnych nowotworów, jednak najbardziej typowo i często w nowotworach limfoidalnych jak:

chłoniaki B-komórkowe człowieka i myszy (chłoniak Burkitta i plazmocytoza myszy), w których translokacją chromosomową objęte są c-myc i loci genów Ig [37];

niektóre przypadki ostrej białaczki limfoblastycznej T-komórkowej człowieka, w których translokacje chromosomowe obejmują także locus receptora komórki T [54];

nowotwory B-komórkowe ptaków wywołane wirusem ptasiej białaczki na drodze insercji promotora lub sekwencji wzmacniających retrowirusa (cyt. wg [140]), a także w przypadkach nowotworów T-komórkowych myszy wywołanych przez wirusa Moloney'a białaczki mysiej [33, 73].

Rzadziej zwiększoną ekspresję **c-myc** obserwowano w nowotworach nielimfoidalnych wskutek amplifikacji genu, jak np.:

w około 20% przypadków raka płuc owsianokomórkowego o bardziej złośliwym przebiegu (cyt. wg [91]);

w nerwiaku zarodkowym w III i IV okresie dochodzi do amplifikacji **N-myc** [19];

w białaczce plazmocytovej, chociaż w mniej złośliwym szpiczaku plazmocytowym już nie obserwuje się amplifikacji **myc** (cyt. wg [91]);

w linii komórkowej HL-60 wyprowadzonej z białaczki promielocytowej człowieka, w której mitozach znajdują się zwielokrotnione sekwencje **myc** w pozachromosomowych fragmentach chromatyny (double minutes, w skrócie DM) [41, 60];

w linii mięsaka kości transformowanej przez wirusa polioma;

w liniach komórki NIH 3T3 transformowanych przez wirusa Abelsona białaczki mysiej [19, 41, 60, 122, 151].

W większości tych przypadków nie wykryto zmian strukturalnych w sekwencjach kodujących **c-myc**.

Komórki pre-B tak myszy, jak i człowieka są szczególnie podatne na proces transformacji nowotworowej przy udziale **c-myc**. Tkankowo-specyficznej ekspresji onkogenów dowodzą doświadczenia Suda i wsp. [156]. **C-myc** lub alternatywnie **N-ras**, jeśli zostały wprowadzone w sprzężeniu z tą samą jednostką regulatorową, składającą się z sekwencji wzmacniających ludzkiego genu Ig oraz promotora SV 40, to wywoływały u myszy transgenicznym dwa różne nowotwory, czyli występowały w innego rodzaju tkance. Ekspresja **c-myc** występowała w komórkach pre-B i towarzyszyła rozwojowi chłoniaka, natomiast ekspresja **c-ras** — w nabłonku pęcherzykowo-oskrzelikowym płuc, z którego rozwinął się gruczolakorak.

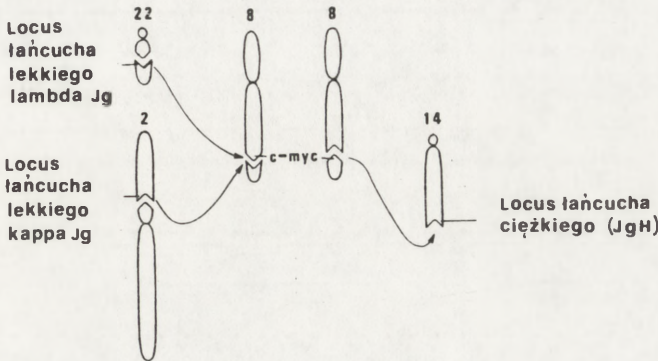
7. ROLA LOCI IMMUNOGLOBULINOWYCH W CHŁONIAKU BURKITTA

Punkty złamań w chromosomach translokacyjnych chłoniaka Burkitta znajdują się tuż przy/lub w obrębie loci Ig:

w 14q32 obejmują locus genu Ig_H ,

w 2p12 obejmują locus Ig_L kappa,
a w 22q11 obejmują locus Ig_L lambda.

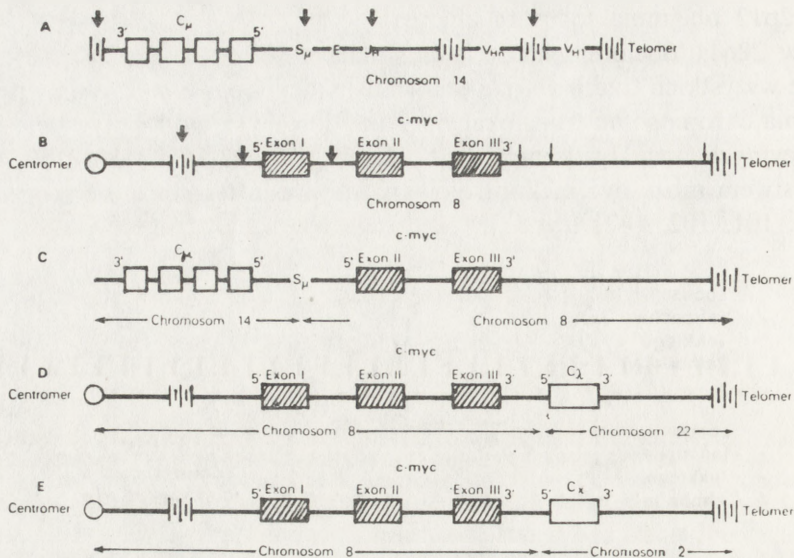
We wszystkich trzech wariantach translokacji locus *c-myc*, objęty punktem złamania chromosomu translokacyjnego 8, dostaje się pod wpływ elementów regulacyjnych loci Ig komórki B [2, 39, 40, 43, 77, 130, 159], czego następstwem może być niekontrolowana ekspresja tego proto-onkogenu [36, 37, 92, 101, 102, 147] (ryc. 1).



Ryc. 1. Wymienne translokacje w chłoniaku Burkitta. *C-myc* i loci Ig łańcuchów ciężkich lub lekkich zostają umieszczone obok siebie (juxtaposition). W translokacji t/8; 14/ *c-myc* zostaje przeniesiony w chromosom 14, natomiast w wariantach translokacji t/2; 8/ i t/8; 22/ *c-myc* pozostaje w chromosomie 8 (wg [74])

Deregulacja *c-myc* jest kluczowym zdarzeniem w BL. W wypadku translokacji t/8; 14//q24; q32/ punkt złamania w 8q24 leży zawsze proksymalnie od końca 5' aż do drugiego egzonu *c-myc* i w ten sposób część środkowa, tj. cały rejon kodujący *c-myc* zostaje przemieszczony do 14q32. Wykazano różnice struktury molekularnej w miejscach fuzji między poszczególnymi przypadkami BL z translokacją t/8; 14/. Croce i Nowell [37] stwierdzili odległość rzędu aż 50 kZ między przemieszczonym *c-myc* a locus Ig . Niekiedy cały locu *c-myc* ulega przemieszczeniu do chromosomu 14, np. w linii komórkowej Daudi wyprowadzonej z endemicznego BL [40]. Niekiedy natomiast locu *c-myc* jest rozerwany punktem złamania między egzonem I a II, czyli niejako dekapitowany, jak ma to miejsce w linii komórkowej ST 486 wyprowadzonej ze sporadycznej postaci BL. Wówczas oba kodujące egzony są przemieszczone do chromosomu 14, podczas gdy egzon I wraz z rejonami dwu prawidłowych promotorów pozostają w chromosomie 8 [35]. Wydaje się, że w endemicznym BL *c-myc* jest nie uszkodzony, natomiast w sporadycznych BL najczęściej dochodzi do „okaleczenia” tego genu.

W 14q32 punkt złamania znajduje się w locus Ig_H , najczęściej w segmentach kodujących rejon przełączenia (switch region, w skrócie S) lub rejon łączący



Ryc. 2. A. Schemat genu łańcucha ciężkiego immunoglobulin (IgH). Rejon stały (C) składa się z segmentów DNA kodujących część stałą łańcucha Ig, jednakową w różnych cząsteczkach Ig. Rejon zmienny (V_H) składa się z segmentów DNA kodujących część zmienną Ig, która jest heterogenna w różnych cząsteczkach Ig. Podczas różnicowania komórki B ma miejsce przegrupowanie genu Ig, tak że segment genu V_H łączy się z segmentem D (od diversity) (nie przedstawionym na rycinie), który już wcześniej ulega związaniu z segmentem J_H (od joining), tak że powstaje kompleks V_H -D- J_H . Element oznaczony jako E (od enhancer) jest sekwencją wzmacniającą czynność promotora, dzięki czemu wzrasta transkrypcja przegrupowanego genu immunoglobulinowego. Rejon przełączania klas izotypu (S od switch) składa się z sekwencji uczestniczących w innym rodzaju przegrupowań DNA. Jest to rejon przełączenia jednej klasy łańcucha ciężkiego w inną (np. z mi w alfa). Linie pionowe podkreślają, że odległości między sąsiadującymi częściami chromosomu nie są dokładnie ustalone. W chłoniaku Burkitta z translokacją t/8; 14/ punkt złamania w locus łańcucha ciężkiego Ig może znajdować się: w rejonie zmiennym V_H (rzadko), w rejonie łączącym J_H , w rejonie przełączania S_{mi} lub w różnych segmentach rejonu stałego C (rzadko). Prawdopodobnie miejsca punktów złamań zaznaczono strzałkami. B. Schemat *c-myc*. W chłoniaku Burkitta z translokacją t/8; 14/ punkty złamań w chromosomie 8 zawsze znajdują się przy końcu 5' dwu kodujących egzonów (II i III) *c-myc* (grube strzałki). W niektórych przypadkach, gdy punkt złamania znajduje się między egzonami I i II zachodzi dekapitacja *c-myc*, tak że egzon I pozostaje w chromosomie 8, podczas gdy dwa kodujące egzony zostają przeniesione w chromosom 14 (C). W rzadszych wariantach chłoniaka Burkitta z translokacją t/8; 22/ lub t/2; 8/ punkty złamań leżą albo w samym końcu 3', albo dystalnie od *c-myc* (cienkie strzałki). C. Przykład chłoniaka Burkitta z translokacją t/8; 14/, w której *c-myc* ulega translokacji. Locus Ig i *c-myc* pozostają w odwrotnej orientacji transkrypcyjnej (5' do 5'). D. W chłoniaku Burkitta z translokacją t/8; 22/ *c-myc* pozostaje w chromosomie 8, podczas gdy sekwencje kodujące część C łańcucha lambda zostają przeniesione w sąsiedztwo końca 3' (dystalnego) *c-myc* (B). *c-myc* i sekwencje kodujące część C łańcucha lambda pozostają w zgodnej orientacji transkrypcyjnej (3' do 5'). E. W chłoniaku Burkitta z translokacją t/2; 8/ *c-myc* również pozostaje w chromosomie 8, sekwencje zaś kodujące część C łańcucha kappa zostają przeniesione w pobliże końca 3' *c-myc* (B) (wg [36]).

(joining region, w skrócie J), znacznie rzadziej złamanie występuje w rejonie zmiennym (variable region, w skrócie V) lub w rejonie stałym (constant region w skrócie C) (ryc. 2).

Konsekwencją translokacji t/8;14//q24;q32/ jest bezpośredni kontakt c-**myc** lub przynajmniej jego dwóch kodujących egzonów z locus kodującym rejon stały Ig_H. Sekwencje c-**myc** i locus Ig zorientowane są wtedy od końca 5' do końca 5', czyli odwrotnie (head to head), a sekwencje sensowne (transkrybowane) znajdują się na przeciwstawnych niciach DNA.

W obu wariantach translokacji t/2;8/ i t/8;22/ punkt złamania znajduje się albo w samym końcu 3' locus c-**myc**, albo dystalnie od niego. C-**myc** pozostaje zawsze w 8q, punkty złamań w 2p i 22q znajdują się odpowiednio w locus Ig_L kappa lub lambda. Oba te loci są zwrócone rejonem V do centromeru, w przeciwieństwie do locus Ig_H w 14q32, który jest zorientowany do telomeru. Dlatego w tych wariantach translokacji locus c-**myc** i sekwencje kodujące rejon C Ig są przyległe, czyli wzajemna orientacja genów jest zgodna (head to tail). Znaczy to, że koniec 3' c-**myc** przylega do końca 5' genu Ig. Odmienna orientacja transkrypcyjna między translokacją t/8;14/ a t/2;8/ i t/8;22/ nie wpływa najprawdopodobniej na różnice czynnościowe.

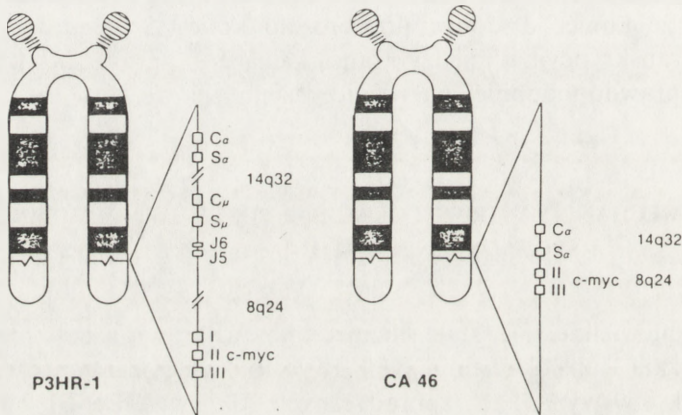
8. MECHANIZMY TRANSLOKACJI W POSTACI ENDEMICZNEJ I SPORADYCZNEJ CHŁONIAKA BURKITTA

Istnieją niewielkie, ale stałe różnice molekularne między identycznymi cytogenetycznie translokacjami t/8;14/, występującymi zarówno w endemicznym BL, jak i w wypadkach sporadycznych BL i w AIDS-BL [69, 70, 124, 130]. Punkt złamania w większości wypadków endemicznego BL znajduje się poza locus c-**myc**, zazwyczaj w odległości większej niż 15 kz od końca 5' pierwszego egzonu [130, 148]. Natomiast w sporadycznych BL i AIDS-BL translokacja powoduje okrojenie c-**myc** od strony 5' i pozbawia ten gen, w większości wypadków, pierwszego intronu lub sekwencji flankujących pierwszy niekodujący egzon [124, 130].

Podobnie w 14q32, chociaż punkty złamań są rozłożone na przestrzeni przypuszczalnie ponad 100 kz, to można wyróżnić dwa zasadnicze zgrupowania tych punktów w locus Ig_H. I tak w endemicznym BL obejmują one rejon V lub J Ig_H, natomiast w sporadycznych BL i w AIDS-BL znajdują się w rejonie przyłączających S mi, gamma, alfa [69, 70, 71, 124]. Wiele danych [69, 70, 71, 124, 130] wskazuje na to, że różnice fenotypowe, jakie istnieją między endemicznym a sporadycznym BL i AIDS-BL, wynikają z różnych mechanizmów rearanżacji chromosomowej dotyczącej locus 14q32. Wiąza się one z przebiegiem ontogenezy komórek B.

Jak wiadomo, w genomie komórek pre-B najwcześniej zachodzi rekombinacja sekwencji genowych rejonów D-J Ig_H (rejon D – skrót od diversity, występuje tylko locus Ig_H). Nieco później dołączany jest gen V Ig_H , tak że powstaje kompleks V-D-J. Dopiero po wycięciu i złożeniu egzonów mRNA zostaje uruchomiona synteza IgM lub IgM + IgD. Występujące w dalszej kolejności przyłączanie izotypów klas (class switching) pozwala na syntezę rejonów stałych Ig_H kodowanych przez loci bardziej odległe, znajdujące się przy końcu 3' (ryc. 2). Po rekombinacji locus Ig_H zachodzi analogiczna rearanżacja loci Ig_L najpierw kappa, a następnie lambda.

W pracowni Croce [70, 71] analizowano DNA pochodzący z komórek nowotworowych od chorych i DNA z komórek linii wyprowadzonych z różnych BL z markerem 14q+ i translokacją t/8;14/ techniką Southerna przy użyciu sond c-myc i uzyskiwano jeden z alternatywnych wzorów hybrydyzacji (ryc. 3):



Ryc. 3. Różnice między translokacją t/8;14/, występującą w endemicznym chłoniaku Burkitta (linia P3HR-1), a spotykaną w sporadycznym chłoniaku Burkitta (linia CA 46). W obu wypadkach występuje markerowy chromosom 14q+, jednakże: w P3HR-1 punkt złamania w chromosomie 14 leży w górę (upstream) od flankujących sekwencji J₅, w chromosomie zaś 8 w odległości większej niż 50 kb od końca 5' nieuszkodzonego c-myc. W tej translokacji może mieć miejsce błąd rekombinazy; w CA 46 translokacja powoduje związanie sekwencji przełączania (switch sequences) z egzonami II i III c-myc, translokacja ta być może zachodzi wskutek błędu w działaniu enzymów przełączających (wg [71])

W większości linii komórkowych wyprowadzonych z endemicznego BL, jak np. linia P3HR-1 lub linia Daudi, hybrydyzacja z sondą c-myc nie dostarczyła dowodów przemawiających za uszkodzeniem translokowanego c-myc. Natomiast punkty złamania w rejonie zmiennym Ig_H skupione były od końca 5' segmentu J, czyli dokładnie tam gdzie należało spodziewać się przerwania dokonanego przez rekombinazę V-D-J.

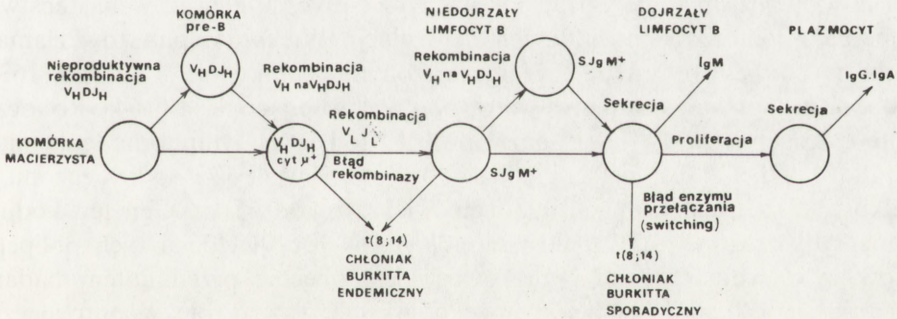
Alternatywny wynik uzyskano w liniach komórkowych wyprowadzonych ze sporadycznego BL, jak np. CA 46. Stwierdzono mianowicie dekapitację translokowanego *c-myc*, a w chromosomie 14 krytyczne miejsce złamania obejmowało sekwencje przełączania S, a więc miejsca typowe dla reakcji przyłączania izotypu w segmencie genu C alfa i C mi. Należy więc przyjąć, że:

W endemicznym BL translokacja powstaje wskutek błędu w łączeniu segmentów V-D-J, za co prawdopodobnie odpowiada rekombinaza V-D-J [69, 70, 71]. Translokacja ta występuje więc we wczesnym okresie różnicowania limfocytów B, w związku z czym komórki endemicznego BL charakteryzują się tylko ekspresją cytoplazmatycznych lub powierzchniowych Ig, natomiast są pozbawione właściwości sekrecyjnych [37, 130].

W sporadycznych BL i w AIDS-BL błąd dotyczy mechanizmu przełączania klas genów Ig_H , za co prawdopodobnie odpowiada enzym katalizujący przełączanie [69, 71]. Translokacja ma więc miejsce w późniejszym okresie różnicowania limfocytów B niż w endemicznym BL. Potwierdzają to obserwacje, że linie komórki B wyprowadzone ze sporadycznych BL są bardziej zróżnicowane i mają zdolność sekrecji IgM [8, 37, 130] (ryc. 4).

Różnice między endemiczną a sporadyczną postacią BL podano w tab. 3.

Przedstawione wywody dotyczące błędów w składaniu genów Ig w BL nie były, historycznie rzecz biorąc, pierwszymi doniesieniami o błędach rekombinacji Ig. Pierwsze wyniki sekwencjonowania DNA w okolicach złamań chromosomów 14q w loci V lub J Ig_H pochodziły z badań dwu innych



Ryc. 4. Korelacja między etapem ontogenazy limfocytu B a punktem czasowym, w którym następuje translokacja prowadząca do złośliwej transformacji. Rekombinaza jest aktywna w komórkach pre-B lub niedojrzałych limfocytach B. Jej fizjologiczna funkcja zapewnia złączenie V_H-D-J_H , rekombinację V_H na V_H-D-J_H lub złączenie V_L-J_L . Pomyłki na tych etapach mogą przyczynić się do translokacji, jak to wykazano na podstawie badań molekularnych w chłoniaku guzkowym, przewlekłej białaczce limfatycznej, ostrej białaczce limfoblastycznej B-komórkowej i w endemicznej postaci chłoniaka Burkitta. W bardziej dojrzałych limfocytach B, po stymulacji antygenowej, zachodzi przełączanie izotypów. W tych limfocytach B mogą występować translokacje genowe typowe dla sporadycznej postaci chłoniaka Burkitta (wg [71])

TABELA 3

Charakterystyka postaci endemicznej i sporadycznej chłoniaka Burkitta (wg [71])

	Postać endemiczna	Postać sporadyczna
Położenie geograficzne	Afryka podzwrotnikowa i Nowa Gwinea	Europa, Ameryka Północna, Japonia
Obecność genomu EBV	+	-
Zdolność sekrecji IgM	-	+
Translokacja za pośrednictwem rekombinaz	+	-
Translokacja związana z mechanizmem przełączania klas	-	+

translokacji w ludzkich chłoniakach typu nie-Burkitta. Ponad 60% ludzkich chłoniaków typu nie-Burkitta nosi translokacje dotyczące locus $Ig_H /14q32/$, chociaż zwykle translokacje te nie obejmują $c-myc /8q24/$. Tak np. translokacja $t(11;14)(q13;q32)/$ występuje w części wypadków przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej i w chłoniaku limfocytowym B-komórkowym o rozlanym typie proliferacji i jak się wydaje wiąże się ze złą prognozą [79, 125, 166, 178]. Natomiast translokacja $t(14;18)(q32;q21)/$ występuje w ponad 85% wypadków chłoniaków guzkowych, jednego z najczęstszych ludzkich chłoniaków B-komórkowych [59], a także, chociaż znacznie rzadziej, w ostrej białaczce limfoblastycznej, wychodzącej z komórki pre-B. Obie te translokacje wydają się analogiczne do translokacji $t(8;14)/$. Geny znajdujące się w punktach złamań w 11q13 i 18q21 są tymczasowo zaliczane do rodziny proto-onkogenów, przez analogię z translokowanym $c-myc$, ponieważ w następstwie złamania również dochodzi do ich deregulacji. Większość punktów złamań w chromosomie 18 występuje w ograniczonym odcinku ok. 4 kZ [29, 163]. Podobne zgrupowanie złamań stwierdzono w chromosomie 11 [164]. Roboczo proto-onkogen leżący w 11q13 nazwano **bcl-1** (od B-cell lymphoma/leukemia), a w 18q21 — **bcl-2**. Gen **bcl-2** składa się z egzonu 5' wielkości 3,5 kZ i egzonu 3' wielkości 5 kZ, rozdzielonych intronem większym od 65 kZ. Gen ten koduje polipeptydy złożone z 239 i 205 aminokwasów [162]. Udział tych polipeptydów w rozwoju chłoniaka guzkowego jest obecnie przedmiotem badań. Sugeruje się [30, 64], że **bcl-2** może odgrywać ważną rolę w ontogenezie limfocytów B, ponieważ we wczesnych okresach różnicowania obserwowano wysoki stopień ekspresji tego proto-onkogenu, który następnie ulegał obniżeniu wraz z dojrzewaniem komórek. Ostatnio Vaux i wsp. [167] wprowadzali ludzki gen **bcl-2** w mysie komórki linii limfoidalnych lub szpikowych, które dla wzrostu wymagały interleukiny-3 (IL-3, synonimy: czynnik wzrostu komórki hemopoetycznej, w skrócie HCGF, lub multi-HGF). Stwierdzono, że **bcl-2** umożliwia przeżycie komórek pomimo braku IL-3 w środowisku hodowlanym, chociaż pozostają one w fazie G_0 . Natomiast linie komórki B,

w których występowała stała ekspresja **c-myc**, po wprowadzeniu **bcl-2** stawały się onkogenne. Autorzy sugerują, że **bcl-2** dostarcza komórkom jakiegoś czynnika ułatwiającego ich przeżycie (survival signal). W ten sposób **bcl-2** w procesie onkogenezy umożliwia przetrwanie klonu komórkowego do czasu ewentualnej aktywacji innych **c-onc**, np. **c-myc**.

Charakterystyka molekularna miejsc fuzji chromosomowych dostarczyła podstaw do hipotezy, że zasadniczą rolę w tych translokacjach odgrywają układy enzymatyczne (rekombinazy), katalizujące reakcję łączenia sekwencji genowych Ig [163, 164]. Obserwacje te poszerzono następnie na translokacje występujące w endemicznym BL i w chłoniakach T-komórkowych, w których translokacje dotyczą prążka q11.2 chromosomu 14 [56], gdzie znajduje się locus T alfa R. Błąd rekombinaz V-D-J wydaje się mieć raczej uniwersalny charakter w mechanizmie powstawania translokacji chromosomowych w chłoniakach. Zdaniem grupy Croce [34, 70, 71, 153] wszystkie te translokacje mają trzy wspólne cechy:

Punkt złamania w chromosomie 14 znajduje się w miejscu fizjologicznej rekombinacji, a więc powyżej segmentu J Ig_H w chłoniakach B-komórkowych lub segmentu J T alfa R w chłoniakach T-komórkowych.

W drugim chromosomie uczestniczącym w translokacji, a więc w chromosomie 8 w przypadku translokacji t/8;14/ w endemicznym BL, w chromosomie 11 – w t/11;14/ w przewlekłej białaczce limfatycznej i w chromosomie 18 – w t/14;18/ w chłoniaku guzkowym odkryto sekwencje 7- i 9-członowe (heptamer-nonamer) homologiczne z sygnalizatorami rozpoznawanymi przez rekombinazę [5, 29, 137, 161, 163].

W sąsiedztwie punktów złamań wykryto dodatkowe nukleotydy przypominające rejony N przypuszczalnie dołączone przez terminalną transferazę deoksynukleotydową (terminal deoxynucleotidyl transferase, w skrócie TdT) [45, 137]. TdT odgrywa dodatkową rolę w powstawaniu immunologicznego polimorfizmu dzięki losowej insercji nukleotydów przy złączach rekombinacyjnych podczas rearanżacji genów Ig_H lub genów receptora komórki T we wczesnych okresach różnicowania komórki B lub T [45].

Molekularne defekty rekombinaz, prowadzące do translokacji między dwoma różnymi chromosomami, zamiast fizjologicznej rekombinacji wewnątrz genu strukturalnego Ig_H (w komórce B) lub genu T alfa R byłyby zatem odpowiedzialne za zmianę usytuowania komórkowego proto-onkogenu, za jego niekontrolowaną ekspresję (deregulację) i konwersję w onkogen. Jeśli tak jest, to translokacja musiałaby odbyć się w tym okresie różnicowania limfocytów B lub T, kiedy aktywne są rekombinazy uczestniczące w rearanżacji genów Ig lub genów T alfa R, a więc w komórce pre-B lub w komórce pre-T. Potwierdza to także obecność przy złamaniach punktowych dodatkowych nukleotydów prawdopodobnie dodanych przez TdT, która jest markerem zarówno komórek pre-B, jak i pre-T.

Pomimo różnych mechanizmów odpowiedzialnych za złamanie 14q32 w sporadycznych BL i AIDS-BL, a w endemicznej postaci BL, i pomimo że egzon I *c-myc* może być zmutowany lub utracony [130], to jak się wydaje, egzony kodujące *c-myc* nie ulegają zmianom strukturalnym i białko kodowane przez *myc* w BL jest identyczne z białkiem wytwarzanym przez prawidłowe komórki. Istnieją jednak odstępstwa od tej reguły. Wykryto mianowicie [22], że niezwykle rzadko w translokacji t/8; 14/ występują punktowe mutacje *c-myc*, które mogą prowadzić do zmian sekwencji aminokwasów w kodowanym białku. Z uwagi na rzadkość występowania mutacji *c-myc*, nie wydaje się aby „per se” były one niezbędne dla złośliwej transformacji. Zmiany takie mogą występować także podczas progresji nowotworu, nie wiadomo jednak, czy dostarczają one jakichś wybiórczych korzyści komórkom nowotworowym. W następstwie rearanżacji struktura kodujących sekwencji *c-myc* pozostaje zatem praktycznie nie zmieniona, natomiast istotnemu zaburzeniu ulega regulacja ekspresji *c-myc*, co zostało udowodnione przez kilka zespołów naukowych [36, 37, 92, 101].

9. „DEREGULACJA” C-MYC

Badania transkrypcji ludzkiego *c-myc* prowadzono w klonach komórki hybrydowej, uzyskanych w wyniku fuzji komórek BL z komórkami guza plazmocytozowego myszy. Wykazano, że hybrydy, w których był obecny translokacyjny chromosom 14q⁺, charakteryzował wysoki poziom ekspresji *c-myc*, natomiast te, które miały prawidłowy ludzki chromosom 8, nie ujawniały tej cechy. W podobnych doświadczeniach prowadzonych z komórkami BL, mających jeden z dwu wariantów translokacji otrzymano analogiczne wyniki. Te komórki hybrydowe, które miały translokacyjny chromosom 8q⁺ (tj. chromosom, w którym *c-myc* przylegał do sekwencji kodujących rejon stały łańcuchów lekkich kappa lub lambda), wykazywały wysoki poziom transkrypcji *c-myc*, natomiast w prawidłowym homologu chromosomu 8 — *c-myc* nie był aktywny. Tak więc we wszystkich trzech translokacjach spotykanych w BL stwierdzono podobną zmianę ekspresji *c-myc*. Zestawienie *c-myc* i loci Ig powoduje nieefektywność mechanizmów kontrolujących transkrypcję prawidłowego *c-myc*, zwłaszcza że w wielu wypadkach część regulatorkowa od końca 5' ulega delecji. Pozostawanie *c-myc* pod wpływem elementów regulujących transkrypcję genów Ig, której stan w limfocytach B jest bardzo wysoki, warunkuje nadmierną, nieadekwatną ekspresję *c-myc*. Nie jest jeszcze znany dokładny charakter sekwencji stymulujących transkrypcję, które muszą być zdolne do działania zarówno w odwrotnej, jak i zgodnej orientacji transkrypcyjnej, i mogą wywierać wpływ pomimo znacznej odległości między aktywatorem a genem aktywowanym.

Nie jest wykluczone, że w wyniku translokacji zmienia się także posttranskrypcyjna regulacja (modulacja) ekspresji **c-myc**. W komórkach guza plazmocytoowego myszy, który co najmniej w aspekcie cytogenetycznym stanowi myszy odpowiednik ludzkiego BL, jak się wydaje, **c-myc** mRNA jest bardziej stabilny [133]. Niedawne badania Piechaczyka i wsp. [132] sugerują podobną sytuację u człowieka. A zatem deregulacja **c-myc** może być wywołana przez dwa odmienne, ale wzajemnie uzupełniające się mechanizmy, a mianowicie przez wzrost nie kontrolowanej transkrypcji oraz przez zwiększenie translacji **c-myc** mRNA.

Model transgenicznych myszy też przemawia za znaczeniem nie kontrolowanej ekspresji **c-myc** w patogenezie BL [3, 98]. Jeśli do komórek gonadalnych myszy zostanie wprowadzony **c-myc** w połączeniu z sekwencjami wzmacniającymi ekspresję C-mi w locus Ig_H (enhancer mi, w skrócie Emi), to u zwierząt tych prawie zawsze rozwijają się chłoniaki B-komórkowe o różnym stopniu dojrzałości [3]. Niewątpliwie zwiększona ekspresja **c-myc** sprzyja „unieśmiertelnieniu” komórki, jednakże dla rozwoju nowotworu konieczna jest co najmniej jeszcze jedna zmiana genetyczna. Zdaniem Langdona i wsp. [98] przemawiają za tym następujące obserwacje:

Chociaż sekwencje Emi prawdopodobnie są aktywne we wszystkich komórkach linii B, to jednak chłoniaki mają charakter monoklonalny (za czym przemawia rearanżacja genów Ig), a więc pochodzą z jednej komórki.

Czas wystąpienia chłoniaków u poszczególnych myszy waha się od 3 tygodni życia do 6 miesięcy.

Przed powstaniem chłoniaka obserwuje się u tych zwierząt fazę przedchłoniakową, którą cechuje poliklonalna proliferacja jeszcze nienowotworowych wielkich prekursorowych komórek pre-B. Prezentują one kilka okresów dojrzewania linii B i we wczesnym okresie życia zwierzęcia naciekają szpik oraz śledzionę, ale nie węzły chłonne i grasicę, które zostają zajęte dopiero w fazie nowotworowej.

U myszy Emi-**myc** pula komórek pre-B jest od 4 do 5 razy większa od prawidłowej, liczba zaś komórek pre-B, będących w cyklu mitotycznym, jest 2-krotnie większa, co daje razem co najmniej 10-krotnie więcej dzielących się komórek B. Komórki pre-B są szczególnie podatne na uszkodzenia chromatyny w loci Ig , gdzie zachodzi bardzo aktywna rearanżacja DNA. Tak więc onkogenaza u myszy Emi-**myc** wiąże się ze wzrostem proliferacji puli ranliwych komórek pre-B [98], niemniej jednak nie jest jeszcze znane ostatnie krytyczne zdarzenie decydujące o powstaniu nowotworu. Zdaniem Duesberga [51] aktywacja **c-myc** per se nie wystarczy do transformacji nowotworowej, za czym m.in. przemawiają następujące dane:

w liniach komórki B wyprowadzonych z BL **c-myc** nie zawsze ulega przemieszczeniu, pomimo translokacji w 8q;

ekspresja **c-myc** nie zawsze jest zwiększona w BL;

nie udowodniono, aby **c-myc** wyizolowany z komórek nowotworowych miał zdolności transformujące.

10. WSPÓLDZIAŁANIE KILKU PROTO-ONKOGENÓW W PROCESIE ONKOGENEZY

Obecnie przyjmuje się, że dla konwersji prawidłowej komórki w komórkę nowotworową konieczne jest współdziałanie co najmniej dwu onkogenów. Pogląd ten nawiązuje do hipotezy aktywacji czynnościowo różnych onkogenów w poszczególnych etapach onkogenezy [96]. Pierwszą parą onkogenów, które, jak wykazano, współdziałały w onkogenezie były **c-Ha-ras** i **c-myc**. Transfekcja płodowych fibroblastów szczura aktywnym, lecz pojedynczym proto-onkogenem **ras** lub **myc** nie wywołała pełnej transformacji nowotworowej, za to po wprowadzeniu w płodowe fibroblasty obydwu proto-onkogenów następował rozwój włókniako-mięsaka [97].

Ze względu na wzajemne uzupełniające się działanie proto-onkogenów wyróżniono dwie czynnościowo odmienne klasy [170]. Produkty onkogenów klasy I są zlokalizowane w cytoplazmie, natomiast klasy II znajdują się w jądrze komórkowym. Tab. 4, wzorowana na pracy Landa [96], przedstawia obydwie klasy uzupełniających się onkogenów.

W EBV ujemnych, sporadycznych BL, poza aktywacją **c-myc** obserwowano aktywację także innych proto-onkogenów. Tak np. w linii komórkowej Ramos, wyprowadzonej z BL, wykryto zmutowany **N-ras** [118], bezpośrednio zaś z komórek nowotworowych pacjenta z nawrotem BL wyizolowano **Ki-ras** [104].

Istnieją doniesienia o wykryciu, i to zarówno w wypadkach BL EBV dodatnich, jak i EBV ujemnych aktywacji B-lym [46, 47], genu, który wywołuje transformację w chłoniakach torebki Fabrycjusza drobiu. Ponadto w komórkach BL obserwowano wtórny wzrost transkryptów proto-onkogenów do **v-fms** i **v-fes** [1].

TABELA 4
Klasy współdziałających onkogenów [96]

Klasa 1 (onkogeny cytoplazmatyczne)	Klasa 2 (onkogeny jądrowe)
Ha-ras	myc
Ki-ras	N-myc
N-ras	myb
src	p 53
Antygen T średni wirusa polioma	Gen E 1 A adenowirusa typu 12
	Antygen T duży wirusa polioma
	Antygen T duży SV 40

11. AUTOKRYNNA STYMULACJA WZROSTU

Nasuwa się pytanie, czy do rozwoju chłoniaków odnosi się także hipoteza Sporna i Torado [154] autokrynej stymulacji wzrostu stanowiącej jeden z głównych mechanizmów transformacji.

Czynnik wzrostu limfocytów B lub interleukina-4 (w skrócie IL-4) oraz czynnik wzrostu i dojrzewania limfocytów B lub IL-6, a także IL-2 są syntetyzowane przez stymulowane antygenem lub mitogenem limfocyty T. Te czynniki, z wyjątkiem IL-2, mogą być uwalniane także przez same limfocyty B, chociaż w niedużych ilościach. Ponadto IL-6 jest wydzielana przez tkanki nowotworowe pochodzenia nielimfoidalnego, jak szpiczak mnogi i śluzak serca [87, 176]. W niektórych liniach T-komórkowych, jak TCL-Nal, stransformowanej wirusem typu I ludzkiej białaczki T-komórkowej, dochodzi do stałej (konstytutywnej) ekspresji genu IL-6.

Yasukawa i wsp. [176] nie stwierdzili ekspresji IL-6 mRNA w linii komórki B stransformowanej EBV, ani w linii chłoniaka Burkitta. A jednak linie chłoniaka Burkitta uwalniają IL-4, choć często tracą cechę zależności od tego czynnika wzrostu, podobnie jak proliferujące *in vivo* komórki Burkitta. Klein i Klein [91] sugerowali, że niezależność od egzogenego czynnika wzrostu może wynikać ze wzmocnienia ekspresji *c-myc*, działającego wówczas na wzór samodzielnego rozrusznika cyklu komórkowego. W związku z tym należy przypomnieć doświadczenie Classon i wsp. [28], w którym kotransfekcja komórek linii chłoniaka konstruktem plazmidowym z aktywnym *c-myc* zwiększała 10-krotnie replikację DNA adenowirusa SV 40, a tym samym syntezę DNA gospodarza. Podobnie w badaniach Kaczmarka i wsp. [82], wprowadzenie białka *c-myc* powodowało przejście komórki spoczynkowej w stan kompetencji wzrostu. Można wobec tego spodziewać się, że przejście z fazy G_0 do G_1 cyklu komórkowego jest wynikiem złożonej interakcji kilku różnych genów z *c-fos* i *c-myc* włącznie, a prawidłowa ekspresja ich jest kontrolowana przez peptydowe czynniki wzrostowe limfocytów B. Nie kontrolowany locus *c-myc* mógłby indukować niezależność od czynników wzrostu nie przez wzbudzenie mechanizmu autokrynnego, lecz raczej przez zastępowanie sygnału czynnika wzrostowego. *C-myc*, nie będąc więc *per se* czynnikiem wzrostowym, indukuje kompetencję wzrostu wyrażającą się wytrąceniem komórek z fazy G_0 , zastępując niejako działanie IL-4. Białko *c-myc* jest więc kompetencyjnym czynnikiem wzrostowym.

12. ROLA WIRUSA EPSTEINA-BARR W PATOGENEZIE CHŁONIAKA BURKITTA

Dane pochodzące z kilku różnych kierunków badawczych wskazują na EBV, jako dodatkowy czynnik w patogenezie endemicznego BL i AIDS-BL.

W obu tych typach BL komórki nieodmiennie noszą genom EBV [109], który zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* „unieśmiertelnia” zakażone komórki B [42, 76, 89, 135]. EBV wywołuje aktywację komórek B, będących w fazie spoczynkowej cyklu komórkowego, poprzez wiązanie się z receptorem dla składowej 3d dopełniacza (C3d) [57, 58], określanym obecnie jako antygen CD 21. Sugeruje się, że antygen CD 21 uczestniczy zarówno w kontroli cyklu komórkowego aktywnych komórek B [112], jak i pełni funkcje receptora EBV komórki B [57, 58]. W następstwie związania tego antygeny przez EBV, na powierzchni komórki B ujawnia się antygen BLAST-2 lub CD 23. Antygen CD 23 jest wcześniej występującym markerem aktywacji komórki B [160] i, jak się wydaje, jest szczególnym receptorem komórki B, tzw. receptorem o niskim powinowactwie wobec FcIgE (low-affinity IgE/Fc receptor) [18, 177]. Ponadto występuje jeszcze jeden marker aktywacji komórki B – antygen Bac-1 (od B-cell restricted activation antigen), który jak się wydaje, odpowiada receptorowi dla IL-4 [158]. Wszystkie te trzy antygeny (CD 21, CD 23 i Bac-1) są markerami komórek predysponowanych do „unieśmiertelnienia”. Ponieważ komórki B są zdolne do wytwarzania czynników wzrostu, jest więc prawdopodobne że „unieśmiertelnienie” zachodzi poprzez mechanizm autokryny. Wykazano, i to zarówno w odniesieniu do limfocytów „unieśmiertelnionych” przez EBV (linie limfoblastoidalne), jak i do komórek pochodzących z EBV dodatniej linii BL, że wytwarzają one i reagują na IL-4 i IL-1 [139]. Wśród białek jądrowych „unieśmiertelnionych” komórek B występują także antygeny samego EBV, z których kluczową rolę odgrywa drugi antygen jądrowy EBV (Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-2, w skrócie EBNA-2), kodowany przez rejon LT-1 genomu EBV. Jest to antygen transformacyjny. Jak wykazały badania Mossa i wsp. [117], epitop tego antygeny jest prezentowany na powierzchni komórek linii limfoblastoidalnych „unieśmiertelnionych” przez EBV, ale nie na komórkach BL EBV dodatnich.

Zdolności „unieśmiertelniające” EBV w stosunku do komórek B zostały dodatkowo potwierdzone dzięki wykryciu przypuszczalnie przednowotworowych klonów komórkowych zakażonych EBV w węzłach chłonnych i w krwi obwodowej pacjentów z AIDS i u pacjentów w okresie wylegania AIDS [15, 129].

Zakażenie EBV wydaje się analogiczne do aktywacji *c-myc*, która jest konieczna, ale nie wystarczająca dla wywołania transformacji *in vitro* lub rozwoju nowotworu *in vivo*. Za ograniczoną rolę EBV w patogenezie BL przemawiają także dane epidemiologiczne (4% przypadków endemicznego BL i 85% przypadków sporadycznego BL jest EBV ujemne. W tym kontekście niezwykle interesujące są badania Lombardi i wsp. [107]. Autorzy ci stosując dwa czynniki genetyczne, które odgrywają rolę w patogenezie BL, a mianowicie aktywny *c-myc* i EBV, uzyskali nowotworową konwersję komórek B. Wprowadzali oni aktywny *c-myc* w ludzkie komórki limfoblastoidalne, po-

chodzące albo z zakażonej EBV in vitro prawidłowej krwi pępowinowej, albo z krwi obwodowej pacjentów z AIDS. W obu rodzajach komórek stała ekspresja egzogennej **c-myc** powodowała:

ujemną regulację ekspresji endogennej **c-myc**;

zmianę charakteru wzrostu komórek, który stawał się typowy dla komórek transformowanych;

nabycie przez komórki właściwości onkogennych w stosunku do myszy z niedoborami immunologicznymi.

Zakażenie EBV i aktywacja **c-myc** są więc wystarczające dla nowotworowej konwersji ludzkich komórek B in vitro, co wskazuje, że oba te czynniki odgrywają również rolę in vivo w rozwoju BL.

Niedawno Lacy i wsp. [95] wykazali, że zakażenie EBV wywołuje amplifikację i deregulację **c-myc** w pierwotnie EBV ujemnej linii komórkowej BJAB wprowadzonej z BL.

W komórkach BL zakażonych EBV w sposób naturalny lub celowo w laboratorium występuje podwyższony poziom **c-fgr** mRNA [24, 138]. **C-fgr** należy do rodziny genów kodujących kinazę tyrozynową, której nadmierna aktywność uszkadza mechanizmy kontrolujące wzrost komórki. Ekspresja **c-fgr** występuje także w wychodzącym z komórki epitelialnej raku nosogardzieli [138], który patogenetycznie wiąże się z EBV. Te specyficzne związki między zakażeniem EBV a ekspresją **c-fgr** sugerują aktywację transkrypcji **c-fgr** przez EBV [24]. Według Littlera i Arranda [106] sam EBV koduje inny enzym odgrywający rolę we wzroście komórki, a mianowicie kinazę tymidynową.

13. ROLA INNYCH WIRUSÓW W PATOGENEZIE CHŁONIAKÓW

W patogenezie nieziarniczych chłoniaków poza EBV istotną rolę odgrywają jeszcze co najmniej dwie wzmiankowane grupy wirusów, a mianowicie ludzkie wirusy limfotropowe T i B.

Obecnie rozróżnia się dwie podgrupy ludzkich wirusów limfotropowych T: podgrupę onkowirusów (*Oncoviridae*), do której należą wirusy ludzkiej białaczki T-komórkowej (Human T-Cell Leukemia Viruses, w skrócie HTLV) typu I i II (HTLV-1 i HTLV-II);

podgrupę wirusów powolnych (*Lentiviridae*), do której należą ludzkie wirusy zespołu nabytego braku odporności (Human Immunodeficiency Virus, w skrócie HIV) typu I i II (HIV-1 i HIV-II) – inne nazwy HIV-I to LAV-I, HTLV-III i ARV (skrót od AIDS-related virus).

HTLV-I odgrywa rolę etiologiczną w ludzkiej białaczce T-komórkowej. Jest to proliferacja limfocytów T indukujących/pomocniczych (CD 4⁺), en-

demicznie występująca w Japonii, na Karaibach, na północnych obszarach Ameryki Południowej i w południowo-wschodniej części Stanów Zjednoczonych, zwłaszcza u murzynów. Obraz kliniczny tej postaci białaczki trochę przypomina obraz kliniczny tzw. skórnych chłoniaków T-komórkowych, do których należą ziarniniak grzybiasty i zespół Sézary'ego ale różni się od nich znacznie bardziej złośliwym przebiegiem [113, 165, 174].

HTLV-II, jak się wydaje, jest odpowiedzialny za rzadki wariant T-komórkowy ludzkiej białaczki włochatokomórkowej [85, 146].

Zarówno HTLV-I, jak i HTLV-II mają zdolność „unieśmiertelniania” komórek T CD 4⁺ [25, 114]. Stransformowane przez HTLV linie komórkowe, jak również komórki nowotworowe charakteryzuje zwiększona ekspresja receptorów dla IL-2. Niedawne doniesienia [67] sugerują, że produkt genu transaktywującego (**trans-activating gene**, w skrócie **tat**) HTLV – p 40 × działa bezpośrednio lub pośrednio na sekwencje wzmacniające ekspresję zarówno genu IL-2, jak i genu dla receptora IL-2. Wydaje się, że w rozwoju nowotworów wywołanych HTLV odgrywa rolę mechanizm autokrynej stymulacji wzrostu. Aktywujące działanie p 40 × dotyczy nie tylko pewnych linii komórki T, ale również komórki B [67, 157]. HTLV aktywuje także onkogen *sis* [113].

HIV został opisany w 1983 r. przez Barré-Sinoussi i wsp. [6], a jego związek etiologiczny z AIDS został potwierdzony rok później przez Gallo i wsp. [61]. Oba typy HIV (HIV-I i HIV-II) różnią się antygenowo. HIV-II występuje głównie w Zachodniej Afryce i nie stwierdzono go w Stanach Zjednoczonych. HIV-II, podobnie jak HIV-I, odgrywa ważną rolę w etiologii AIDS, ale jest mniej patogenny. Osobnicy z Zachodniej Afryki HIV-II serododatni byli zdrowi i nie wykazywali żadnych nieprawidłowości immunologicznych przez ponad dwa lata (cyt. wg [78]). Niedawno w laboratorium Gallo (cyt. wg [78]) od Nigeryjczyka chorego na AIDS wyizolowano wirusa odmiennego antygenowo od HIV-I i HIV-II.

HIV zakaża limfocyty T CD 4⁺, a także inne komórki CD 4⁺, jak monocyty, makrofagi, komórki prezentujące antygen oraz jeszcze niedokładnie określone komórki mózgu noszące także ten antygen [171]. Jak się wydaje, CD 4 jest receptorem komórkowym dla HIV lub przynajmniej częścią tego receptora [38, 150]. Interakcja między otoczką HIV a CD wiąże się zarówno z wystąpieniem efektów cytoplazmatycznych, prowadzących ostatecznie do śmierci komórki, jak i ze zmiennością cech osłonki HIV (odmienność osłonek wyizolowanych od różnych osobników lub od tego samego osobnika w różnym czasie). Oba te zdarzenia mogą stanowić ważny mechanizm, dzięki któremu wirus wymyka się spod nadzoru immunologicznego gospodarza [78].

HIV, jak to już powiedziano, odgrywa rolę w etiologii AIDS-BL współdziałając z EBV, a także w rozwoju innych nowotworów (mięsaków i raków) występujących w przebiegu AIDS [134].

Ludzki wirus limfotropowy B (Human B-Lymphotropic Virus, w skrócie HBLV) należy do grupy ludzkich wirusów herpes, podobnie jak EBV, wirus cytomegalii, wirusy opryszczki (typ 1 i 2) oraz wirus odry-półpaśca. HBLV różni się jednak od pozostałych wirusów herpes wybiórczym powinowactwem do komórek B, charakterystyczną morfologią i cechami antygenowymi. Wyizolowano go w laboratorium Gallo [81, 149] z krwinek białych krwi obwodowej od 6 chorych: u dwu pacjentów HIV serododatnich (jeden z chłoniakiem w przebiegu AIDS, a drugi z dermatopatycznym powiększeniem węzłów chłonnych), u pozostałych czterech pacjentów rozpoznano limfadenopatię angioimmunoblastyczną, skórny chłoniak T-komórkowy, chłoniak immunoblastyczny i ostrą białaczkę T-komórkową.

Komórki B zakażone przez HBLV ulegają transformacji nowotworowej, ale wirus nie ma zdolności „unieśmiertelniających” i komórki giną po 10–12 dniach.

Nie jest wykluczone, że w rozwoju chłoniaków, łącznie z BL, odgrywa rolę zakażenie jeszcze innym wirusem, który działa poprzez mechanizm wbudowania-translokacji-i-wycięcia (hit-and-run). Sugerują to Mushinski i wsp. [120] komentując doświadczenie, w którym retrowirus białaczki Abelsona myszy, jeśli przez odpowiednio długi czas pozostaje w genomie prekursorowych komórek B myszy, powoduje rearanżację i aktywację komórkowego proto-onkogenu *c-myb* i rozwój chłoniaka limfoplazmocytozy. Potem jednak geny zintegrowanego wirusa są eliminowane (hit-and-run tumor virus) i dlatego niezwykle trudne jest udowodnienie jego roli w rozwoju nowotworu. W jednym z sześciu przypadków chłoniaka limfoplazmocytozy myszy poza rearanżacją i aktywacją *c-myb* autorzy wykryli obecność zintegrowanego prowirusa białaczki Abelsona myszy, podczas gdy w pięciu pozostałych stwierdzono tylko rearanżację i istotnie wzmożoną transkrypcję *c-myb*, co skłoniło ich do wysunięcia tej hipotezy.

14. ROLA PRZEWLEKŁEJ MALARII W PATOGENEZIE CHŁONIAKA BURKITTA

Ważnym, choć nie do końca poznanym czynnikiem w rozwoju endemicznej postaci chłoniaka Burkitta jest malaria i prawdopodobnie jeszcze inne zakażenia pasożytnicze. Przemawiają za tym następujące dane:

wysoce znamienne korelacje geograficzne między częstością występowania BL a endemiczną malarią;

bezpośrednia korelacja między zależnym od wieku występowaniem endemicznego BL a zależnym od wieku najwyższym poziomem przeciwciał skierowanych przeciw malarii;

rzadsze występowanie BL w niektórych miastach, gdzie również zakażenie malarią jest rzadsze niż na obszarach wiejskich [83, 116, 126].

Klein [90] podejrzewa, że w endemicznym BL zakażeniu EBV ulegają proliferujące limfocyty, jako wyraz stymulacji malarią. Gravley i Ablashi [65] wykazali, że *Plasmodium falciparum* indukuje w komórkach linii Raji wzrost poziomu wczesnego antygeny R-EBV (early antigen-restricted, w skrócie EA-R), a w linii AG 876 zwiększa liczbę komórek noszących antygen kapsydowy wirusa (virus capsid antigen, w skrócie VCA). Powtarzające się ataki malarii powodują występowanie cyklicznych, wymykających się spod wpływu nadzoru immunologicznego podziałów komórek B, co zwiększa możliwość wystąpienia translokacji chromosomowych i ekspansji klonalnej [173]. Jest to tym łatwiejsze, że w przebiegu przewlekłej malarii zostaje upośledzona czynność komórek T i zdolność układu immunologicznego do eliminacji zakażonych EBV komórek B.

Zresztą poza malarią także inne zakażenia pasożytnicze mogą odgrywać rolę w szerzeniu się endemicznego BL. Tak np. wykazano, że w niektórych populacjach Ameryki Łacińskiej i Południowo-Wschodniej Azji, które mają wysoki wskaźnik malarii, ale niski wskaźnik innych chorób inwazyjnych, częstość występowania BL jest dosyć niska [103].

15. ASPEKTY NADZORU IMMUNOLOGICZNEGO W CHŁONIAKACH

Ekspresja własnych antygenów klasy I głównego układu zgodności tkankowej (Major Histocompatibility Complex, w skrócie MHC), wraz z antygenami nowotworowymi warunkuje wystąpienie aktywności cytotoksycznych limfocytów T. Pojawiły się jednak doniesienia [144], że pod wpływem onkogenów może dojść do supresji lub modulacji antygenów MHC klasy I na powierzchni komórki. Tę zdolność mają przede wszystkim onkogeny jądrowe, a zwłaszcza gen E 1 A adenowirusa i geny z rodziny *myc*, na poziomie najprawdopodobniej posttranskrypcyjnym. Na przykład nadmiernie wzmożonej ekspresji *c-myc* w czerniaku towarzyszy obniżenie ekspresji antygenów MHC klasy I. Nie wiadomo, czy analogiczna sytuacja występuje w BL, bowiem na powierzchni komórek BL też stwierdzono niską ekspresję antygeny HLA-A, co utrudnia rozpoznawanie tych komórek przez autologiczne limfocyty cytotoksyczne.

Jeszcze bardziej niekorzystnie przedstawia się sprawa ekspresji na powierzchni komórek BL epitopu transformacyjnego antygeny EBNA-2. Występowanie epitopu EBNA na powierzchni komórki umożliwia jego rozpoznanie przez komórki T zarówno typu pomocniczego, jak i cytotoksycznego. Epitop ten występuje jednak tylko na powierzchni komórek „unieśmiertelnionych” przez EBV linii limfoblastoidalnych, natomiast nie ma go na powierzchni komórek BL [117]. Stąd powstało podejrzenie, że komórki BL EBV dodatniego mogą

po prostu zostać nie zauważone przez komórki nadzoru immunologicznego.

Są również dowody, że immunosupresja przyspiesza rozwój BL, jak również innych chłoniaków o wysokim stopniu złośliwości. Patologiczna immunosupresja ma miejsce w dziedzicznie uwarunkowanych niedoborach immunologicznych, a także bywa narzucona działaniem medycznym. Zdarza się to u chorych leczonych przeszczepami narządów, a zwłaszcza przeszczepami szpiku. Na szczególne ryzyko narażeni są biorcy szpiku niezgodnego i pozbawionego limfocytów T oraz poddani immunoterapii skierowanej przeciw ich własnym komórkom T. Badania serologiczne Shapiro i wsp. [152] wykryły u tych chorych obecność genomu EBV, monoklonalną proliferację limfocytów B, rearanżację genów immunoglobulinowych i aberracje chromosomowe.

Podobna sytuacja może mieć miejsce u chorych z zespołami wrodzonych niedoborów odporności, zwłaszcza sprzężonych z płcią, jak mutacja w locus XLA (od X Linked Agammaglobulinemia). U tych chorych rozwijają się limfoprolifernacje wychodzące z komórek B (typu hiperplazji lub złośliwej proliferacji) [68, 136].

16. WIELOETAPOWY ROZWÓJ CHŁONIAKA BURKITTA

Patogeneza nowotworów jest generalnie rozumiana jako proces wieloetapowy. Klein i Klein [91] sugerują co najmniej 3 etapy w rozwoju endemicznego BL z udziałem trzech układów genetycznych: jeden z nich jest pochodzenia wirusowego, a dwa pochodzenia komórkowego, jak nie kontrolowana ekspresja *c-myc* i aktywacja jeszcze innych proto-onkogenów.

W etapie pierwszym dochodzi do przewlekłej stymulacji i aktywacji układu B-komórkowego przez czynniki zakaźne, zwłaszcza przez EBV, co przyczynia się do znacznego zwiększenia puli proliferujących limfocytów B, mitotycznie aktywnych o szybkich obrotach cyklu komórkowego. Jest możliwe, że w tym czasie pojawiają się pierwsze „nieśmiertelnione” klony aktywne immunologicznie. Komórki na tym etapie nie mają jeszcze cech nowotworowych, proliferacja ich zależy od czynników wzrostowych, ale rozwija się stymulacja autokryna, która zdominuje i uniezależni dalsze pokolenia komórek B od egzogennych interleukin. Kofaktory środowiskowe, jak np. przewlekła malaria, dodatkowo wzmagają ekspansję klonu komórek B przez ich poliklonalną aktywację.

W etapie drugim zachodzi już translokacja t/8;14/ lub jeden z jej wariantów z udziałem chromosomu 8. Może być to zdarzenie przypadkowe. Prawdopodobniejsza jednak wydaje się możliwość wpływu na układ immunologiczny ciągłej stymulacji antygenowej (czynniki zakaźne). Wzrost puli proliferujących komórek B, w których zachodzi stała rearanżacja genów Ig,

zwiększa prawdopodobieństwo błędów podczas łączenia segmentów V-D-J lub przełączania klasy izotypu, co prowadzi do translokacji chromosomowych. W następstwie translokacji **c-myc** zostaje umieszczony w genomie w zestawieniu z locus Ig aktywującym jego ekspresję w sposób nielegalny, z pozbawieniem własnej kontroli. Nadmierna i stała ekspresja produktu **c-myc** zmusza komórki do ciągłej aktywności mitotycznej niezależnej od zewnątrz pochodnych czynników wzrostowych, a być może czyni je także niewrażliwymi na indukcję różnicowania, co w końcowym efekcie prowadzi do ekspansji klonu z korzystną dla przeżycia translokacją chromosomową.

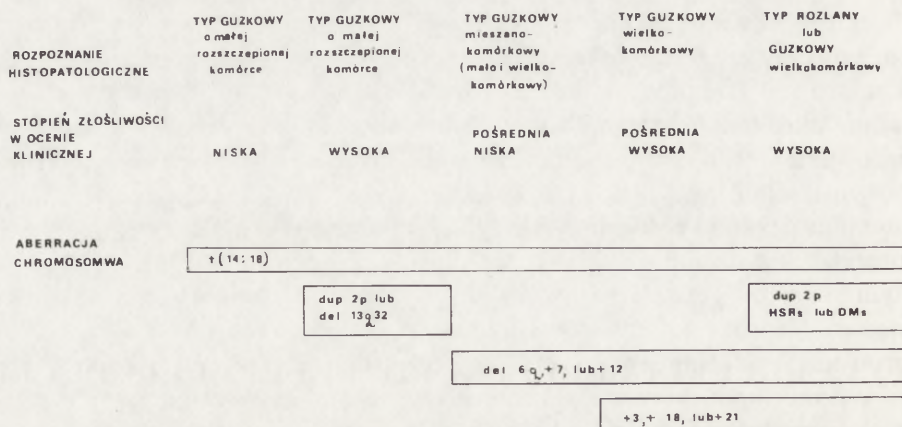
W kolejnym etapie dochodzi do aktywacji innych proto-onkogenów, jeszcze nie zdefiniowanych. Klein i Klein [91] sugerują współdziałanie między **c-myc** i **B-lym** (choć ten ostatni zdaniem Mushinskiego i wsp. [119] nie powinien być zaliczany do onkogenów) lub zmutowanymi genami **ras** (tab. 5).

TABELA 5

Współdziałanie patogenów w rozwoju endemicznego chłoniaka Burkitta (modyfikacja wg [91])

Wirus Epsteina-Barr	Powoduje „unieśmiertelnienie” komórki B przez mechanizm autokryny. Proliferyduje klon latentnie zakażonych komórek B, które są jednak zależne od czynników wzrostowych i podatne na wpływy nadzoru immunologicznego
Przewlekła malaria	Zwiększa pulę komórek docelowych przez poliklonalną aktywację komórki B, a ponadto wywołuje supresję komórek T
Aktywacja c-myc	Wskutek translokacji chromosomowej c-myc zostaje połączony z którymś z loci immunoglobulinowych, czego następstwem będzie jego niekontrolowana transkrypcja. Stała transkrypcja c-myc wiąże się z: nabyciem przez komórkę „kompetencji wzrostu” i uniezależnieniem jej od regulacyjnego wpływu czynników wzrostowych („unieśmiertelnienie” komórki B), zablokowaniem różnicowania (choć ciągła transkrypcja c-myc nie wpływa na ukierunkowanie komórki)
Mutacja genów z rodziny ras i/lub innych	Geny te mają zdolności transformujące komórki NIH 3T3 i prawdopodobnie współdziałają z aktywnym c-myc

Niektóre dane wskazują, że ekspansja klonu nowotworowego zachodzi tylko wówczas, gdy translokacja chromosomowa ma miejsce w pierwotnej, prekursorowej komórce B, która znajdowała się w specyficznym etapie rozwoju, określonym przez Croce i Nowella [37] jako faza „otwarcia na różnicowanie” (window of differentiation). Wreszcie nie jest wykluczone, że po zaistnieniu translokacji chromosomowej w rozwoju BL odgrywają rolę jeszcze inne czynniki patogenetyczne, jak już wzmiankowana aktywacja innych onkogenów lub działanie czynników wzrostu i różnicowania [75]. Przemawia za tym m.in. progresja nowotworu w późniejszych okresach choroby, gdy występują wtórne zmiany w kariotypie. Tak np. Pegoraro i wsp. [128] wyprowadzili od chorego z ostrą białaczką limfoblastyczną B-komórkową linię, w której występowały dwie translokacje chromosomowe: t/8;14/ – charakterystyczna dla BL i t/14;18/ – charakterystyczna dla chłoniaka guzkowego. Autorzy sugerują dwuetapowy model rozwoju nowotworu. Pierwotnym zdarzeniem jest translokacja t/14;18/ z aktywacją przez locus łańcucha ciężkiego Ig w 14q32, przypuszczalnego onkogenu *bcl-2* w locus 18q21. Następstwem tej rearanżacji i stymulacji jest ekspansja klonu komórek B z t/14;18/ i rozwój nowotworu o dosyć niskim stopniu złośliwości. W drugim etapie w klonie tym zachodzi dodatkowa, acz nieprzypadkowa translokacja t/8;14/ z aktywacją *c-myc* i rozwojem nowotworu o wysokim stopniu złośliwości. W istocie można się spodziewać, że ekspansja klonu nowotworowego o niskim stopniu złośliwości zwiększa prawdopodobieństwo dodatkowych translokacji chromosomowych w przebiegu pospiesznej rearanżacji genów Ig. deJong i wsp. [44] opisali przypadek chłoniaka złożonego z dwu komponentów. Jednym było utkanie chłoniaka guzkowego o fenotypie dojrzałej komórki B, a drugim – chłoniak limfoblastyczny o fenotypie prekursorowej komórki B, zlokalizowany w przestrzeniach międzyguzkowych węzła chłonnego. Autorzy zakładają, że pierwotną zmianą, zachodzącą prawdopodobnie w prekursorowych komórkach B, jest translokacja t/14;18/, która zapoczątkowuje rozwój dosyć łagodnego chłoniaka guzkowego. W równoległych przetrwałych prekursorowych komórkach B ma miejsce druga translokacja t/8;14/ obejmująca drugi chromosom 14. W podklonie z dwiema translokacjami dochodzi do aktywacji *c-myc* i szybkiej klonalnej ekspansji limfoblastów cechujących się immunofenotypem prekursorowej komórki B, podobnym zresztą do fenotypu linii komórkowej, uzyskanej przez Pegoraro i wsp. [128] od chorego z ostrą białaczką limfoblastyczną. Obserwacje te potwierdzają także badania Yunisa i wsp. [179] prowadzone u 71 chorych z chłoniakiem guzkowym. W 85% przypadków występowała translokacja t/14;18/. W 10 przypadkach, w których ta translokacja była jedyną zmianą, nowotwór miał przebieg łagodny i większość chorych nie wymagała leczenia. Natomiast u chorych, u których wystąpiły dodatkowe aberracje chromosomowe, obserwowano ewolucję w wielkomórkowe chłoniaki o wysokim stopniu złośliwości (ryc. 5).



Ryc. 5. Model ewolucji chłoniaka guzkowego z translokacją t/14;18/. Progresji nowotworu towarzyszy stopniowe nagromadzenie powtarzających się aberracji chromosomów (wg [179]): t – translokacja (wymiana materiału genetycznego między dwoma chromosomami); dup – duplikacja prążka lub segmentu chromosomu; del – delecja prążka lub segmentu chromosomu; + – trisomia lub dodatkowa kopia chromosomu; HSRs (od Homogenous Staining Region) – jednorodnie barwiący się odcinek chromosomu; DMs (od Double Minute Chromosome) – pozachromosomowe fragmenty chromatyny

Alternatywny model rozwoju endemicznego BL proponują Lenoir i Bornkamm [103]. Według nich etapem pierwszym i zasadniczym w rozwoju BL jest zmiana genetyczna, a więc zaistnienie jednego z trzech wariantów translokacji. Pojawienie się tej zmiany poprzedza a nie następuje po zakażeniu EBV. Przyszłość pokaże, który z tych dwu modeli jest prawdziwy, ale oba są wiarygodne, jako wynikające z obecnego stanu wiedzy.

Refleksje po napisaniu tego artykułu oddaje cytat pochodzący z 1819 r. z pracy francuskiego lekarza i filozofa Francois-Joseph'a Berard'a: „La vérité se concile tous les intérêts: elle n'est que paix et harmonie dans le monde intellectuel” („Prawda zjednywa sobie wszystkie dążenia: jest wszakże pokojem i harmonią w świecie intelektu”).

PIŚMIENNICTWO

- [1] ABLASHI D. V., Role of co-factors in etiology of EBV-related diseases. [W:] Epstein-Barr Virus and Human Disease, Red: P. H. Levine, D. V. Ablashi, M. Nonoyama, G. R. Pearson, R. Glaser, Clifton, New Jersey, Humana Press 1987, 415-421.
- [2] ADAMS J. M., GERONDAKIS S., WEBB E., CORCORAN L. M., CORY S., Cellular *myc* oncogene is altered by chromosome translocation to an immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **80**: 1982-1986, 1983.

- [3] ADAMS J. M., HARRIS A. W., PINKERT C. A., CORCORAN L. M., ALEXANDER W. S., CORY S., PALMITER R. D., BRINSTER R. L., The *c-myc* oncogene driven by immunoglobulin enhancer induces lymphoid malignancy in transgenic mice, *Nature*, **318**: 533–538, 1985.
- [4] ARMELIN H. A., ARMELIN M. C. S., KELLY K., STEWART T., LEDER P., COCHRAN B. H., STILES C. D., A functional role for *c-myc* in the mitogenic response to platelet-derived growth factor, *Nature*, **310**: 655–660, 1984.
- [5] BAKHSHI A., JENSEN J. P., GOLDMAN P., WEIGHT J. J., McBRIDE J. W., EPSTEIN A. L., KORSMEYER S. J., Cloning of the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: Clustering around J4H5 on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18, *Cell*, **41**: 899–906, 1985.
- [6] BARRÉ-SINOUSSE F., CHERMANN J. C., REY F., NUGEYRE M. T., CHAMARET S., GRUEST J., DAUGUET C., AXLER-BLIN C., VEZINET-BRUN F., ROUZIOUX C., ROGENBAUM I. V., MONTAGNIER L., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science*, **220**: 868–870, 1983.
- [7] BATTEY J., MOULDING C., TAUB R., MURPHY W., STEWART T., POTTER H., LENOIR G., LEDER P., The human *c-myc* oncogene: Structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma, *Cell*, **34**: 779–787, 1983.
- [8] BENJAMIN D., MAGRATH I. T., MAGUIRE R., JANUS C., TODD H. D., PARSONS R. G., Immunoglobulin secretion by cell lines derived from African and American undifferentiated lymphomas of Burkitt's and non-Burkitt's type, *J. Immunol.*, **129**: 1336–1342, 1982.
- [9] BENTLEY D. L., GROUDINE M., A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of *c-myc* in differentiated HL 60 cells. *Nature*, **321**: 702–706, 1986.
- [10] BENTLEY D. L., GROUDINE M., Sequence requirements for premature termination of transcription in the human *c-myc* gene, *Cell*, **53**: 245–256, 1988.
- [11] BERGER R., BERNHEIM A., Cytogenetics of Burkitt's lymphoma-leukaemia: A review, [W:] Burkitt's Lymphoma: A Human Cancer Model, Red. G. Lenoir, G. O'Connor, C. L. M. Olweny, IARC, Lyon, Sci. Publ. No. 60, 65–80, 1985.
- [12] BERGER R., BERNHEIM A., SIGAUX F., VALENSI F., DANIEL M.-T., FLANDRIN G., Two Burkitt's lymphomas with chromosome 6 long arm deletions, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **15**: 159–167, 1985.
- [13] BERNARD O., CORY S., GERONDAKIS S., WEBB E., ADAMS J. M., Sequence of the murine and human cellular *myc* oncogenes and two modes of *myc* transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumours, *EMBO J.*, **2**: 2375–2383, 1983.
- [14] BIGGAR R. J., LEE E. C., NKRUMAH F. K., WHANG-PENG J., Direct cytogenetic studies by needle aspiration of Burkitt's lymphoma in Ghana, West Africa, *JNCI*, **67**: 769–776, 1981.
- [15] BIRX D. L., REDFIELD R. R., TOSATO G., Defective regulation of Epstein-Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS related disorders. *N. Engl. J. Med.*, **314**: 874–879, 1986.
- [16] BISHOP J. M., Viruses, genes and cancer. The Harvey Lectures, Series 78, 137–171, 1984.
- [17] BLANCHARD J.-M., PIECHACZYK M., DANI C., CHAMBARD J.-C., FRANCHI A., POUSSEUR J., JEANTEUR P., *C-myc* gene is transcribed at high rate in G0 arrested fibroblasts and is post-transcriptionally regulated in response to growth factors, *Nature*, **317**: 443–445, 1985.
- [18] BONNEFOY J.-Y., AUBRY J.-P., PERONNE C., WIJDENES J., BANCHEREAU J., Production and characterization of a monoclonal antibody specific for the human lymphocyte low affinity receptor for IgE: CD 23 is a low affinity receptor for IgE, *J. Immunol.*, **138**: 2970–2981, 1987.

- [19] BRODEUR G. M., SEEGER R. C., SCHWAB M., VARMUS H. E., BISHOP J. M., Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage, *Science*, **224**: 1121–1124, 1984.
- [20] BURKITT D., Burkitt's lymphoma outside the known endemic areas of Africa and New Guinea *Int. J. Cancer*, **2**: 562–565, 1967.
- [21] CAMPISI J., GRAY H. E., PARDEE A. B., DEAN M., SONENSHEIN G. E., Cell cycle control of c-myc and c-ras expression is lost following chemical transformation, *Cell*, **36**: 242–247, 1984.
- [22] CARÉ A., CIANETTI L., GIAMPAOLO A., SPOSI N. M., ZAPPAVIGNA V., MAVILIO F., ALIMENA G., AMADORI S., MANDELLI F., PESCHLE C., Transformation of c-myc into the immunoglobulin heavy-chain locus in human acute B-cell leukemia. A molecular analysis, *EMBO J.*, **5**: 905–911, 1986.
- [23] CESARMAN E., DALLA-FAVERA R., BENTLEY D., GROUDINE M., Mutations in the first exon are associated with altered transcription of c-myc in Burkitt lymphoma, *Science*, **238**: 1272–1275, 1987.
- [24] CHEAH M. S. C., LEY T. J., TRONICK S. R., ROBBINS K. C., fgr protooncogene mRNA induced in B lymphocytes by Epstein-Barr virus infection., *Nature*, **319**: 238–240, 1986.
- [25] CHEN I. S. Y., QUAN S. G., GOLDE D. W., Human T-cell leukemia virus type II transforms normal human lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 7006–7009, 1983.
- [26] CHUNG J., SINN E., REED R., LEDER P., Trans-acting elements modulate expression of the human c-myc gene in Burkitt lymphoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 7918–7922, 1986.
- [27] CHUNG J., SUSSMAN J., ZELLER R., LEDER P., The c-myc gene encodes superimposed RNA polymerase II and III promoters, *Cell*, **51**: 1001–1008, 1987.
- [28] CLASSON M., HENRIKSSON M., SÜMEGI J., KLEIN G., HAMMARSKJÖLD M. L., Elevated c-myc expression facilitates the replication of SV 40 DNA in human lymphoma cells, *Nature*, **330**: 272–274, 1987.
- [29] CLEARY M. L., SKLAR J., Nucleotide sequence of a t/14;18/ chromosome breakpoint in follicular lymphoma, and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**: 7439–7443, 1985.
- [30] CLEARY M. L., SMITH S. D., SKLAR J., Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t/14;18/ translocation, *Cell*, **47**: 19–28, 1986.
- [31] COCHRAN B. H., ZULLO J., VERMA I. M., STILES C. D., Expression of the c-fos oncogene and a newly discovered r-fos is stimulated by platelet-derived growth factor, *Science*, **226**: 1080–1082, 1984.
- [32] COLBY W. W., CHENY E. Y., SETH D. H., LEVINSON A. D., Identification and nucleotide sequence of a human locus homologous to the v-myc oncogene of avian myelocytomatosis virus MC 29 *Nature*, **301**: 722–725, 1983.
- [33] CORCORAN L. M., ADAMS J. M., DUNN A. R., CORY S., Murine T lymphomas in which the cellular myc oncogene has been activated by retroviral insertion, *Cell*, **37**: 113–122, 1984.
- [34] CROCE C. M., Role of chromosome translocations in human neoplasia, *Cell*, **49**: 155–156, 1987.
- [35] CROCE C. M., ERIKSON J., ar-RUSHDI A., ADEN D., NISHIKURA K., Translocated c-myc oncogene of Burkitt lymphoma is transcribed in plasma cells and repressed in lymphoblastoid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**: 3170–3174, 1984.
- [36] CROCE C. M., ERIKSON J., TSUJIMOTO Y., NOWELL P. C., Molecular basis of human B- and T-cell neoplasia, [W:] *Advances in Viral Oncology*, Vol. 7, Red. G. Klein, New York, Raven Press, 35–51, 1987.

- [37] CROCE C. M., NOWELL P. C., Molecular basis of human B cell neoplasia, *Blood*, **65**: 1–7, 1985.
- [38] DALGLEISH A. G., BEVERLEY P. C., CLAPHAM P. R., GRAWFORD D. H., GREAVES M. F., WEISS R. A., The CD 4 (T 4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus, *Nature*, **312**: 763–767, 1984.
- [39] DALLA-FAVERA R., BREGNI M., ERICKSON J., PATTERSON D., GALLO R. C., CROCE C. M., Human *c-myc* oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 7824–7827, 1982.
- [40] DALLA-FAVERA R., MARTINOTTI S., GALLO R. C., ERIKSON J., CROCE C. M., Translocation and rearrangements of the *c-myc* oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas, *Science*, **219**: 963–967, 1983.
- [41] DALLA-FAVERA R., WONG-STAAAL F., GALLO R., **One** gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient. *Nature*, **229**: 61–63, 1982.
- [42] DAMBAUGH T., HENNESSY K., FENNEWALD S., KIEFF E., The EBV genome and its expression in latent infection, [W:] *The Epstein-Barr Virus: Recent Advances*, Red. M. A. Epstein i B. G. Achong, London. Heinemann Medical Books, 13–45, 1986.
- [43] DAVIS M., MALCOM S., RABBITS T. H., Chromosome translocation can occur on either side of the *c-myc* oncogene in Burkitt lymphoma cells, *Nature*, **308**: 286–288, 1984.
- [44] de JONG D., VOETDIJK B. M. H., BEVERSTOCK G. C., van OMMEN G. J. B., WILLEMZE R., KLUIN P. M., Activation of the *c-myc* oncogene in a precursor-B-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma, *N. Engl. J. Med.*, **318**: 1373–1378, 1988.
- [45] DESIDERIO S. V., YANCOPOULOS D. G., PASKIND M., THOMAS E., BOSS M. A., LANDAU N., ALT F. W., BALTIMORE D., Insertion of N regions into heavy chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B-cells, *Nature*, **311**: 752–755, 1984.
- [46] DEVINE J. M., Mechanism of activation of **HuBlym-1** gene unresolved, *Nature*, **321**: 437–439, 1986.
- [47] DIAMOND A., COOPER G. M., RITZ J., LANE A., Identification and molecular cloning of the human **Blym** transforming gene activated in Burkitt's lymphoma, *Nature*, **305**: 112–116, 1983.
- [48] DOUGLASS E. C., MAGRATH I. T., LEE E. C., WHANG-PENG J., Cytogenetic studies in non-African Burkitt lymphoma, *Blood*, **55**: 148–155, 1980.
- [49] DUESBERG P. H., Retroviral transforming genes in normal cells? *Nature*, **304**: 219–226, 1983.
- [50] — Activated proto-**onc** genes: Sufficient or necessary for cancer? *Science*, **228**: 669–677, 1985.
- [51] — Cancer genes: Rare recombinants instead of activated oncogenes (A review), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 2117–2124, 1987.
- [52] EICK D., BORNKAMM G. W., Transcriptional arrest within the first exon is a fast control mechanism in *c-myc* gene expression, *Nucl. Acid Res.*, **14**: 8331–8346, 1986.
- [53] EPSTEIN M. A., ACHONG B. G., The relationship of the EBV virus to Burkitt's lymphoma, [W:] *The Epstein-Barr Virus*, Red: M. A. Epstein, B. G. Achong, Berlin, Springer Verlag 1983, 322–327.
- [54] ERIKSON J., FINGER L., SUN L., ar-RUSHDI A., NISHIKURA K., MINOWADA J., FINAN J., EMANUEL B. S., NOWELL P. C., CROCE C. M., Dereglulation of *c-myc* by translocation of the alpha-locus of the T cell receptor in T cell leukemias, *Science*, **232**: 884–886, 1986.
- [55] FALCONE G., TATO F., ALEMA S., Distinctive effects of the viral oncogenes **myc**, **erb**,

- fps*, and *src* on the differentiation program of quail myogenic cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **82**: 426-430, 1985.
- [56] FINGER L. R., HARVEY R. C., MOORE R. C. A., SHOWE L. C., CROCE C. M., A common mechanism of chromosomal translocation in T- and B-cell neoplasia, Science, **234**: 982-985, 1986.
- [57] FINGEROTH J. D., WEIS J. J., TEDDER T. F., STROMINGER J. L., BIRD P. A., FEARON D. T., Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes is the C3d receptor CR 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **81**: 4510-4516. 1984.
- [58] FRADE R., BAREL M., EHLIN-HENRIKSSON B., KLEIN G., gp 140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 1490-1493, 1985.
- [59] FUKUHARA S., ROWLEY J. D., VARIAKOJIS D., GOLOMB H. M., Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma, Cancer Res., **39**: 3119-3128, 1979.
- [60] GALLAGHER R., COLLINS S., TRUJILLO J., McCREDIE K., AHEARN M., TSAI S., METZGAR R., AULAKH G., TING R., RUSCETTI F., GALLO R., Characterization of the continuous differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia, Blood, **54**: 713-733, 1979.
- [61] GALLO R. C., SALAHUDDIN S. Z., POPOVIC M., SHEARER G. M., KAPLAN M., HAYNES B. F., PALKER J. J., REDFIELD R., OLESKE J., SAFAI B., WHITE G., FOSTER P., MARKHAM P. D., Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS, Science, **224**: 500-503, 1984.
- [62] GOYETTE M., PETROPOULOUS C. J., SHINK P. R., FAUSTO N., Regulated transcription of *c-Ki-ras* and *c-myc* during compensatory growth of rat liver, Mol. Cell. Biol., **4**: 1493-1498, 1984.
- [63] GRAF T., WEIZSAECKER F., GRIESER S., COLL J., STEHELIN D., PATSCHINSKY T., BISTER K., BECHADE C., CALOTHY G., LEUTZ A., *v-mil* induces autocrine growth and enhances tumorigenicity in *v-myc*-transformed avian macrophages, Cell, **45**: 357-364, 1986.
- [64] GRANINGER W. B., SETO M., BOUTAIN B., GOLDMAN P., KORSMEYER S. J., Expression of *Bcl-2* and *Bcl-2-Ig*-fusion transcripts in normal and neoplastic cells, J. Clin. Invest., **80**: 1512-1515, 1987.
- [65] GRAVELY S. M., ABLASHI D. V., Induction of Epstein-Barr virus in Raji Cells by *Plasmodium falciparum* and by normal red blood cells, [W:] Epstein-Barr Virus and Human Disease, Ed: P. H. Levine, D. V. Ablashi, M. Nonoyama, G. R., Pearson, R. Glaser, Clifton, New Jersey, Humana Press, 1987, 439-444.
- [66] GREENBERG M. E., ZIFF E. B., Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene, Nature, **311**: 433-438; 1984.
- [67] GREENE W. C., LEONARD W. J., WANO Y., SVETLIK P. B., PEFFER N. J., SODROSKI J. G., ROSEN C. A., GOH W. C., HASELTINE W. A., *Trans*-activator gene of HTLV-II induces IL-2 receptor and IL-2 cellular gene expression, Science, **232**: 877-880, 1986.
- [68] GRIERSON H., PUTRILO D. T., Epstein-Barr virus infection in males with the X-linked lymphoproliferative syndrome, Ann. Intern. Med., **106**: 538-545, 1987.
- [68a] GRIESSER H., CHAMPAGNE E., TKACHUK D., TAKIHARA Y., LALANDE M., BAILLIE E., MINDEN M., MAK T. W., The human T cell receptor alpha-delta locus: A physical map of the variable, joining and constant region genes, Eur. J. Immunol., **88**: 641-645, 1988.
- [69] HALUSKA F. G., FINVER S., TSUJIMOTO Y., CROCE C. M., The t(8;14) chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results from mistakes in V-D-J joining. Nature, **324**: 158-161, 1986.

- [70] HALUSKA F. G., TSUJIMOTO Y., CROCE C. M., The t/8;14/ chromosome translocation of the Burkitt lymphoma cell line Daudi occurred during immunoglobulin gene rearrangement and involved the heavy chain diversity region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6835–6839, 1987.
- [71] – Mechanisms of chromosome translocation in B- and T-cell neoplasia, *Trends in Genetics*, **3**: 11–15, 1987.
- [72] HAYFLICK J., SEEBURG P. H., OHLSSON R., PFEIFER-OHLSSON S., WATSON D., PAPAS T., DUESBERG P. H., Nucleotide sequence of two overlapping *myc*-related genes in avian carcinoma virus OK 10 and their relation to the *myc* genes of other viruses and the cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 2718–2722, 1985.
- [73] HAYWARD W., NEEL B. G., ASTRIN S. M., Activation of a cellular *onc* gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis, *Nature*, **290**: 475–480, 1984.
- [74] HEIM S., MITELMAN F., Malignant lymphomas, [W:] *Cancer Cytogenetics* Red. S. Heim. F. Mitelman. New York, Alan R. Liss Inc, 1987, 201–225.
- [75] – Oncogenes and cancer chromosome abnormalities, [W:] *Cancer Cytogenetics*, Red. S. Heim. F. Mitelman. New York. Alan R. Liss Inc., 1987. 265–282.
- [76] HENLE W., DIEHL V., KOHN G., zur HAUSEN H., HENLE G., Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells, *Science*, **157**: 1064–1065, 1967.
- [77] HOLLIS G. F., MITCHELL K. F., BATTEY J., POTTER H., TAUB R., LENOIR G. M., LEDER P., A variant translocation places the lambda immunoglobulin genes 3' to the *c-myc* oncogene in Burkitt's lymphoma, *Nature*, **307**: 752–755, 1984.
- [78] HOXIE J. A. (editorials), Current concepts in the virology of infection with human immunodeficiency virus (HIV), A view from the III International Conference on AIDS. *Ann. Intern. Med.*, **107**: 406–408, 1987.
- [79] INCE C., BLICK M., LEE M., PAHAK S., VANDHAN-RAJ S., SELVANAYAGAM P., GUTTERMAN J. U., CABANILLAS F., *Bcl-1* gene rearrangements in B cell lymphoma, *Leukemia*, **2**: 343–346, 1988.
- [80] JOSEPHS S., BUCHBINDER A., STREICHER H. Z., ABLASHI D. V., SALAHUDDIN Z. I. in. Detection of human B-lymphotropic virus (human herpes-virus 6) sequences in B cell lymphoma tissues of three patients, *Leukemia*, **2**: 132–135, 1988.
- [81] JOSEPHS S. F., SALAHUDDIN S. Z., ABLASHI D. V., SCHACHTER F., WONG-STAAAL F., GALLO R. C., Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV), *Science*, **234**: 601–603, 1986.
- [82] KACZMAREK L., HYLAND J. K., WATT R., ROSENBERG M., BASERGA R., Microinjected *c-myc* as a competence factor, *Science*, **228**: 1313–1315, 1985.
- [83] KAFUKO G. W., BURKITT D. P., Burkitt's lymphoma and malaria, *Int. J. Cancer*, **6**: 1–9, 1970.
- [84] KAHN P., LEUTZ A., GRAF T., Individual and combined effects of viral oncogenes in hematopoietic cells, [W:] *Oncogenes and Growth Control*, Red. P. Kahn, T. Graf, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Springer Verlag, 1988, 312–319.
- [85] KALYANARAMAN V. S., SARGADHARAN M. G., ROBERT-GUROFF M., MIYOSHI I., BLAYNEY D., GOLDE D., GALLO R. C.: A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia, *Science*, **218**: 571–573, 1982.
- [86] KAN N. C., FLOREDELLIS C. S., MARK G. E., DUESBERG P. H., PAPAS T. S.: Nucleotide sequence of avian carcinoma virus MH 2: Two potential *onc* genes, one related to avian virus MC 29 and the other related to murine sarcoma virus 3611, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**: 3000–3004, 1984.
- [87] KAWANO M., HIRANO T., MATSUDA T., TAGA T., HORII Y., IWATO K., ASAOKU H., TANG B., TANABE O., TANAKA H., KURAMOTO A., KISHIMOTO T., Autocrine

- generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas, *Nature*, **332**, 83–85, 1988.
- [88] 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.
- [89] KIEFF E., HENNESSY K., DAMBAUGH T., MATSUO T., FENNEWALD S., HELLER M., PETTI L., HUMMEL M., Persistence and expression of the Epstein-Barr virus genome in latent infection and growth transformation of lymphocytes, [W:] *Epstein-Barr Virus and Associated Diseases*, Red. P. H. Levine, D. V. Ablashi, G. R. Pearson, S. D. Kottaridis, Boston, M. Nijhoff Publishing, 1985, 221–247.
- [90] KLEIN G., Lymphoma development in mice and humans: Diversity of initiation is followed by convergent cytogenetic evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 2442–2446, 1979.
- [91] KLEIN G., KLEIN E., Evolution of tumours and the impact of molecular oncology, *Nature*, **315**: 190–195, 1985.
- [92] – Conditioned tumorigenicity of activated oncogenes, *Cancer Res.*, **46**: 3211–3224, 1986.
- [93] KRUIJER W., COOPER J. S., HUNTER V., VERMA I. M., Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the *c-fos* gene and protein, *Nature*, **312**: 711–716, 1984.
- [94] LACY J., SARKAR S. N., SUMMERS W. C., Induction of *c-myc* expression in human B lymphocytes by B cell growth factor and anti-immunoglobulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 1458–1462, 1986.
- [95] LACY J., SUMMERS W. P., WATSON M., GLAZER P. M., SUMMERS W. C., Amplification and deregulation of *myc* following Epstein-Barr virus infection of a human B-cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 5838–5842, 1987.
- [96] LAND H., *Onogenes cooperate, but how?* [W:] *Oncogenes and Growth Control*, Red. P. Kahn, T. Graf, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Springer Verlag, 1988, 304–311.
- [97] LAND H., CHEN A. C., MORGENSTERN J. P., PARADA L. F., WEINBERG R. A., Behavior of *myc* and *ras* oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts, *Mol. Cell Biol.*, **6**: 1917–1925, 1986.
- [98] LANGDEN W. Y., HARRIS A. W., CORY S., ADAMS J. M., The *c-myc* oncogene perturbs B lymphocyte development in E mu-*myc* transgenic mice, *Cell*, **47**: 11–18, 1986.
- [99] Le BEAU M. M., Chromosomal fragile sites and cancer-specific rearrangements, *Blood*, **67**: 849–858, 1986.
- [100] – Chromosomal fragile sites and cancer specific breakpoints – A moderating viewpoint, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **31**: 55–61, 1988.
- [101] LEDER P., Translocations among antibody genes in human cancer, [W:] *Burkitt's Lymphoma: A Human Cancer Model*, Red. G. Lenoir, G. O'Connor, C. L. M. Olweny, IARC, Lyon, Sci. Publ. No. 60, 341–358, 1985.
- [102] LEDER P., BATTEY J., LENOIR G., MOULDING C., MURPHY W., POTTER H., STEWART T., TAUB R., Translocations among antibody genes in human cancer, *Science*, **222**: 765–771, 1983.
- [103] LENOIR G. W., BORNKAMM G. W. Burkitt's lymphoma, a human cancer model for the study of the multistep development of cancer: Proposal for a new scenario, [W:] *Advances in Viral Oncology*, Red. G. Klein, New York, Raven Press, vol. 7, 173–206, 1987.
- [104] LENOIR G. M., LAND H., PARADA L. F., CUNNINGHAM J. M., WEINBERG R. A., Activated oncogenes in Burkitt's lymphoma, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **113**: 6–14, 1984.
- [105] LIPP M., SCHILLING R., WIEST S., LAUX G., BORNKAMM G. W., Target sequences for *cis*-acting regulation within the dual promoter of the human *c-myc* gene, *Mol. Cell. Biol.*, **7**: 1393–1400, 1987.

- [106] LITTLER E., ARRAND J. R., Characterization of the EBV thymidine kinase, [W:] Epstein-Barr Virus and Human Disease, Red. P. H. Levine, D. V. Ablashi, M. Nonoyama, G. R. Pearson, R. Glaser, Clifton, New Jersey, Humana Press, 217-222, 1987.
- [107] LOMBARDI L., NEWCOMB E. W., DALLA-FAVERA R., Pathogenesis of Burkitt lymphoma: Expression of an activated c-myc oncogene causes the tumorigenic conversion of EBV-infected human B lymphoblasts, *Cell*, **49**: 161-170, 1987.
- [108] MAGRATH I., Burkitt's lymphoma, Clinical aspects and treatment. [W:] Disease of the Lymphatic System, Red. D. W. Molander, New York, Springer Verlag, 103-139, 1983.
- [109] – Clinical and pathobiological features of Burkitt's lymphoma and their relevance to treatment, [W:] Epstein-Barr Virus and Associated Diseases, Red. P. H. Levine, D. V. Ablashi, G. R. Pearson, S. D. Kottaridis, Boston, M. Nijhoff Publishing, 631-643, 1986.
- [110] MARS W. M., van TUINEN P., DRABKIN H. A., WHITE J. W., SAUNDERS G. F. A myeloid-related sequence that localized to human chromosome 8q21.1-22, *Blood*, **71**: 1713-1719, 1988.
- [111] MECHTI N., PIECHACZYK M., BLANCHARD J.-M., MARTY L., BONNEIU A., JEANTEUR Ph., LEBLEU B., Transcriptional and post-transcriptional regulation of c-myc expression during the differentiation of murine erythroleukemia Friend cells, *Nucl. Acids Res.*, **14**: 9653-9666, 1986.
- [112] MELCHERS F., ERDEI A., SCHULTZ T., DIERICH M. P., Growth control of activated synchronized murine B cells by the C3d fragment of human complement, *Nature*, **317**: 264-265, 1985.
- [113] MIWA M., SUGANO H., SUGIMURA T., WEISS R. A., Retroviruses in Human Lymphoma/Leukemia, Tokyo, The Princess Takamatsu Cancer Research Fund, 1985.
- [114] MIYOSHI I., KUBONISHI I., YOSHIMOTO S., AKAGI T., OHTSUKI Y., SHIRAIISHI Y., NAGATO K., HINUMA Y., Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukemic T-cells, *Nature*, **294**: 770-771, 1981.
- [115] MOELLING K., Properties of the *myc* and *myb* gene products, [W:] Oncogenes and Growth Control, Red. P. Kahn, T. Graf, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Springer Verlag, 271-277, 1988.
- [116] MORROW R. H. Jr., Epidemiological evidence for the role of falciparum malaria in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma, [W:] Burkitt's Lymphoma: A Human Cancer Model, Red. G. M. Lenoir, G. O. O'Connor, C. L. M. Olweny, IARC Scientific Publications No 60, IARC, Lyons, 177-186, 1985.
- [117] MOSS D. J., MYSKO I. S., BURROWS S. R., BURMAN K., McCARTHY R., SCULLEY T. B., Cytotoxic T cell clones discriminate between A- and B-type Epstein-Barr virus transformants, *Nature*, **331**: 719-721, 1988.
- [118] MURRAY M., CUNNINGHAM J., PARADA L., DAUTRY F., LEIBOWITZ P., WEINBERG R. A., The HL-60 transforming sequence: a *ras* oncogene coexisting with altered *myc* genes in haematopoietic tumors, *Cell*, **33**: 749-757, 1983.
- [119] MUSHINSKI J. F., DAVIDSON W. F., MORSE H. C., Activation of cellular oncogenes in human and mouse leukemia-lymphomas, *Cancer Invest.*, **5**: 345-368, 1987.
- [120] MUSHINSKI J. F., POTTER M., BAUER S. R., REDDY E. P., DNA rearrangement and altered RNA expression of the c-myc oncogene in mouse plasmacytoid lymphosarcomas, *Science*, **220**: 795-798, 1983.
- [121] MÜLLER R., BRAVO R., BURCKHARD J., CURRAN T. Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc, *Nature*, **312**: 716-720, 1984.
- [122] NEPVEU A., FAHRLANDER P. D., YANG J.-Q., MARCU K. B., Amplification and altered expression of the c-myc oncogene in A-MuLV transformed fibroblasts, *Nature*, **317**: 440-443, 1985.

- [123] NEPVEU A., MARCU K. B., Intragenic pausing and anti-sense transcription within the murine *c-myc* locus, *EMBO J.*, **5**: 2859–2865, 1986.
- [124] NERI A., BARRIGA F., KNOWLES D. M., MAGRATH I. T., DALLA-FAVERA R., Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 2748–2752, 1988.
- [125] NOWELL P., SHANKEY T., FINAN J., GUERRY D., BESA E., Proliferation, differentiation and cytogenetics of chronic leukemic B lymphocytes cultured with mitomycin-treated normal cells, *Blood*, **57**: 444–451, 1981.
- [126] O'CONNOR G. T., Persistent immunologic stimulation as a factor in oncogenesis with special reference to Burkitt's tumor, *Ann. J. Med.*, **48**: 279–285, 1970.
- [127] PATHAK S., Constitutional translocations and predisposition to T- and B-cell malignancies, *Cytogenet. Cell Genet.*, **43**: 223–225, 1986.
- [128] PEGORARO L., PALUMBO A., ERIKSON J., FALDA M., GIOVANAZZO B., EMANUEL B. S., ROVERA G., NOWELL P. C., CROCE C. M., A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 7166–7170, 1984.
- [129] PELICCI P.-G., KNOWLES D. M., ARLIN Z. A., WIECZOREK R., LUCIW P., DINA D., BASILICO C., DALLA-FAVERA R., Multiple monoclonal B-cell expansion and *c-myc* oncogene rearrangements in acquired immune deficiency syndrome related lymphoproliferative disorders: Implications for lymphomagenesis, *J. Exp. Med.*, **164**: 2049–2060, 1986.
- [130] PELICCI P.-G., KNOWLES D. M., II, MAGRATH I., DALLA-FAVERA R., Chromosomal breakpoints and structural alterations of the *c-myc* locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 2984–2988, 1986.
- [131] PERRSON H., LEDER P., Nuclear localization and DNA binding properties of a protein expressed by human *c-myc* oncogene, *Science*, **225**: 718–720, 1984.
- [132] PIECHACZYK M., BONNIEU A., EICK D., REMMERS E., YANG J.-Q., MARCU K., JEANTEUR P., BLANCHARD J.-M., Altered *c-myc* RNA metabolism in Burkitt's lymphomas and mouse plasmacytomas, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **132**: 331–338, 1986.
- [133] PIECHACZYK M., YANG J.-Q., BLANCHARD J.-M., JEANTEUR P., MARCU K. B., Post-transcriptional mechanisms are responsible for accumulation of truncated *c-myc* mRNAs in murine plasma cell tumors, *Cell*, **42**: 589–597, 1985.
- [134] PINCHING A., WEISS R. A., AIDS and the spectrum of HTLV-III/LAV infection. *Intern. Rev. Exp. Pathol.*, **28**: 1–44, 1986.
- [135] POPE J. H., HORNE M. K., SCOTT W., Transformation of foetal human leukocytes „in vitro” by filtrates of human leukaemic cell line containing herpes-like virus, *Int. J. Cancer*, **3**: 857–866, 1968.
- [136] PUTRILO D. T., Malignant lymphoproliferative diseases induced by Epstein-Barr virus in immunodeficient patients, including X-linked, cytogenetic, and familial syndromes, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **4**: 251–268, 1981.
- [137] QUERTERMOUS T., STRAUSS W., MURRE C., DIALYNAS D. P., STROMINGER J. L., SEIDMAN J. G., Human T-cell gamma genes contain N segments and have marked junctional viability, *Nature*, **322**: 184–187, 1986.
- [138] RAAB-TRAUB N., FLYNN K., KLEIN C., EBV DNA structure and oncogene expression in EBV-associated malignancies, [W:] *Epstein-Barr Virus and Human Disease*, Red. P. H. Levine, D. V. Ablashi, M. Nonoyama, G. R. PEARSON, R. Glaser, Clifton, New Jersey, Humana Press, 1987, 423–428.
- [139] RABIN H., DAMBAUGH T. R., Biological aspects of Epstein-Barr virus-induced B-cell immortalization, [W:] *Epstein-Barr Virus and Human Disease*, Red. P. H. Levine, D. V.

- Ablashi, M. Nonoyama, G. R. Pearson, R. Glaser, Clifton, New Jersey, Humana Press, 1987, 267–274.
- [140] REED J. C., ALPERS J. D., NOWELL P. C., Expression of *c-myc* protooncogene in normal human lymphocytes. Regulation by transcriptional and posttranscriptional mechanisms, *J. Clin. Invest.*, **80**: 101–106, 1987.
- [141] REED J. C., ALPERS J. D., NOWELL P. C., HOOVER R. G., Sequential expression of proto-oncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 3982–3986, 1986.
- [142] REED J. C., SABATH D. E., HOOVER R. G., PRYSTOWSKY M. B., Recombinant interleukin 2 regulates levels of *c-myc* mRNA in a cloned murine T lymphocyte, *Mol. Cell. Biol.*, **5**: 3361–3368, 1985.
- [143] REMMERS E. F., YANG J.-Q., MARCU K. B., A negative transcriptional control element located upstream of the murine *c-myc* gene, *EMBO J.*, **5**: 899–904, 1986.
- [144] RENÉ B., Suppression of MHC gene expression in cancer cells, *Trends Genet.*, **3**: 289–301, 1987.
- [145] ROSENBERG S. A. (Przewodniczący), National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage, *Cancer*, **49**: 2112–2135, 1982.
- [146] ROSENBLATT J., GOLDE D. W., WACHSMAN W., JACOBS A., SCHMIDT G., QUAN S., GASSON J. C., CHEN I. S. Y., A second isolate of HTLV-II associated with atypical hairy-cell leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **315**: 372–377, 1986.
- [147] RUPNIEWSKA Z. M., Przepuszczalne mechanizmy aktywacji komórkowego genu *myc* w chłoniaku Burkitta, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **40**: 96–110, 1986.
- [148] SAITO H., HAYDAY A. C., WIMAN K., HAYWARD W. S., TONEGAWA S., Activation of the *c-myc* gene by translocation: A model for translational control, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 7476–7480, 1983.
- [149] SALAHUDDIN S. Z., ABLASHI D. V., MARKHAM P. D., JOSEPHS S. F., STURZENEGGER S., KAPLAN M., HALLIGAN G., BIBERFELD P., WONG-STALL F., KRAMARSKY B., GALLO R. C., Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders, *Science* **234**: 596–601, 1986.
- [150] SATTENTAU Q. J., WEISS R. A., The CD 4 antigen: Physiological ligand and HIV receptor (Minireview), *Cell*, **52**: 631–633, 1988.
- [151] SCHWAB M., RAMSAY G., ALITALO K., JARMA H. E., BISHOP J. M., MARTINSON T., LEVAN G., LEVAN A., Amplification and enhanced expression of the *c-myc* oncogene in mouse SEWA tumours cells, *Nature*, **315**: 345–347, 1985.
- [152] SHAPIRO R. S., McCLAIN K., FRIZZERA G., GAJL-PĘCZALSKA K. J., KERSEY J. H., BLAZAR B. R., ARTHUR D. C., PATTON D. F., GREENBERG J. S., BURKE B., RAMSAY N. K. C., McGLAVE P., ELIPOVICH A. H., Epstein-Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation, *Blood*, **71**: 1234–1243, 1988.
- [153] SHOWE L. C., CROCE C. M., The role of chromosomal translocations in B- and T-cell neoplasia, *Ann. Rev. Immunol.*, **5**: 253–277, 1987.
- [154] SPORN M. B., TODARO G. J., Autocrine secretion and malignant transformation of cells, *N. Engl. J. Med.*, **303**: 878–880, 1980.
- [155] STUDZINSKI G. P., BRELVI Z. S., FELDMAN S. C., WATT R. A., Participation of *c-myc* protein in DNA synthesis of human cells, *Science*, **234**: 467–470, 1986.
- [156] SUDA Y., AIZAWA S., HIRAI S., INOUE T., FURUTA Y., SUZUKI K., HIROHASHI S., IKAWA Y., Driven by the same Ig enhancer and SV 40 promoter *ras* induced lung adenomatous, *myc* induced pre-B cell lymphomas and SV 40 large T gene a variety of tumors in transgenic mice, *EMBO J.*, **6**: 4055–4065, 1987.

- [157] SUGAMURA K., FUJII M., KOBAYASHI N., HATANAKA M., HINUMA Y., Retrovirus-induced expression of interleukin 2 receptors on cells of human B-cell lineage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 7441–7445, 1984.
- [158] SUZUKI T., SANDERS S. K., BUTTLER J. L., GARTLAND G. L., KOMIYAMA K., COOPER M. D., Identification of an early activation antigen (Bac-1) on human B cells, *J. Immunol.*, **137**: 1208–1213, 1986.
- [158a] TAKIHARA Y., CHAMPAGNE E., GREISSER H., KIMURA N., TKACHUK D., REIMANN J., OKADA A., ALT F. W., CHESS L., MINDEN M., MAK T. W., Sequence and organization of the human T cell delta-chain gene, *Eur. J. Immunol.*, **18**: 283–289, 1988.
- [159] TAUB R., KIRSCH I., MORTON C., LENOIR G. M., SWAN D., TRONICK S., AARONSON S., LEDER P., Translocation of the *c-myc* gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**: 7837–7841, 1982.
- [160] THORLEY-LAWSON D. A., NADLER L. M., BAHN A. K., SCHOOLEY R. T., Blast-2 (EBVCS) an early cell surface marker of human B cell activation is superinduced by Epstein-Barr virus, *J. Immunol.*, **134**: 3007–3012, 1985.
- [161] TONEGAWA S., Somatic generation of antibody diversity, *Nature*, **302**: 575–581, 1983.
- [162] TSUJIMOTO Y., CROCE C. M., Analysis of the structure, transcripts and protein products of *bcl-2*, the gene involved in follicular lymphoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 5214–5218, 1986.
- [163] TSUJIMOTO Y., GORHAM J., COSSMAN J., JAFFE E., CROCE C. M., The t/14; 18/ chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining, *Science*, **229**: 1390–1393, 1985.
- [164] TSUJIMOTO Y., JAFFE E., COSSMAN J., GORHAM J., NOWELL P. C., CROCE C. M., Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t/11; 14/ chromosome translocation, *Nature*, **315**: 340–343, 1985.
- [165] UCHIYAMA T., YODOI J., SAGAWA K., TAKATSUKI K., UCHINO H., Adult T-cell leukemia: Clinical and hematological features of 16 cases, *Blood*, **50**: 481–492, 1977.
- [166] van den BERGHE H., VERMAELEN K., LOUWAGIE A., CRIEL A., MECUCCI C., VAERMAN J. P., High incidence of chromosome abnormalities in IgG3 myeloma, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **11**: 381–387, 1984.
- [167] VAUX D. L., CORY S., ADAMS J. M., *Bcl-2* gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with *c-myc* to immortalize pre-B cells, *Nature*, **335**: 440–442, 1988.
- [168] WATSON D. K., REDDY E. P., DUESBERG P. H., PAPAS T. S., Nucleotide sequence analysis of the chicken *c-myc* gene reveals homologous and unique regions by comparison with the transforming gene of avian myelocytomatosis virus MC 29, *A gag-myc*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 2146–2150, 1983.
- [169] WATT R., NISHIKURA K., SORRENTINO J., ar-RUSHDI A., CROCE C. M., ROVERA G., The structure and nucleotide sequence of the 5' end of the human *c-myc* gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 6307–6311, 1983.
- [170] WEINBERG R. A., The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus, *Science*, **230**: 770–776, 1985.
- [171] WEISS R. A., Retroviruses and human disease, *J. Clin. Pathol.*, **40**: 1064–1069, 1987.
- [172] WHANG-PENG J., LEE E. C., SIEVERTS H., MAGRATH I., Burkitt's lymphoma in AIDS: Cytogenetic study. *Blood*, **63**: 818–822, 1984.
- [173] WHITTLE H. C., BROWN J., MARSH K., GREENWOOD B. M., SEIDELIN P., TIGHE H., WEDDERBURN L., T-cell control of Epstein-Barr virus infected B-cells is lost during *P. falciparum* malaria, *Nature*, **312**: 449–450, 1984.
- [174] YAMAGUCHI K., NISHIMURA H., KOHROGI H., JONO M., MIYAMOTO Y., TAKATSUKU K., A proposal for smoldering adult T-cell leukemia: A clinicopathologic study of five cases, *Blood*, **62**: 758–766, 1983.

- [175] YANG J.-Q., REMMERS E. F., MARCU K. B., The first exon of the *c-myc* proto-oncogene contains a novel positive control element, *EMBO J.*, **5**: 3553–3562, 1986.
- [176] YASUKAWA K., HIRANO T., WANATABE Y., MURATANI K., MATSUDA T., NAKAI S., KISHIMOTO T., Structure and expression of human B-cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene, *EMBO J.*, **6**: 2939–2945, 1987.
- [177] YUKAWA K., KIKUTANI H., OWAKI H., YAMASAKI K., YOKOTA A., NAKAMURA H., BARSUMIAN E. L., HARDY R. R., SUEMURA M., KISHIMOTO T., A B cell-specific differentiation antigen CD 23 is a receptor for IgE [Fc-R] on lymphocytes, *J. Immunol.*, **138**: 2576–2580, 1987.
- [178] YUNIS J. J., The chromosomal basis of human neoplasia, *Science*, **221**: 227–236, 1983.
- [179] YUNIS J. J., FRIZZERA G., OKEN M. M., MCKENNA J., THEOLOGIDES A., Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma, *N. Engl. J. Med.*, **316**: 79–84, 1987.
- [180] YUNIS J. J., SORENG A. L., Constitutive fragile sites and cancer, *Science*, **226**: 1199–1204, 1984.
- [181] YUNIS J. J., SORENG A. L., BOWE A. E., Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens, *Oncogene*, **1**: 59–69, 1987.
- [182] ZHOU R.-P., KAN N., PAPAS T., DUESBERG P., Mutagenesis of avian carcinoma virus MH 2: Only one of two potential transforming genes (Δ *gag-myc*) transforms fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 6389–6393, 1985.
- [183] ZIEGLER J. L., BECKSTEAD J. A., VOLBERDING P. A., ABRAMS D. I., LEVINE A. M., LUKES R. J., GILL P. S., BURKES R. L., MEYER P. R., METROKA C. E., MOURADIAN J., MOORE A., RIGGS S. A., BUTLER J. J., CABANILLAS F. C., HERSH E., NEWELL G. R., LAUBENSTEIN L. J., KNOWLES D., ODAJNYK C., RAPHAEL B., KOZINER B., URMACHER C., CLARKSON B. D., Non-Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men. Relation to generalized lymphadenopathy and acquired immunodeficiency syndrome, *N. Engl. J. Med.*, **311**: 565–570, 1984.

Otrzymano: 24 listopada 1988 r.

Przyjęto: 6 lutego 1989 r.

Adres autorek: Jaczewskiego 8, Lublin.

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 PKO BP XIII Oddział w Warszawie nr 370044-1195-139-11. 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 Rozpoznania 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

R. GNIADOCKI, Molekularne podstawy syntezy immunoglobulin oraz receptora limfocytów	125
J. JARUZELSKA, Analiza genu hydroksylazy fenyloalaniny w diagnostyce fenyloketonurii	165
A. KORCZ, T. TWARDOWSKI, Mechanizmy regulacji biosyntezy białka na przykładzie ferrytyny	177
K. KUDLICKA, Terminalne kompleksy syntezy celulozy	197
M. OLSZEWSKA, D. GERNAND, Zastosowanie endonukleaz w badaniach cytogenetycznych	213
D. ROŻYŃKOWA, Z. M. RUPNIEWSKA, Wieloetapowa patogeneza chłoniaków	225