

P 2435

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postepy Biologii Komórki

TOM 18-NR 4'91
(201 – 280)



<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wicenty 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

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

Artykuły nadesłane do Redakcji i zamieszczone w roczniku 1991 Postępów Biologii Komórki recenzowali:

prof. Zofia Bielańska-Osuchowska,
prof. Marek Jakóbisiak,
prof. Jerzy Kawiak,
dr Maciej Kawalec,
prof. Wanda M. Krajewska,
prof. Jan Michejda,
prof. Maria Olszewska,
prof. Danuta Rożynkowa,
prof. Maciej Zabel.

Za tę społecznie wykonaną pracę i miłą współpracę serdecznie dziękujemy.

Fundacja • Rozwój SGGW-AR •

Ark. wyd. 7,2 Ark. druk. 5,0 Oddano do składu we wrześniu 1991 r. Podpisano do druku w styczniu 1992 r. Druk ukończono w styczniu 1992 r.

■ W tym zeszycie ♦ Postępów Biologii Komórki ♦

- Jedno z narzędzi badawczych w biologii molekularnej, jakimi są enzymy restrykcyjne, znalazło zastosowanie w badaniach *in situ* utrwalonych chromosomów metafazowych (por. M. J. Olszewska i D. Gernand, *Post Biol Kom* 1989; 16: 213). Wykorzystanie enzymów restrykcyjnych *in vivo* umożliwia znalezienie w chromosomach miejsc podatnych; w miejscach takich następuje ich pęknięcie. Umiejętność sterowania tym procesem może mieć znaczenie praktyczne w indukowanej mutageniezie (por. s. 263).
- Podział komórki jest istotnym etapem mutagenazy. Jeżeli założyć, że mutagenaza jest ważna dla karcinogenezy, to i podział mitotyczny musi być ważny dla karcinogenezy. Jedną z funkcji antyonkogenów lub jak proponuje prof. A. Horst – genów przeciwnowotworowych (*tumor supression genes* – TSG) jest hamowanie (regulowanie) mitogenezy. Jeżeli pierwotna kopia TSG ulegnie mutacji, to inaktywacja drugiej kopii jest bardziej prawdopodobna podczas mitozy (np. na skutek rekombinacji mitotycznej, konwersji genu czy *nondisjunction*) niż w wyniku niezależnej, drugiej mutacji. Mitogeneza zwiększa więc szansę każdej mutacji, ale jest o wiele ważniejsza dla wywołania nowotworu po zajściu pierwszej mutacji. Niektóre czynniki uszkadzające DNA są częstą przyczyną nowotworzenia, dlatego że zarówno wywołują mutacje, jak i zwiększają częstość replikacji komórek.
- W obecnym zeszycie "Postępów" na stronie 203 jest artykuł o genach przeciwnowotworowych, a w zeszytach 4, 1990 i 3, 1991 (J. Kawiak – *Post Biol Kom* 1990; 17: 325 i C. Wójcik – *Post Biol Kom* 1991; 18: 153) ukazały się artykuły o regulacji cyklu mitotycznego i podziałów komórek. Połączenie tych informacji pozwoli lepiej zrozumieć wspomniane wyżej procesy.
- W artykule na stronie 253 po raz pierwszy na łamach *Post Biol Kom* omówiono rolę metylacji DNA w regulacji ekspresji genów, ze szczególnym uwzględnieniem metod badawczych i materiału roślinnego. Artykuł stanowi kolejną publikację dotyczącą regulacji ekspresji genów w *Eukaryota* (por. A. Horst, *Post Biol Kom* 1990; 17: 161).
- Uzyskiwanie *in vitro* zarodków somatycznych jest jedną z metod współczesnej biotechnologii roślin. Metoda ta umożliwia uzyskanie nowych osobników drogą wegetatywną, a więc z pominięciem niekontrolowanych zmian genetycznych, jakie następują przy rozmnażaniu generatywnym (rekombinacja genów). Embriogeneza *in vitro* w połączeniu z transformacją komórek stanowi niezwykle obiecujący kierunek w biotechnologii (por. artykuł na stronie 217) wykorzystywany już w praktyce. Technika kultur *in vitro* roślin wyższych, jako podstawa biotechnologii, była tematem artykułu M. Rakoczy-Trojanowskiej i S. Malepszego (*Post Biol Kom* 1990; 17: 247).

■ **Od tego zeszytu ♦ Postępów Biologii Komórki ♦**

Redakcja Postępów Biologii Komórki pragnie zmienić nieco charakter czasopisma. Obok normalnych prac poglądowych pragniemy w możliwie jak najszybszym tempie drukować krótkie artykuły na temat nowych osiągnięć, także metodycznych, mających istotne znaczenie dla rozwoju biologii komórki i nauk pokrewnych.

Dlatego zwracamy się do Państwa z serdeczną prośbą o przesyłanie takich artykułów i rozpropagowanie naszej informacji. Artykuł powinien być przygotowany według wzoru:

**NOWE SPOSOBY UZYSKIWANIA SOND
DO HYBRYDOCYTOCHEMII**

Jan KOWALSKI

Instytut Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Tekst (ok. 4 stron razem z rycinami, odstęp 2 linie) ; piśmiennictwo (kilka najważniejszych pozycji, cytowanych jak w Postępach Biologii Komórki); ryciny z opisem.

Artykuły proszę przesyłać na adres:

Prof. dr hab. Maciej Zabel
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
ul. Świącickiego 6
60-781 Poznań tel. (061)699-181 wew. 561

GENY PRZECIWNOWOTWOROWE – WAŻNY ELEMENT W POWSTAWANIU NOWOTWORÓW

TUMOR SUPPRESSOR GENES – AN IMPORTANT ELEMENT OF TUMORIGENESIS

Michał HETMAN

Zakład Cytofizjologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie. Mutacje inaktywujące geny przeciwnowotworowe* (antyonkogeny, *tumor suppressor genes*) są częste w komórkach nowotworów zwierząt. Dzięki zastosowaniu technik biologii molekularnej udało się zidentyfikować kilka takich genów, które podlegają inaktywacji w komórkach pewnych nowotworów u ludzi. Do tej pory najlepiej poznano gen retinoblastoma (RB**). Wydaje się, że jego produkt reguluje ekspresję pewnych genów i wpływa na mechanizmy kontrolujące cykl komórkowy. Są dane na temat funkcji produktów innych zidentyfikowanych genów przeciwnowotworowych oraz przykłady oddziaływania pomiędzy nimi i produktami onkogenów w transformowaniu komórek. W artykule przedstawiono postępy, jakich dokonano w ostatnim czasie w dziedzinie badań nad genami przeciwnowotworowymi.

Summary. Mutations inactivating tumor suppressor genes are common in cells of animal cancer cells. Techniques of molecular biology were useful in identification of several tumor suppressor genes inactivated in some human cancer cells as well. The best known is retinoblastoma gene (RB). It seems, that its product regulate expression of some genes and interact with cell cycle controlling mechanisms. There are informations on function of products of other identified tumor suppressor genes and interaction between them and products of oncogenes in tumor transformation of cells. Some advances in these field are presented in the article.

W latach pięćdziesiątych Foulds [20] wysunął koncepcję pojmowania nowotworowego fenotypu komórek jako zespołu niezależnych cech. Żadna z nich samodzielnie nie "uzłośliwia" komórki. Dopiero gdy kilka takich cech występuje jednocześnie, obdarzona nimi komórka daje początek klonowi nowotworowemu. Obecnie możemy wyróżnić 3 podstawowe rodzaje takich cech, a co za tym idzie 3 grupy genów warunkujących ich powstanie [41]:

*Termin zaproponowany przez prof. dr A. Horsta.

**Gen siatkówczaka (*retinoblastoma susceptibility gene, retinoblastoma gene*) jest oznaczany RB, a jego białkowy produkt Rb albo pRb (przyp. redakcji).

1. Onkogeny, czyli geny kontrolujące wzrost i rozmnażanie się komórek, które po podaniu drogą transfekcji powodują transformację nowotworową transfekowanych normalnych komórek (transformacja jest więc cechą dominującą).

2. Geny przeciwnowotworowe (ang. *anti-oncogenes*, *tumor suppressor genes*) są to geny kontrolujące wzrost i rozmnażanie się komórek; ich unieczynnienie przez brak (delecję), mutację, rearanżację powoduje transformację nowotworową komórek; w tych przypadkach wprowadzenie ich do transformowanych komórek przywraca normalny fenotyp.

3. Geny modulatorowe są odpowiedzialne za takie cechy komórki nowotworowej, jak: inwazyjność, zdolność tworzenia przerzutów, czy stopień immunogenności.

Celem artykułu jest przedstawienie postępu, jaki dokonał się ostatnio w badaniach nad genami przeciwnowotworowymi, które to geny stały się jednym z "najmodniejszych" zagadnień współczesnej molekularnej biologii komórki.

Idea istnienia genów hamujących transformację nowotworową znajdowała pośrednie potwierdzenie w wyniku wielu doświadczeń [42]. Jak dotychczas dwie grupy tych dowodów okazały się szczególnie istotne dla dalszego postępu badań i zaowocowały lokalizacją chromosomalną i identyfikacją pierwszych genów przeciwnowotworowych.

1. Od dość dawna wiadomo, że niektóre hybrydy komórek nowotworowych z komórkami normalnymi często nie przejawiają cech komórek złośliwych, jeśli tylko zostały zachowane chromosomy pochodzące z nienowotworowego komponentu hybrydy. Porównanie materiału genetycznego hybryd nowotworowych i "złagodniałych" pozwala na wytypowanie krytycznych chromosomów, które zawierają domniemane antyonkogeny. Postępując w ten sposób stwierdzono np. że hybrydy z komórek HeLa i normalnych fibroblastów podlegają transformacji, jeśli utracą jedną kopię chromosomu 11 i jedną kopię chromosomu 14 [42]. Technika hybrydyzacji komórek nowotworowych ze sztucznymi "mikrokomórkami" zawierającymi tylko jeden wybrany chromosom można było potwierdzić lokalizację w chromosomie 6 genu hamującego nowotworowy fenotyp komórek czerniaka [74], a w chromosomie 11 onkogenu lub genów hamujących nowotworowy fenotyp komórek pochodzących z guza Wilmsa [76].

2. Znane są u zwierząt recesywne mutacje, które przejawiają się rozwojem nowotworów. U ryb z rodzaju *Xiphorus* sp. występuje mutacja, której skutkiem jest rozwój czerniaka. U *Drosophila melanogaster* znanych jest ok. 20 mutacji prowadzących do nowotworzenia [8].

Siatkówczak (*retinoblastoma*) był pierwszym ludzkim nowotworem, w którego etiologii rola mutacji recesywnej została udowodniona analizą statystyczną danych epidemiologicznych [43]. Analizą cytogenetyczną dowiedziono znaczenia mutacji recesywnych m.in. w rozwoju guza Wilmsa [4, 21], raka jelita grubego [82, 83] czy raka owianokomórkowego oskrzeli [32, 41, 42, 72], a także w wielu innych ludzkich nowotworach [32].

RETINOBLASTOMA – PIERWSZY ZIDENTYFIKOWANY GEN PRZECIWNOWOTWOROWY

W 1971 roku Alfred Knudson ogłosił wysuniętą na podstawie analizy danych epidemiologicznych hipotezę dwóch zdarzeń genetycznych (*two hits hypothesis*) kluczowych dla rozwoju najczęstszego guza gałki ocznej występującego u dzieci do 5 roku życia, zwanego siatkówczakiem (*retinoblastoma*) [43]. Pierwsze "zdarzenie" wymierzone byłoby w jeden z

dwóch alleli locus RB i przemieniałoby go w postać nieaktywną. Drugie "zdarzenie" niszczyłoby pozostały czynny allel. Wyłączenie obydwu działających alleli doprowadzałoby do rozwoju siatkówczaka.

Siatkówczak występuje w dwóch postaciach: rodzinnej, przekazywanej jako cecha dominująca z zajęciem obu gałek i wieloogniskowym rozwojem guza oraz spontanicznej, bez przeszłości rodzinnej i z jednoogniskowym zajęciem jednej gałki ocznej. Według Knudsona w postaci rodzinnej chory ojciec lub matka przekazuje dziecku jeden uszkodzony allel. Gdy w ciągu rozwoju nastąpi skutek mutacji inaktywacja drugiego allelu, dzielące się retinoblasty dają początek nowotworowi. Zważywszy, że prawdopodobieństwo zajścia mutacji inaktywującej w obrębie locus RB wynosi ok. 2×10^{-7} na rok, a w obu gałkach ocznych do 5 roku życia znajdują się miliony retinoblastów łatwo zauważyć, że rozwój nowotworu jest nieunikniony.

W postaci spontanicznej oba zdarzenia muszą zajść w retinoblastach, stąd jednostronne i zwykle jednoogniskowe pojawianie się guza.

W drugiej połowie lat siedemdziesiątych na podstawie badań cytogenetycznych pokazano, że u ok. 20% pacjentów ze spontanicznym siatkówczakiem i u nieco mniejszego odsetka z dziedzicznym schorzeniem dochodzi do delecji obejmujących prążek 14 długiego ramienia chromosomu 13 (13q14) [4, 44]. Mapowaniem przy pomocy sprzężenia z esterazą D (ES-D) – enzymem o różnych formach molekularnych, kodowanym przez locus na chromosomie 13 oraz sond genomowych DNA używanych do RFLP (*restriction fragments length polymorphism*) w obrębie chromosomu 13 bardziej precyzyjnie określono rodzaj i miejsca zmian w siatkówczaku [4]. Charakterystyczne, że częściej obserwowano w komórkach siatkówczaka utratę heterozygotyczności markerów zlokalizowanych w regionie 13q14 w porównaniu z komórkami innych tkanek pochodzących od tych samych pacjentów [4]. Oznacza to możliwość ujawnienia się recesywnej mutacji, sprzężonej z badanymi markerami. Na ową utratę heterozygotyczności mogą się składać różne mechanizmy genetyczne takie, jak nondysjunkcja, somatyczne crossing over, mutacje punktowe czy wreszcie delecje [4]. W praktyce te wszystkie mechanizmy uchodzą uwadze badaczy posługujących się metodami cytogenetycznymi. Wykazano również u pacjentów z rodzinnym siatkówczakiem utratę heterozygotyczności w guzach kostniaka mięsaka (*osteosarkoma*), który jest drugim nowotworem często nękającym tych ludzi [4]. Stwierdzono ponadto, że rozwój osteosarkoma u ludzi bez siatkówczaka może być także związany z inaktywacją locus RB w komórkach mięsaka [4].

Posłużenie się genetyką molekularną umożliwiło bezpośrednie odszukanie ulegającego inaktywacji locus. Z genomowej biblioteki DNA chromosomu 13 wyizolowano odcinki DNA znajdujące się w pobliżu genu ES-D [46, 49]. Okazało się, że jedna z sond genomowych (H3-8) homologiczna z sekwencjami odległymi o 0,5 Mb od locus ES-D w kierunku 3' wykrywa delecje w niektórych guzach siatkówczaka [46]. Dzięki zastosowaniu techniki *chromosomal walking* trzy grupy badaczy niezależnie od siebie uzyskały klony genomowe wykazujące zachowawczość ewolucyjną i wykrywające klony w bibliotece cDNA [22, 23, 49]. Z użyciem sond cDNA wyizolowanych w następnym etapie, przebadano DNA pochodzące z guzów siatkówczaka. Około 40% próbek miało istotne zmiany w obrębie hipotetycznego locus RB [22, 23, 49]. Co więcej, oprócz delecji "flankujących" tylko o to locus wykryto wewnętrzne delecje w obrębie hipotetycznego locus RB, co utwierdzało w przekonaniu, że jest w nim gen, którego inaktywacja prowadzi do rozwoju siatkówczaka [22]. Chociaż 60% guzów nie wykazywało żadnych zmian w genomie, to jednak sondami cDNA

wykrywano prawie zawsze zmiany w ekspresji genu określanej analizą mRNA (*Northern blotting*) [22, 23, 49]. Tą techniką pokazano również ekspresję 4,7 kb mRNA w normalnej siatkówce, wątrobie i śledzionie. Wspomniany wyżej mRNA stanowił zatem prawidłowy transkrypt locus RB.

Przy pomocy analizy sekwencji cDNA uzyskano pewien wgląd we właściwości produktu genu RB. Otwarta ramka odczytu (najdłuższa z możliwych, ze względu na obecność sygnałów "stop", sekwencja kodująca aminokwasy) obejmowała ok. 2700 bp (par zasad), a długość łańcucha zapisywanego przez nią białka wynosiłaby 928 aminokwasów [50]. Wykorzystując wektory ekspresyjne uzyskano fragmenty białka Rb, które posłużyły do otrzymania przeciwciał monoklonalnych [50]. Przeciwciałami tymi można wykrywać co najmniej dwa peptydy o masach cząsteczkowych 110 i 114 kDa umownie oznaczane p105, co jest spowodowane obecnością form o różnym stopniu fosforylacji. Na podstawie analizy przewidywania sekwencji aminokwasów przypuszcza się, że produkt genu RB może wiązać się z DNA (obecność motywu strukturalnego w postaci zamka błyskawicznego leucynowego [84]). Rzeczywiście, przy użyciu przeciwciał monoklonalnych anty-Rb można uwidocznić jądrową lokalizację produktu tego genu. Dodatkowym dowodem, że istotnie białko Rb wiąże się z DNA, jest fakt zatrzymywania tego białka na kolumnie zawierającej DNA [50]. Znaczenie białka Rb będzie szerzej omówiona w dalszej części artykułu.

STRUKTURA GENU RB

mRNA genu RB jest kodowany przez 27 egzonów rozmieszczonych w odcinku DNA wielkości 200 kb [34]. Delecja egzonów 13–17 jest często obserwowana w komórkach siatkówczaka, jak również innych nowotworów. Świadczyć to może o:

- 1) istotności tych sekwencji dla działania produktu genu,
- 2) istnieniu miejsca częstej rekombinacji w tym regionie [34].

W egzonie 20, zlokalizowano sekwencję motywu strukturalnego zamka błyskawicznego leucynowego (Leu w α -helisie co 7 reszt) [36, 84], występującego w domenach wiążących DNA [34].

Region 5' genu zawiera obszar bogaty w reszty GC, co jest charakterystyczne dla genów metabolizmu podstawowego (*house keeping genes*), do których zalicza się gen RB [34]. W doświadczeniach nad profilem jego ekspresji pokazano, że jedynie w komórkach siatkówczaka i innych nowotworów wynikających z inaktywacji genu RB brakuje jego mRNA [22, 23, 49]. W regionie przyległym do końca 5' genu nie znaleziono promotorowej sekwencji *TATA box*, co oznacza możliwość istnienia aż 3 alternatywnych miejsc inicjacji transkrypcji [34]. Różnego rodzaju mutacje w obrębie genu RB zostały wykryte dotychczas w następujących nowotworach: kostniaku mięsakowym (*osteosarkoma*) [22], w raku jajnika [72], raku sutka [48, 81], raku owianokomórkowym płuc [27], raku pęcherza moczowego [26] i raku gruczołu krokowego [5].

FUNKCJA BIAŁKA p105 Rb

Wspomniano powyżej, że p105 Rb może działać przez wiązanie się z DNA. Jego jądrowa lokalizacja potwierdza tę tezę [50]. Do tej pory nie udało się jednak ustalić, w drodze jakiego mechanizmu białko to łączyłoby się z kwasem nukleinowym. Znaczenie zamka błyskawicznego leucynowego w egzonie 20 pozostaje do wyjaśnienia.

Ze względu na hamowanie fenotypu nowotworowego przez Rb, byłoby bardzo interesujące znalezienie genów podlegających kontroli p105 Rb. Kontrola negatywna mogłaby dotyczyć jakichś onkogenów, kontrola pozytywna nowych genów przeciwnowotworowych. Pierwszą sekwencję DNA podlegającą kontroli Rb odkryto w promotorze genu *c-fos* [65]. Białko Rb hamuje ekspresję *c-fos*, tak w komórkach aktywowanych surowicą do wejścia w cykl podziałyowy komórki, jak i w komórkach będących w cyklu. Produkt genu *c-fos* wraz z produktem onkogenu *c-jun* [84] tworzy czynnik transkrypcyjny AP1 (*Aggregating Proteins-1*), którego aktywność znacznie maleje w obecności białka Rb. Dotąd nie udało się wykryć wiązania p105 Rb z elementem kontrolującym retinoblastoma (*retinoblastoma controlling element, RCE*) w promotorze *c-fos*. Najprawdopodobniej Rb działa na RCE za pośrednictwem innych czynników transkrypcyjnych, które podlegają bezpośrednio kontroli p105 Rb. Warto podkreślić fakt, że onkogen *c-fos* podlega nadmiernej ekspresji w mysim kostniaku mięsakowym [33]. Inaktywacja locus RB może być, jak wiadomo, również ważnym czynnikiem w patomechanizmie tego nowotworu u ludzi [4, 22].

Teza, że p105 Rb w negatywny sposób wpływa na poziom transkrypcji onkogenów, znalazła dalsze potwierdzenie doświadczalne [3]. Wykazano, że p105 Rb hamuje transkrypcję przez wiązanie się z komórkowym czynnikiem transkrypcyjnym, a nie z DNA [3].

Pewien wgląd w rolę białka p105 Rb w życiu komórki przyniosły doświadczenia dotyczące sposobu regulacji jego aktywności i doświadczenia wirusologiczne.

Zważywszy, że gen RB należy do genów metabolizmu podstawowego, regulacja jego działania na poziomie transkrypcji jest niemożliwa. Raczej podejrzewa się regulację posttranskrypcyjną (np. typu *alternative splicing*) lub regulację posttranslacyjną. Rzeczywiście, odkryto, że p105 Rb może występować w wielu, nieznacznie różniących się masą cząsteczkową postaciach [50, 55, 77], zaś u podstawy tych różnic leży różny stopień fosforylacji [8, 55]. W łańcuchu p105 Rb jest 15 reszt seryny i treoniny, stanowiących potencjalne miejsca fosforylacji [34, 50].

Obserwacja zachowania się białka p105 Rb w czasie cyklu komórkowego pozwala w sposób pośredni przypuszczać o znaczeniu zróżnicowanej fosforylacji dla jego działania. W fazie G₀/G₁ obserwuje się głównie formy nieufosforylowanego lub słabo ufosforylowanego p105 Rb [8, 11, 15]. Na granicy G₁/S udział pochodnych fosforylowanych wzrasta. Zdecydowana przewaga wysoce ufosforylowanych cząsteczek obserwowana jest w G₂ i M. Ich ilość gwałtownie maleje na rzecz pochodnych słabo ufosforylowanych przy ponownym wejściu w fazę G₀/G₁. Zjawiska powyższe obserwowano w ustalonych liniach komórkowych (HeLa, CV1P, T24) [8, 11, 15], w ludzkich limfocytach indukowanych mitogenami [11], jak również w czasie indukowania chemicznymi induktorami (estry forbolu, kwas retinowy) różnicowania komórek linii nowotworowych (np. HL60, U937) [11]. Nieodłączne pojawianie się w fazie G₀/G₁ nieufosforylowanego białka p105 Rb, znaczna redukcja jego ilości w fazach S, G₂, M oraz wynikająca z jego antyonkogennych własności możliwość działania poprzez utrzymywanie komórek w fazie G₀ cyklu sugerowałyby, że

fosforylacja wyłączałaby ową "antymitotyczną" aktywność p105 Rb. Dzięki temu komórki mogłyby przejść przez cykl komórkowy. Celowe jest przytoczenie w tym miejscu wyników uzyskanych przez grupę Steina, który pokazał, że ludzkie, starzejące się fibroblasty nie są w stanie fosforylować p105 Rb [70].

Warto zaznaczyć, że białko p105 Rb zawiera kilka reszt seryny i treoniny w sekwencji – aminokwas zasadowy – Ser lub Thre – jakkolwiek aminokwas – aminokwas zasadowy – [34, 50]. W takich miejscach dokonuje fosforylacji kinaza p34^{cdc2}, bardzo istotny element mechanizmu kontrolującego przechodzenie przez cykl komórkowy [40, 69]. Białko p105 Rb może podlegać fosforylacji przez p34^{cdc2} in vitro [11]. O możliwych modelach działania p105 Rb będzie jeszcze mowa w dalszej części artykułu.

Pośrednie potwierdzenie przeciwnowotworowej roli białka p105 Rb, w tym szczególnie jego pozbawionej reszt fosforanowych postaci, przyniosły badania nad onkogennym działaniem niektórych wirusów DNA. Jednym z białek komórkowych wiązanych przez białkowy produkt onkogenu u adenowirusa E1A jest białko p105 Rb [77]. Posługując się analizą mutantów pokazano, że spośród 3 domen białka E1A wykazujących zachowawczość ewolucyjną wśród adenowirusów tylko domeny 1 i 2 są konieczne do wiązania się z p105 Rb [25, 78]. Te same domeny są również ważne dla transformujących właściwości onkogenu [25, 54, 68]. Wiązania p105 Rb i blokowanie w ten sposób jego działania nie jest jednak jedynym mechanizmem, w jaki E1A dokonuje transformacji komórek. Domena 1 jest konieczna do łączenia się z białkami p300, domena 2 zaś z białkiem p107 [25, 78]. Wiadomo, że istnieje mutant wiążący tylko p105 Rb i p107 i nie wywołujący transformacji komórek [78]. Rozdzielone domeny 1 i 2 mogą transformować komórki mimo niezdolności do łączenia się z p105 Rb [25]. Białka p300 i p107 to prawdopodobnie także produkty komórkowych genów przeciwnowotworowych. Ponieważ domeny 1 i 2 są konieczne dla zachowania takiej właściwości E1A jak represja transkrypcji [25, 68], jest prawdopodobne, że p105 Rb i/lub p107 i/lub p300 są czynnikami transkrypcyjnymi, które po związaniu z białkiem E1A nie mogą dotrzeć do "swoich" sekwencji DNA lub regulatorami innych czynników transkrypcyjnych. To ostatnie przypuszczenie znalazło potwierdzenie doświadczalne w przypadku p105 Rb [3, 57]. Domena 2 białka E1A ma swoje odpowiedniki w produktach onkogenów wirusów DNA polyoma i papilloma oraz w genomie komórki w genie *c-myc* [25]. Co więcej, pokazano, że duży antygen T (LT), produkt onkogenu wirusa SV40 z grupy polyoma, również wiąże się z p105 Rb i że sekwencja odpowiedzialna za tę cechę, odpowiada za transformujące właściwości LT [14]. Występujący w postaci oligomerów LT, wiąże tylko nisko ufosforylowane cząsteczki p105 Rb [55, 56]. Kompleks LT-p105 Rb ulega dysocjacji, gdy Rb jest fosforylowane w przebiegu cyklu komórkowego [56]. Kompleksy LT-p105 Rb istnieją więc tylko w fazie G₀/G₁. Przemawia to na rzecz przytoczonej powyżej hipotezy, że aktywną postacią p105 Rb jest forma nieufosforylowana, która ulega "wyłączeniu" pod koniec fazy G₁. Warto tu też wspomnieć, że ludzkie, starzejące się fibroblasty, nie mogące fosforylować p105 Rb, mogą być transformowane przez onkogenne wirusy DNA [70].

Onkogen wirusa brodawczaka (*papilloma*) HPV16 koduje białko E7, które wiąże się z p105 Rb [16]. Należy podkreślić, że w przeciwieństwie do wirusów polyoma, czy adenowirusów, HPV16 bierze prawdopodobnie udział w onkogenezie u ludzi (rak szyjki macicy) [16]. Wszystkie wyżej wymienione onkogeny wirusów DNA mają zdolność do transformacji i uniesmiertelniania komórek. Białko p105 Rb byłoby ze względu na swoje antyonkogenne właściwości dobrym celem dla produktów tych onkogenów. Inaktywacja p105 Rb przez

fizyczne wiązanie pozbawiałoby komórkę jednego z hamujących mechanizmów w regulacji proliferacji. Bardzo prawdopodobne jest wiązanie przez wspomniane wyżej produkty onkogenów innych komórkowych białek negatywnie regulujących proliferację komórek. Warto wspomnieć, że domena p105 Rb odpowiedzialna za wiązanie się z wyżej wymienionymi produktami onkogenów jest najczęstszym celem mutacji w nowotworach ludzi [28]. Nie jest więc zaskakujące, że odkryto komórkowe białka wiążące p105 Rb w sposób podobny do wspomnianych produktów białkowych onkogennych wirusów DNA [3, 57]. O innym wyizolowanym genie przeciwnowotworowym, którego produkt oddziałuje z onkogenami wirusów DNA będzie mowa poniżej.

Jakkolwiek by działało białko Rb, jeden skutek tego działania jest dobrze potwierdzony przez wyniki różnych badań. Białko p105 Rb hamuje nowotworowy fenotyp komórek. Dostarczono kilka bezpośrednich dowodów, świadczących o tym. Pochodzą one z doświadczeń, które polegały na wprowadzaniu do komórek nowotworowych z zaburzeniem ekspresji genu RB "zdrowego" allela tego locus [5, 38]. Huang i wsp. wprowadzali cDNA genu RB do komórek linii wywodzących się z retinoblastoma i z osteosarkoma za pomocą retrowirusa (38). Komórki nie przestały się dzielić, ale ich tempo wzrostu wyraźnie zmalało, o czym świadczyły zmiany morfologiczne i zdolność do tworzenia kolonii. Najważniejsze jednak jest to, że wprowadzenie genu RB do komórek nowotworowych powodowało ich niezdolność do tworzenia guzów u myszy nagich (bezgrasiczych), co najdobitniej świadczy o hamowaniu ich nowotworowego fenotypu.

W podobny sposób uzyskano represję "złośliwego" fenotypu w komórkach linii wywodzącej się z raka gruczołu krokowego, w których również brakowało ekspresji genu RB [5] oraz w komórkach raka sutka ze zmutowanym RB [51].

MOŻLIWE MODELE DZIAŁANIA BIAŁKA Rb

Chciałbym przedstawić i krótko przedyskutować proponowane modele, którymi próbuje się wyjaśnić dotychczas poznane właściwości p105 Rb.

Model 1 [12]. Niefosforylowanie p105 Rb blokuje wejście komórek w fazę S. Warunkiem wejścia do fazy S jest więc fosforylacja (= inaktywacja) p105 Rb. Pośrednim dowodem byłby fakt powiększania się rozmiarów komórek, które odzyskały gen RB [38], co może oznaczać wydłużenie fazy G₁.

Przeczy tej tezie to, że białka SV40 LT czy adenowirusowe E1A działają na transformowane przez siebie komórki jak mitogeny, co oznacza, że pojawiając się w komórce znajdującej się w fazie G₀, nie powodują natychmiastowego rozpoczęcia fazy S. Komórka musi przejść przez fazę G₁, chociaż obecne w niej p105 Rb uległo związaniu i najprawdopodobniej inaktywacji. Tak czy inaczej p105 Rb nie wydaje się być decydującym elementem w regulacji cyklu komórkowego.

Model 2 [12]. Niefosforylowane białko p105 Rb, jeśli jest obecne w komórce, stwarza jej możliwość wyjścia z cyklu komórkowego do fazy G₀. O tym, że decyzja o wyjściu z cyklu podejmowana jest rzeczywiście w czasie fazy G₁, gdy obecne jest defosforylowane p105 Rb, świadczy zawartość 2C DNA w komórkach pozostających w G₀ (np. w krążących we krwi limfocytach). Model ten wyjaśnia mitogenne właściwości E1A czy LT, nie wyjaśnia zaś przycoczonych wyżej zmian morfologicznych.

Model 3. Inaktywacja białka p105 Rb nie tylko warunkuje wejście w fazę S, ale także w jakiś sposób jest istotna dla przejścia przez fazę M. Wyłączenie bowiem termowrażliwego SV40 LT powodowało pojawienie się komórek zablokowanych w fazach G₁/S i G₂/M [39].

Wszystkim tym trzem koncepcjom można postawić jeden duży zarzut: zakładają one, że mechanizm działania genu RB jest powszechny, przynajmniej w świecie komórek, które mogą być transformowane wirusami onkogennymi DNA. Eksperyment przyrody w postaci pacjentów z mutacją locus RB w linii zarodkowej, którzy poza zaprogramowanym siatkówczakiem i osteosarkoma nie mają z tego powodu żadnych innych kłopotów, w sposób oczywisty przeczy takiej powszechności. Brak regulującego wpływu RB ujawnia się tylko w określonych tkankach (siatkówka, tkanka kostna). Być może inaktywacja innych genów przeciwnowotworowych przyczynia się do ujawnienia mutacji recesywnych w locus RB w przypadku nowotworów wywodzących się z innych tkanek (rak przewodowy sutka, rak gruczołu krokowego i inne).

KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA INNYCH, DOTYCHCZAS POZNANYCH GENÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

1. LOCUS GUZA WILMSA

Guz Wilmsa (nerczak złośliwy, nephroblastoma), najczęstszy nowotwór jamy brzusznej u dzieci, wydaje się być jednym z przykładów nowotworu, w którego rozwoju istotną rolę odgrywa inaktywacja produktu genu przeciwnowotworowego (lub raczej kilku takich genów) [21]. Podobnie jak siatkówczak, guz Wilmsa pojawia się jako cecha recesywna przekazywana potomstwu lub sporadycznie.

Badaniem cytogenetycznym wykazano w niektórych przypadkach delecje obejmujące region p13 w chromosomie 11 [21]. Okazało się jednak, że guz Wilmsa jest różnorodny, jeśli chodzi o wykrywane zmiany genetyczne; w części przypadków występowały delecje w 11p15, u części zaś dotkniętych rodzin guz Wilmsa nie wykazywał sprzężenia z chromosomem 11 [21].

Rola loci w chromosomie 11 została potwierdzona przynajmniej w części przypadków guzów Wilmsa przez zahamowanie nowotworowego fenotypu ich komórek pod wpływem wprowadzenia do nich normalnego chromosomu 11 [76].

Dwum grupom badaczy udało się zidentyfikować gen, który może być genem przeciwnowotworowym zawartym w locus 11p13 [9, 24]. Gen obejmuje co najmniej 60 kb genomowego DNA. Długość mRNA wynosi 2,9 kb. Gen podlega ekspresji w płodowej nerce, komórkach grzebienia płciowego, płodowej gonadzie, mesothellum [24, 61] i w komórkach krwiotwórczych [9].

Profil ekspresji pozwala przypuszczać, że zaburzenie funkcji zidentyfikowanego genu może mieć znaczenie w etiologii wrodzonych wad układu moczowo-płciowego obserwowanych u niektórych pacjentów z guzem Wilmsa [61].

Przewidywana sekwencja aminokwasów białka zawiera 5 domen charakterystycznych dla czynników transkrypcyjnych:

a – region bogaty w prolinę i glutaminę (domena taka odpowiada za aktywację transkrypcji w wielu znanych czynnikach transkrypcyjnych),

b – cztery domeny o sekwencji tzw. palców cynkowych (*zinc finger*), które pozwalają na łączenie się z DNA [9, 24].

Jak do tej pory, zidentyfikowano jedynie 3 linie komórkowe guzów Willmsa wykazujące rearanżacje tego locus [9, 24]. Nie udało się znaleźć na razie żadnej delecji wewnętrznej, a spośród 24 linii komórkowych guza Willmsa żadna nie wykazywała anomalii w ekspresji sklonowanego genu [9, 24].

Najbliższy czas pokaże, czy rzeczywiście mamy do czynienia z nowym genem przeciwnowotworowym, czy też jedynie z regulatorem rozwoju układu moczowo-płciowego.

2. BIAŁKO p53

Białko komórkowe p53 wykryto badając białka wiążące się z SV40 LT [47]. Ze względu na (a) podwyższony poziom ekspresji genu kodującego p53 [13, 45] i (b) przedłużony czas półtrwania p53 w komórkach stransformowanych [19] oraz (c) współtransformujące właściwości genu p53 wraz z onkogenem *ras* w eksperymentach transfekcyjnych [60], genowi p53 przypisano etykietę onkogeny. Zrobiono to przedwcześnie, gdyż transformujący gen p53 okazał się być mutantem [31]. "Dziki" gen nie tylko, że nie transformował komórek, ale wywierał działanie przeciwne, hamując transformację komórek, do których był wprowadzany [2, 19]. Szereg dalszych danych pozwala przypuszczać, że dziki gen p53 może być ważnym genem przeciwnowotworowym.

Białko p53 podobnie jak p105 Rb oddziałuje z okogenowymi białkami wirusów DNA LT [47], E1B [66] czy HPV16 [67]. Gen p53 ulega często inaktywacji przez integrację wirusa Frienda w komórkach białaczek indukowanych tym wirusem [59]. Gen p53 jest najczęściej mutującym genem w największej liczbie rodzajów ludzkich nowotworów [53]. Rearanżacje genu i/lub utrata heterozygotyczności markerów krótkiego ramienia chromosomu 17, w którym leży locus genu p53 i/lub zaburzenia ekspresji p53 wykrywano w 50% badanych ludzkich mięsaków kości i mięśniaków mięsakovych prądkowanokomórkowych (*rhabdomyosarcoma*) [58]. Białko p53 nie pojawiało się w komórkach białaczki HL60 [80]. Około 75% badanych nowotworów jelita grubego zawierało delecje w obrębie 17p12-17p13.3, gdzie zlokalizowany jest gen p53 [1, 83]. Ogromna większość delecji dotyczy tylko jednego allelu. Ekspresja p53 była przeważnie zachowana. W przypadku dwóch linii komórkowych wykazano, że ekspresji ulegał zmutowany allel najprawdopodobniej o onkogenowych właściwościach [1]. Ekspresja zmutowanego allelu genu p53, połączona z utratą "dzikiego" typu może być istotna dla rozwoju nowotworu. Transformujące mutanty p53 mają bowiem skłonność do tworzenia kompleksów z białkami komórkowymi, w tym ze swoim "dzikim" odpowiednikiem, który byłby w ten sposób inaktywowany [30]. Działanie takie jest określane jako dominacja negatywna. Utrata dzikiego allelu p53 doprowadzałaby do dalszego postępu procesu nowotworowego, ponieważ mutant mógłby się "skoncentrować" na pozytywnej dominacji. Potwierdza to fakt, że delecje w krótkim ramieniu chromosomu 17 w rakach jelita grubego pojawiają się często jako późne zjawiska związane z nasileniem złośliwości [1, 83]. Ważnym dowodem na istotność utraty p53 w rozwoju raka jelita grubego jest utrata nowotworowego fenotypu przez linie komórkowe wywodzące się z raka jelita grubego po wprowadzeniu do nich prawidłowego genu p53 [2]. Rearanżacje w genie p53 i/lub zaburzenia jego ekspresji spotyka się w ponad 50% przypadków raka owsianokomórkowego płuc [71]. Podobne zaburzenia wykrywa się często w rakach sutka [73, 81]. Bardzo specyficzne mutacje ograniczone do kilku zasad w genie p53 i polegające na praktycznie

identycznych substytucjach wykryto w większości przypadków raka wątroby (*carcinoma hepatocellulare*) [6, 29, 37] pochodzących z Afryki południowej i Chin, gdzie choroba ta jest bardzo rozpowszechniona. Takie miejsca o podwyższonej częstotliwości mutacji (ang. *hot spots*) w genie p53 są obserwowane w wielu innych nowotworach ludzi i często pokrywają się, gdy porównuje się różne nowotwory [52]. Czy ta niezwykła specyficzność mutacji wiąże się z nabyciem przez p53 nowej funkcji, a nie tylko z utratą swojej zwykłej fizjologicznej roli lub negatywną dominacją, pozostaje do wyjaśnienia.

Pewne aspekty mechanizmu realizowania przez p53 swoich funkcji zostały ostatnio odkryte. Białko p53 jest zlokalizowane w jądrze komórkowym i może wiązać się z DNA [18, 63]. Sekwencja p53 wykazuje cechy charakterystyczne dla czynników transkrypcyjnych, takie jak nagromadzenie aminokwasów kwaśnych i prolina na końcu NH₂ (aktywacja transkrypcji) oraz zasadowych na końcu COOH (wiązania z DNA) [52]. Rzeczywiście, uzyskano dane świadczące o tym, że p53 jest jednym z najsilniejszych aktywatorów transkrypcji poznanych do tej pory, o sile działania dorównującej białku VP16 wirusów herpes [18]. Zmutowane i onkogenne białko p53 nie wykazuje tej aktywności [63]. Na razie jednak brak jest potwierdzenia, czy białko p53 może aktywować transkrypcję wiążąc się elementami kontrolnymi genów. Nie wiadomo też, jakie geny podlegają kontroli p53. Możliwe, że p53 aktywuje transkrypcje nieznanych jeszcze genów przeciwnowotworowych.

Obserwowano wahania stężenia białka p53 zależne od faz cyklu komórkowego. Synteza p53 poprzedza fazę S [64].

Nie jest wykluczona regulacja działania białka p53 poprzez fosforylację [18]. Bardzo krótki czas półtrwania potwierdza dużą aktywność biologiczną tego białka [64].

INNE ZNANE GENY PRZECIWNOWOTWOROWE

Obserwowane w 70% przypadków raka jelita grubego delecje długiego ramienia chromosomu 18 oznaczały możliwość inaktywacji hamującego nowotwór genu, znajdującego się w tym rejonie genomu. Gen ten nazwano DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) [17, 82].

Z rejonu 18q21 wyizolowano sondy genomowe wykazujące zachowawczość ewolucyjną [17]. Sondami tymi wykrywano cDNA w bibliotekach cDNA pochodzących z wszystkich tkanek. Jedynie komórki raków okrężnicy wykazywały znaczne zmniejszenie ekspresji hipotetycznego genu DCC [17]. Również na poziomie genomowym wykryto liczne zmiany w obrębie DCC w komórkach nowotworów jelita grubego [17]. Analizę sekwencji otwartej ramki odczytu z dotychczas wyizolowanych klonów cDNA genu DCC pokazano podobieństwo produktu genu do nadrodziny immunoglobulinowej, a w szczególności do glikoprotein błonowych zaangażowanych w adhezji komórek, takich jak N-CAM (*Neural Cell Adhesion Molecules*) czy fasciulina 2 [17].

Ostatnio zidentyfikowano inny hipotetyczny gen przeciwnowotworowy odgrywający rolę w rozwoju raka okrężnicy [7]. Gen MCC (*Mutated in Colorectal Carcinoma*) koduje białko, które prawdopodobnie może oddziaływać z białkami G modyfikując transdukcję. Nie wykluczono, że białko to należy również do rodziny białek strukturalnych [7].

Innym hipotetycznym genem przeciwnowotworowym, który ostatnio został bliżej poznany, jest gen warunkujący nerwiakowłókniakowatość, czyli chorobę Recklinghausena,

dziedziczony w sposób dominujący zespół objawiający się między innymi licznymi łagodnymi nowotworami skóry typu nerwiakowłókniaków. Locus choroby Recklinghausena (NF1) zostało przypisane do długiego ramienia chromosomu 17 [62]. Udało się wyizolować część cDNA genu NF1 [10, 62, 75]. Sondą cDNA tego genu wykrywa się 13 kb mRNA w wielu tkankach. Na podstawie analizy sekwencji sugerowano homologię produktu genu z białkiem aktywującym GTPazę (GAP = *GTPase activating protein*) [85]. Białko GAP bierze udział w procesach transdukcji sygnałów, kooperując w niewyjaśniony do końca sposób z produktami rodziny onkogenów *ras* [79]. Warto wspomnieć, że w intronach genu NF1 znajduje się kilka zorientowanych w przeciwnym kierunku genów [85]. Ich rola w patomechanizmie choroby von Recklinghausena pozostaje do wyjaśnienia.

PERSPEKTYWY

Strategia badawcza zastosowana po raz pierwszy w stosunku do locus RB okazuje się owocna w stosunku do innych genów hamujących transformację nowotworową. Zasady "odwrotnej genetyki" (*reverse genetics*), które prowadzą do lokalizacji genu poprzez cDNA do białka, pozwalają na bezpośredni wgląd w mechanizm działania produktów genów przeciwnowotworowych w wielu powszechnie występujących nowotworach.

Dotychczasowe badania działania genów przeciwnowotworowych każą zrewidować zasadność rozróżniania onkogenów i genów przeciwnowotworowych, jako dwóch grup genów o przeciwnym wpływie na proliferację, wzrost i różnicowanie się komórek. Podział, którego kryterium jest dominacja bądź recesywność zdolności do transformacji, jawi się w świetle ostatnich badań jako co najmniej niezadowolający. Gen p53 jest bardzo dobrym przykładem sztuczności granicy onkogeny-geny przeciwnowotworowe.

Trzeba też pamiętać o tym, że na proces nowotworowy składa się zwykle wiele różnych mutacji. Można sobie łatwo wyobrazić, że zmiana genetyczna w obrębie genu kontrolującego proliferację komórek może nadawać mu onkogenny bądź antyonkogenny charakter w zależności od kontekstu towarzyszących jej innych zmian w genomie komórki. Gen taki jest przecież częścią bardzo złożonej sieci regulacyjnej. Dlatego założenia niezmiennego pozytywnego lub negatywnego działania składników takiej sieci w kontroli proliferacji komórek jest trudne do przyjęcia.

Badania nad genami przeciwnowotworowymi, niezależnie od ich ogromnego znaczenia teoretycznego, mogą mieć wpływ na rozwiązywanie problemów praktycznych. Geny hamujące transformację nowotworową stanowią o możliwości zastosowania substytucyjnej terapii genowej do zapobiegania i/lub leczenia chorób nowotworowych, a szczególnie ich dziedzicznych postaci. W bliższej przyszłości należy się spodziewać zastosowania diagnostyki prenatalnej do wykrywania dziedzicznych postaci nowotworów.

Inaktywacja genów w toku rozwoju nowotworu może być wskaźnikiem złośliwości i postępu choroby (np. p53 w raku okrężnicy). Inaktywacja genów wydaje się być bardzo ważnym elementem onkogenezy. Zjawisko to jest istotne dla rozwoju wielu powszechnie występujących nowotworów [32, 53]. Wielki wpływ badania hamujących nowotwory genów na zrozumienie procesu nowotworowego i potencjalne konsekwencje tego zrozumienia spowodowały, że Georg Klein nadał swojemu artykułowi [42] patetyczny tytuł "*The approaching era of the tumour suppressor genes*". Wydaje się, że nie jest to zupełnie przesadzone.

Literatura

- [1] BAKER SJ, FEARON ER, NIGRO JM. et al. Chromosome 17 deletations and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; **244**: 217–221.
- [2] BAKER SJ et al. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990; **249**: 912–915.
- [3] BANDARA LR, LA THANGUEE NB. Adenovirus E1A prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* 1991; **351**: 494–497.
- [4] BENEDICT WF. Recessive human cancer susceptibility genes (Retinoblastoma and Wilm's loci). *Adv Viral Oncol* (red.) G. Klein 1987; **7**: 19–34.
- [5] BOOKSTEIN R et al. Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. *Science* 1990; **247**: 712–715.
- [6] BRESSAC B et al. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991; **350**: 429–431.
- [7] BOURNE HR. Consider the coiled coil. *Nature* 1991; **351**: 188–190.
- [8] BUCHKOVICH K, DUFFY LA, JARLOW E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 1989; **58**: 1097–1105.
- [9] CALL KM, GLESER T, ITO CY, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms tumor locus. *Cell* 1990; **60**: 509–520.
- [10] CAWTHON RM et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* 1990; **62**: 193–201.
- [11] CHEN P-L, SCULLY P, SHEW J-Y. et al. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989; **58**: 1193–1198.
- [12] COOPER JA, WHYTE P. RB and the cell cycle: entrance or exit. *Cell* 1989; **58**: 1009–1011.
- [13] CRAWFORD LV et al. Detection of a common feature in several human tumor cell lines – 53000 Dalton protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 41–45.
- [14] DeCAPIRO JA, LUDLOW JW, FIGGE J. et al. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988; **54**: 275–283.
- [15] DeCAPIRO JA, LUDLOW JW, LYNCH D. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 1989; **58**: 1085–1095.
- [16] DYSON N, HORBY RM, MUNGER K, HARLOW E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; **243**: 934–936.
- [17] FEARON ER, CHO KR, NIGRO JM. et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; **247**: 49–56.
- [18] FIELDS S, JANG SK. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 1990; **249**: 1046–1049.
- [19] FINLAY CA, HINDS PW, LEVINE AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; **57**: 1083–1093.
- [20] FOULDS L. The natural history of cancer. *J Chron Dis* 1958; **8**: 2–37.
- [21] FRANCKE U. A gene for Wilm's tumour? *Nature* 1990; **343**: 692–694.
- [22] FRIEND SH, BERNARDS R, ROGELJ S, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predispose to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; **323**: 643–646.
- [23] FUNG YKT, MURPHREE AL, TANG A, et al. Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* 1987; **236**: 1657–1661.
- [24] GESSLER M, POUSTKA A, CAVENEE W, et al. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 1990; **343**: 774–778.
- [25] GREEN MR. When the products of oncogenes and anti-oncogenes meet. *Cell* 1989; **56**: 1–3.
- [26] HANSEN MF, CAVENEE WK. Tumor suppressors: recessive mutations that lead to cancer. *Cell* 1968; **53**: 172–173.
- [27] HARBOUR JW et al. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 1988; **241**: 353.
- [28] BUCHKOVICH K, DYSON N, FAJE B. et al. Cellular targets for transformation by DNA tumor viruses. Streszczenie. The 4. IMP International Conference on the control of proliferation in normal and malignant cells. 3rd–5th May 1991. Vienna. Programme and abstract book. 1991; p. 42.
- [29] HARRIS AL. Telling changes of base. *Nature* 1991; **350**: 377–378.

- [30] HERSKOWITZ I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 1987; 329: 219–222.
- [31] HINDS P et al. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the *ras* oncogene and transformation. *J Virol* 1989; 63: 739–746.
- [32] HOLLINGSWORTH RE, LEE W-H. Tumor suppressor genes: new prospects for cancer research. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 91–96.
- [33] HOLT JT et al. Inducible production of *c-fos* antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4794–4798.
- [34] HONG FD. Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5502–5506.
- [35] HOROWITZ JM, YANDELL DW, PARK SA, et al. Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* 1989; 243: 937–940.
- [36] HORST A. Regulacja ekspresji genów eukariotów. *Post Biol Kom* 1990; 17: 161–196.
- [37] HSU IC et al. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991; 350: 427–429.
- [38] HUANG SH-J, YEE J. K, SHEW J. Y., et al. Suppression of the neoplastic phenotype by the replacement of the RB gene into human cancer cells. *Science* 1988; 242: 1563–1566.
- [39] JAT PS, SHARP PA. Cell lines established by a temperature sensitive simian virus 40 large-T-antigen are growth restricted at the nonpermissive temperature. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 1672–1681.
- [40] KAWIAK J. Regulacja cyklu mitotycznego. *Post Biol Kom* 1990; 17: 325–353.
- [41] KLEIN G, KLEIN E. Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. *Nature* 1985; 315: 190–195.
- [42] KLEIN G. The approaching era of the tumor suppressor genes. *Science* 1987; 238: 1539–1545.
- [43] KNUDSON AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820–823.
- [44] KNUDSON AG. A two mutation model for human cancer. *Adv Virol Oncol* (red.) G. Klein 1987; 7: 1–17.
- [45] KOEFLER HP et al. Increased expression of p53 protein in human leukemia cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1986; 83: 4035–4039.
- [46] LALANDE M. Isolation of human chromosomal 13-specific DNA sequences cloned from flow sorted chromosomes and potentially linked to the retinoblastoma locus. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 13: 283–295.
- [47] LANE DP, CRAWFORD LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261–263.
- [48] LEE EY-HP, TO H, SHEW JY et al. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* 1968; 241: 218–221.
- [49] LEE W-H, BOOKSTEIN R, HONG F. et al. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 1987; 235: 1394–1399.
- [50] LEE W-H, SHEW JY, HONG FD, et al. The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* 1987; 329: 642–645.
- [51] LEE W-H et al. Molecular basis of cancer suppression by the human tumor suppressor genes. Streszczenie The 4. IMP International Conference on the control of proliferation in normal and malignant cells. 3rd–5th May 1991, Vienna. Programme and abstract book 1991; p. 43.
- [52] LEVINE AJ, MOMAND J. Tumor suppressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and genes products. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1032: 119–136.
- [53] LEVINE AJ, MOMAND J, FINLAY CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453–456.
- [54] LILLIE JW et al. Functional domains of adenovirus type 5 E1a proteins. *Cell* 1987; 50: 1091–1100.
- [55] LUDLOW JW et al. SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* 1989; 56: 57–65.
- [56] LUNDLOW JW, SHON J, PIPAS JM, LIVINGSTON DN, DECAPRIO JA. The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell* 1990; 40: 387–396.
- [57] MARX J. How the retinoblastoma gene may inhibit cell growth. *Science* 1991; 252: 1492.
- [58] MULLIGAN LM et al. Mechanisms of p53 loss in human sarcomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5863–5867.
- [59] MUNROE DG et al. Inactivation of the cellular p53 gene is a common feature of Friend virus-induced erythroleukemia: relationship of inactivation to dominant transforming alleles. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 3307–3313.
- [60] PARADA LF et al. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and *ras* in cellular transformation. *Nature* 1984; 312: 649–651.

- [61] PRITCHARD-JONES K, FLEMING S, DAWIDSON D. et al. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990; **346**: 194–196.
- [62] PONDER B. Neurofibromatosis gene cloned. *Nature* 1990; **346**: 703–704.
- [63] RAYCROFT L et al. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* 1990; **249**: 1049–1051.
- [64] REICH NC, LEVINE AJ. Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 1984; **308**: 199–201.
- [65] ROBBINS PD, HOROWITZ JM, MULLIGAN RC. Negative regulation of human *c-fos* expression by the retinoblastoma gene product. *Nature* 1990; **346**: 668–671.
- [66] SARNOW P et al. Adenovirus E1b-58 kD tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kD cellular protein in transformed cells. *Cell* 1982; **28**: 387–394.
- [67] SCHEFFNER M, WERNERSS BA, HUIBREGSE JM, LEVINE AJ, HAWLEY PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; **63**: 1129–1136.
- [68] SCHNEIDER JF, FISHER F, GODING LR, JONES NC. Mutational analysis of the adenovirus E1A gene: the role of transcriptional regulation in transformation. *EMBO J* 1987; **6**: 2053–2060.
- [69] SHENOY S et al. Purified maturation promoting factor phosphorylates pp60 c-src at the sites phosphorylated during fibroblast mitosis. *Cell* 1989; **57**: 763–774.
- [70] STEIN GH et al. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science* 1990; **249**: 666–669.
- [71] TAKAHASHI T, NAU MN, CHIBA I et al. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989; **246**: 491–494.
- [72] TAKAHASHI T et al. Allele loss at the retinoblastoma locus in human ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991; **83**: 673–640.
- [73] THEILLET C, CHEIKH MB, MAZARS R, et al. Do genomic alterations define particular subsets of breast tumors? Breast Cancer. Clinical impact of molecular and biochemical oncology. May 2, 1991; Vienna. Abstract.
- [74] TRENT JM, et al. Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. *Science* 1990; **247**: 568–571.
- [75] WALLACE MR et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 1990; **249**: 181–186.
- [76] WEISSMAN BE, SAXON PJ, PASQUALE SR et al. Introduction of a normal human chromosome 11 into a Wilms' tumor cell line controls its tumorigenic expression. *Science* 1987; **236**: 175–180.
- [77] WHYTE P. Association between an oncogene and an antioncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; **334**: 124–129.
- [78] WHYTE P, WILLIAMSON NM, HARLOW E. Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* 1989; **56**: 67–75.
- [79] WIGLER MH. GAPs in understanding Ras. *Nature* 1990; **346**: 696–697.
- [80] WOLF D, ROTTER V. Major alterations in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 790–794.
- [81] VARLEY JM. RB1 and p53 and human breast cancer. Streszczenie Breast Cancer. Clinical impact of molecular and biochemical oncology. May 2, 1991 Vienna, University Hospital of Vienne, Medical School, Ist. Dept. of Gynaecology 1991;
- [82] VOGELSTEIN B et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988; **319**: 525–532.
- [83] VOGELSTEIN B et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; **244**: 217–221.
- [84] ŻMIJEWSKI M, Onkogen jądrowy *jun* jako przykład regulatora ekspresji genów przez białka specyficznie wiążące DNA. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 77–91.
- [85] XU G, O'CONNELL P, VISKOCHIL D, et al. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 1990; **62**: 599–608.

Otrzymano: 30 lipca 1991

Przyjęto: 6 września 1991

Adres autora: Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

SOMATYCZNA EMBRIOGENEZA ROŚLIN IN VITRO. I. CZYNNIKI WARUNKUJĄCE POWSTAWANIE SOMATYCZNYCH ZARODKÓW

IN VITRO SOMATIC EMBRYOGENESIS IN PLANTS. I. FACTORS AFFECTING SOMATIC EMBRYO FORMATION

Halina KONONOWICZ

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii
Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie. Somatyczna embriogeneza in vitro została opisana dla wielu roślin. W niniejszej pracy omówiono zagadnienia dotyczące selekcji eksplantatów dla somatycznej embriogenezy. Obniżenie lub utrata potencjału morfogenetycznego, obserwowana w tkankach i organach hodowanych in vitro wydaje się być związana ze zmianami genomu. Omówiono znaczenie fizycznej izolacji embriogennych komórek od otaczającej ją tkanki bezpośrednio przed inicjacją embriogenezy. Somatyczna embriogeneza in vitro może być inicjowana bezpośrednio z komórek eksplantatu lub pośrednio – poprzez stadium kalusa. Ten drugi typ embriogenezy, pośredni, wymaga ściśle określonych zmian pożywek. Podziały komórkowe w eksplantacie są indukowane zwykle przez wysokie stężenia auksyn lub auksyn i cytokinin. Pochodzenie eksplantatu ma istotne znaczenie przy doborze rodzaju i stężenia regulatorów wzrostu. W artykule omówiono rolę auksyn, cytokinin i giberelin w rozwoju somatycznych zarodków in vitro.

Summary. In vitro somatic embryogenesis has been described for many plant species. This paper deals with several aspects of explant selection for somatic embryogenesis. A decrease or loss of morphogenic potential which has been observed in tissues and organs cultured in vitro seems to be related to genomic changes. The importance of physical isolation of embryogenic cells from the surrounding tissue immediately before initiation of embryogenesis is discussed. Somatic embryogenesis in vitro can occur with or without intervening callus formation. The latter, an indirect embryogenesis requires special manipulation of culture media. Cell divisions in explants are induced by high concentration of auxins or auxins and cytokinins. The type and concentration of growth regulators required depends upon the source of the explant. The role of auxins, cytokinins, and gibberellins in embryo development is discussed.

WSTĘP

Ostatnie dwie dekady przyniosły znaczną ilość informacji dotyczących embriogennych kompetencji komórek roślinnych. Chociaż uświadomienie potencjalnej niezależności indywidualnej komórki roślinnej – zwanej totipotencją – sięga połowy XIX w., to idea regeneracji *in vitro* całej rośliny z izolowanych komórek pochodzi od niemieckiego botanika Haberlandta. Już w 1902 roku dyskutując problem totipotencji w świecie roślin, wskazał on na możliwość odtwarzania całej rośliny poprzez hodowanie *in vitro* pojedynczych, izolowanych komórek somatycznych. Bezpośrednie potwierdzenie tej śmiałej hipotezy uzyskano znacznie później – w latach trzydziestych – kiedy ostatecznie stało się możliwe hodowanie komórek roślinnych w kulturach *in vitro*. Następnie seria prac Stewarda (praca przegląd. [31]) opisujących regenerację roślin z hodowanych *in vitro* komórek tkanki zapasowej marchwi wskazywała na możliwość manipulacji totipotencją komórek roślinnych. Kolejnym poparciem koncepcji totipotencji było uzyskanie *in vitro* somatycznej embriogenezy w 1958 r. niezależnie przez Wetherella i Halperina oraz Stewarda i wsp. (patrz prace przegląd. [17, 28, 31]).

Nasza obecna wiedza dotycząca somatycznej embriogenezy *in vitro* jest wynikiem ogromnej liczby badań prowadzonych na różnych modelach eksperymentalnych (prace przeglądowe [17, 22, 24, 28, 31]). Najważniejszą rolę w badaniach nad powstawaniem i rozwojem zarodków *in vitro* odegrały kultury marchwi *Daucus carota* [17].

Dotychczas somatyczna embriogeneza została opisana dla ponad 200 gatunków należących do 33 rodzin i liczba tych gatunków ciągle się powiększa. Listę gatunków, u których wykazano somatyczną embriogenezę w warunkach *in vitro*, zestawili w swoich pracach Rangaswamy [17] i Mc Williams i Maheswaran [31].

Zarodki powstające w kulturach *in vitro* opisywane są jako zarodki somatyczne (*somatic embryos*), zarodki dodatkowe (*accessory embryos*), zarodki przybyszowe (*adventive embryos*), zarodki aseksualne (*asexual embryos*), embrioidy (*embryoids*). Ten ostatni termin używany jest najpowszechniej. W niniejszej pracy zarodki powstające w kulturach *in vitro* nazywane będą zarodkami somatycznymi. Termin ten wydaje się słuszny, bowiem akcentuje powstawanie zarodków z komórek somatycznych, w odróżnieniu od zarodków zygotycznych, powstających z zygoty.

ROLA EKSPLANTATÓW W SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZIE

Istnienie totipotencji zróżnicowanych komórek dowodzi, że co najmniej w niektórych przypadkach proces rozwoju i różnicowania nie pociąga za sobą utraty czy też nieodwracalnej inaktywacji informacji genetycznej komórki, ale raczej związane jest z regulacją ekspresji genów [22].

Somatyczną embriogenezę uzyskiwano przy wykorzystaniu różnorodnych eksplantatów, takich jak np. fragmenty łodyg, korzeni, pędów, pąki kwiatowe oraz ziarna pyłku czy gametofity. Chociaż nie wszystkie tkanki zdolne są do produkcji embriogennych komórek, bowiem blokada genów działa z niejednakową intensywnością u różnych grup roślin i w

różnych tkankach, wydaje się jednak, że proces embriogenezy in vitro można zainicjować z każdej części rośliny (prace przegląd. [17, 28, 30, 31]).

Czynnikiem, który często odgrywa decydującą rolę w uzyskaniu somatycznej embriogenezy, jest stadium rozwojowe eksplantatu. U niektórych roślin jedynie niedojrzałe embriogennie tkanki zachowują zdolność do tworzenia morfogenego kalusa [28]. Kiedy jednak stadium embriogenne zostanie już raz osiągnięte, kalus może się namnażać jako niezorganizowana tkanka, zachowując swój potencjał embriogeny. Należy jednak podkreślić, że aktywacja tego potencjału jest możliwa dopiero w określonych warunkach hodowli [1, 4, 6, 23].

Mimo że wszystkie komórki danego organizmu mają taki sam zespół informacji genetycznej, to jej ekspresja może podlegać znacznym modyfikacjom m.in. w zależności od pozycji zajmowanej przez komórkę w eksplantacie.

Bez względu na rodzaj użytego eksplantatu, pierwsze podziały komórkowe rozpoczynają się zazwyczaj w pobliżu tkanki prokambialnej. Jest to prawdopodobnie związane z wyższą koncentracją hormonów i substancji odżywczych w tej tkance. Ostatnio badania prowadzone na *Pennisetum purpureum* wykazały, że embriogennie kompetentne tkanki młodych liści oraz uzyskany z nich kalus zawierały więcej endogennych substancji wzrostowych, tj. IAA i kwasu abscysynowego (ABA), w porównaniu z dojrzałymi liśćmi, niezdolnymi do tworzenia embriogenego kalusa [16]. Sugeruje się istnienie przyczynowego związku między poziomem endogennych hormonów i embriogenym potencjałem tkanek czy organów [16, 18].

Ponieważ komórki eksplantatów różnią się zazwyczaj między sobą pod względem cytologicznym, stadium rozwojowym czy stanem fizjologicznym, kultury powstające z eksplantatów w początkowej fazie hodowli są z reguły heterogenne.

O znaczeniu doboru eksplantatu dla uzyskania kultury o wysokim potencjale embriogenym świadczą badania przeprowadzone przez Esan [7] na gatunkach roślin cytrusowych, które kwitną i owocują przez cały rok. Okazało się, że najwyższą częstotliwość embriogenezy uzyskano z eksplantatów pobieranych w miesiącach jesiennych i zimowych. Ponadto, wykorzystując jako eksplantat ośrodek, otrzymano odmienne wyniki w zależności od sposobu jego ułożenia na pożywce tzn. w zależności od tego, który z biegunów mikropylarny czy chalazalny, był zatopiony w podłożu lub czy ułożenie jego było poziome. Obserwowane różnice wynikały, jak się przypuszcza, z określonego rozmieszczenia w eksplantacie substancji hamujących proces embriogenezy – prawdopodobnie IAA, ABA czy GA₃.

Postępująca wraz z wiekiem eksplantatu utrata jego potencjału embriogenego może być związana ze zmianami dotyczącymi aparatu genetycznego, a zwłaszcza z obniżeniem zawartości DNA jądrowego, lub fragmentacją jąder [2, 10].

Sugeruje się, że rodzaj uzyskiwanej odpowiedzi morfogenetycznej in vitro jest determinowany genotypowo. Jeżeli koncepcja ta byłaby słuszna, to niezależnie od rodzaju eksplantatu o tym samym genotypie można oczekiwać identycznych lub co najmniej zbliżonych rezultatów [28]. W literaturze są jednak przykłady wykazujące uzyskanie odmiennych efektów morfogenetycznych z różnych eksplantatów o tym samym genotypie, jakimi są np. wczesne stadia rozwojowe zarodków i kwiatostany tej samej rośliny tego samego genotypu (prace przegląd. [17, 28]). Wydaje się więc, że stadium rozwojowe eksplantatu oraz warunki hodowli mają większy wpływ na ujawnienie potencjału morfogenetycznego niż genotyp [5, 9, 14, 19, 25, 26].

Zależność między genotypem i potencjałem embriogennym wyrażanym *in vitro* nie jest bezpośrednia, ale uzależniona od szeregu czynników, jak np. warunki środowiska czy właściwości fizjologiczne eksplantatu. Oddziaływania te mogą być przyczyną zmian w poziomie czy rozmieszczeniu hormonów, decydujących o zdolnościach embriogennych kultury [28]. Tak więc z eksplantatów nawet tych gatunków, które uważane są za odporne, może być indukowana morfogeneza. Ma to miejsce w sytuacji, kiedy eksplantaty pobierane są w ściśle określonym stadium rozwojowym, z rośliny hodowanej w optymalnych warunkach. I odwrotnie, rośliny charakteryzujące się wysokim potencjałem embriogennym *in vitro* mogą nie być zdolne do morfogenezy w przypadku nieodpowiednio dobranych eksplantatów lub eksplantatów pochodzących z roślin rosnących w niekorzystnych warunkach.

DROGI POWSTAWANIA SOMATYCZNYCH ZARODKÓW *IN VITRO*

Somatyczna embriogeneza może zachodzić bezpośrednio z komórek eksplantatu lub pośrednio poprzez stadium kalusa. Ten ostatni sposób wymaga odróżnicowania komórek, namnażania kalusa i ponownego różnicowania komórek.

W przeciwieństwie do tkanek podlegających organogenezie, w których indukcja morfogenezy w komórkach kalusa zachodzi pod wpływem odpowiedniego doboru regulatorów wzrostu – zwykle auksyn i cytokinin – embriogenne zdeterminowanie komórek zachodzi bardzo wcześnie, bo już podczas odróżnicowywania komórek eksplantatu i tworzenia kalusa. Sugerowano, że izolacja komórek będących w stanie zahamowanego rozwoju powoduje powrót tkanki do stadium podstawowego, jakim jest stadium embriogenezy [17, 31 i cyt. literatura].

Proces embriogenezy pośredniej odbywa się zwykle w dwóch etapach wymagających różnych pożywek. W pierwszym etapie zachodzi indukcja kalusa o właściwościach embriogennych, którego inicjacja i namnażanie wymaga obecności auksyn o wyższych stężeniach. Najczęściej stosowana jest auksyna syntetyczna 2,4-D, w koncentracji od 0,5 do 1,0 mg · l⁻¹. Na takiej pożywce następuje namnażanie masy kalusa i wyodrębnione zostają grupy komórek o charakterze merystematycznym, które w literaturze zwane są embriogennymi skupieniami, proembriogennymi tkankami lub merystemoidami. Powtórne pasażowanie kalusa na te same pożywki powoduje jedynie zwiększenie ilości embriogennej kalusa. Natomiast dla powstawania zarodków – zachodzącego na drugim etapie – konieczne jest przeniesienie kalusa na pożywkę o niskim stężeniu auksyn lub całkowicie ich pozbawionej.

Nie jest dotąd wyjaśnione, czy odróżnicowanie jest etapem koniecznym w procesie embriogenezy *in vitro* czy auksyny i cytokiny stosowane do inicjacji podziałów komórkowych wywierają efekt uboczny, jakim jest hamowanie ekspresji potencjału embriogennej. Zdaniem Stewarda i wsp. (1970) (patrz [17] i cyt. literatura) nowopowstające komórki zostają uwolnione od wpływu regulatorów wzrostu obecnych w tkance macierzystej w wyniku ich fizycznej izolacji, w momencie zerwania połączeń między komórkami eksplantatu i tkanek otaczających. Postuluje się [3, 17, 31], że izolacja ta jest warunkiem koniecznym na etapie poprzedzającym indukcję morfogenezy. Z drugiej strony, nawet kiedy taka izolacja występuje (jak w przypadku protoplastów mikrospor czy wolnych komórek zawie-

sin) zwykle tworzą się wielokomórkowe agregaty. Proces ten poprzedza tworzenie zarodków. Jednak powstanie skupień komórek nie zawsze poprzedza indukcję embriogenezy in vitro. Na przykład u *Datura* i *Nicotiana* zarodki tworzą się bezpośrednio z pojedynczych mikrospor; wszystkie komórki powstające w wyniku podziałów wchodzi w skład zarodka (patrz dyskusja [28]). Innym przykładem mogą być zarodki *Ranunculus sceleratus*, w których zarodki somatyczne powstają bezpośrednio z komórek epidermy i pozostają przez długi czas połączone z rośliną macierzystą (patrz prace przegląd. [17, 28, 31]).

Sugeruje się [17, 22, 28], że każda komórka uwolniona spod kontroli epigenetycznej spontanicznie wytwarza podstawowy wzór rozwoju embriogenego. Z tego punktu widzenia wysoki poziom auksyn i cytokinin, stosowanych dla indukcji podziałów komórkowych tkanek eksplantatu, stanowi jednocześnie barierę dla indukcji procesów morfogenetycznych. Nowopowstające komórki mogą być kompetentne dla tworzenia zarodków, ale niezdolne do wyrażenia tych możliwości aż do momentu, kiedy poziom endogennych hormonów ulegnie obniżeniu. Z tego punktu widzenia niehormonalne, egzogenne czynniki niezbędne w niektórych systemach in vitro odgrywają raczej rolę odżywczą, a nie formującą.

HORMONALNA REGULACJA SOMATYCZNEJ EMBRIOGENEZY IN VITRO

Somatyczna embriogeneza jest procesem zachodzącym zazwyczaj dwustopniowo, wymagającym dwu różnych pożywek. Indukcja podziałów komórek eksplantatu, odróżnicowanie i namnażanie masy kalusa odbywa się na pożywkach zawierających auksyny lub auksyny i cytokiny w stosunkowo wysokich stężeniach, zwanych pożywkami pierwotnymi lub indukującymi (przyjęte terminy angielskie to: *first medium*, *proliferative medium*, *induction medium*). Często ze względu na wyższą stabilność stosowane są syntetyczne analogi auksyn jak 2,4-D, NAA, kinetyna czy benzyloadenina. Stężenia regulatorów wzrostu, przy których uzyskiwano optymalne rezultaty, zależą zarówno od rodzaju substancji wzrostowej, jak i gatunku rośliny czy rodzaju eksplantatu.

Przegląd [8] rodzajów regulatorów wzrostu, jakie stosowano celem uzyskania somatycznych zarodków in vitro, wykazał, że w 57% przypadków pożywki pierwotne zawierały 2,4-D, w 25% NAA, natomiast inne substancje wzrostowe stosowane były znacznie rzadziej. Dla roślin zbożowych także obecność cytokinin w niskich stężeniach była niezbędna w 50% pozytywnych przypadków. Na drugim etapie 46% badanych gatunków zbóż nie wymagało żadnych regulatorów wzrostu, natomiast w 38% – konieczna była obecność IAA lub NAA w niskich stężeniach.

Problem, czy auksyny są konieczne dla inicjacji embriogenezy, został wyjaśniony przez Sharpa i wsp. [20]. Ich zdaniem auksyny są niezbędne w przypadku embriogenezy pośredniej. Natomiast w embriogenezie bezpośredniej, kiedy komórki zostały zdeterminowane w okresie poprzedzającym podziały mitotyczne in situ, tj. przed ich przeniesieniem do środowiska hodowli komórkowej, obecność auksyn nie jest konieczna lub też wymagana tylko dla zapoczątkowania podziałów komórkowych. Po inicjacji podziałów komórki te są zdolne do dalszego rozwoju i formowania zarodka. Natomiast determinacja komórek

embriogennych w procesie embriogenezy pośredniej wydaje się być możliwa jedynie w obecności auksyn i cytokinin [17, 20].

W kulturach komórek marchwi indukcja embriogenezy zachodzi jedynie w obecności auksyn, natomiast rozwój zarodków wymaga ich usunięcia z pożywki. W liniach komórkowych, w których potencjał embriogeny uległ redukcji, dodanie cytokinin często stymuluje tworzenie zarodków (patrz prace przegl. [17, 28, 31]). Jednakże rola cytokinin w somatycznej embriogenezie nie jest jednoznacznie określona. Wskazuje się, że ta grupa regulatorów wzrostu oddziałuje raczej na proces rozwoju zarodków, a zwłaszcza stymuluje przebieg późnych etapów embriogenezy, kiedy w zarodkach zachodzi organogeneza.

Sharp i wsp. [20] sugerują, że ściśle określone stężenia hormonów lub stosunek stężeń różnych hormonów odgrywają decydującą rolę w inicjacji embriogenezy. Przede wszystkim hormony mają być odpowiedzialne za inicjację podziałów komórek znajdujących się w fazie G_0 , czy też oddziaływać na główne punkty kontrolne w fazie G_0 i G_2 .

Istotny wpływ na proces różnicowania przypisuje się poprzedzającym go podziałom komórkowym [15, 31]. Chociaż nie są dokładnie określone właściwości powstających komórek, uważa się, że mogą one determinować przyszły sposób różnicowania, nawet jeśli występuje znaczny odstęp czasowy pomiędzy regulacyjnymi podziałami komórkowymi a pojawianiem się widocznych oznak różnicowania. Zakłada się, że podczas podziałów komórkowych jedna siostrzana komórka pozostaje merystematyczna, podczas gdy druga jest zdeterminowana – w określonych warunkach – do pełnienia roli embriogennej komórki macierzystej. Tak więc określone stężenia fitohormonów w pożywce spełniają – zdaniem Sharpa i wsp. [20] dwie zasadnicze funkcje: 1) determinację macierzystych, embriogennych komórek, 2) synchronizację podziałów tych komórek. Populacja komórek embriogennych pozostaje w stanie zahamowania do czasu przeniesienia na pożywki pozbawione auksyn, gdzie następuje ich dalszy rozwój.

Rola, jaką pełni 2,4-D w procesie inicjacji embriogenezy, nie jest całkowicie jasna. Sharp i wsp. [20] proponują następujące wyjaśnienie działania 2,4-D:

- 1) auksyna ta indukuje proliferację odrębnych fenotypów pewnej populacji komórek i następnie
- 2) wydłuża czas trwania cyklu komórkowego określonej populacji komórek przez oddziaływanie na punkty kontrolne cyklu komórkowego,
- 3) prowadzi do determinacji i zahamowania w fazie G_1 i G_2 lub G_0 cyklu komórkowego, odrębnej grupy komórek.

Gibereliny (GA_3) dodawane do pożywek nie wywierały zwykle stymulującego wpływu na inicjację zarodków i ich rozwój na wczesnych etapach [17]. Jednakże kultury embriogenego kalusa *Theobroma cacao* reagowały na obecność GA_3 w pożywce zintensyfikowaniem tworzenia zarodków. Maksymalną intensywność embriogenezy obserwowano przy stężeniu GA_3 $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, natomiast wyższe koncentracje gibereliny, mimo że nadal stymulowały proces embriogenezy, powodowały pojawienie się u zarodków szeregu nie-normalnych cech, takich jak np. rozwój struktur palco-podobnych w miejsce liścieni [12].

Wielokrotne pasażowanie kalusa na nowe pożywki może powodować utratę zależności od egzogennych regulatorów wzrostu [17]. Często obserwowano postępujące zmiany w wymaganiach komórek w stosunku do stężenia egzogennych auksyn. Zmiany te wraz z przedłużaniem czasu hodowli prowadziły do uniezależnienia się komórek od obecności regulatorów wzrostu w pożywkach, co zostało nazwane anergizacją (ang. *habituation*). Podobne zmiany obserwowano w odniesieniu do cytokinin (prace przegląd. [17, 28]).

Chociaż większość danych dotyczy *Nicotiana tabacum*, zjawisko to obserwowano także u innych gatunków. Na przykład kalus uzyskany z ośrodka *Citrus sinensis* [11] początkowo wymagał dla wzrostu i różnicowania embrionów obecności auksyn (IAA) i kinetyny. Jednakże wraz z przedłużaniem czasu hodowli na pożywkach o tym samym składzie następowało stopniowe obniżanie potencjału embriogenego kalusa i po 2 latach pojawiły się linie nie wymagające obecności egzogennych hormonów. W tych anergizowanych tkankach hamowanie embriogenezy następowało już pod wpływem tak niskich stężeń hormonów jak $0,001 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Z drugiej strony, traktowanie inhibitorami syntezy auksyn czy promieniami X, które obniżają poziom endogennych auksyn w komórkach, w znacznym stopniu stymulowało powstawanie embrionów [17].

Podobne obserwacje poczyniono w badaniach nad somatyczną embriogenezą in vitro u kakaowca. Po kilku latach hodowli in vitro, somatyczne zarodki uzyskane drogą embriogenezy bezpośredniej z liścieni lub hypokotyli zarodków zygotycznych (tj. zarodków wyizolowanych z owoców kakaowca) tworzyły kalus. Uzyskano 2 klony kalusa, które pasażowane na pożywki nie zawierające auksyn były zdolne do produkcji zarodków. Jednakże w tych warunkach proces embriogenezy przebiegał z niską częstotliwością, bowiem powstawało jedynie 2 lub 3 zarodki na inokulum. Natomiast niewysokie stężenia 2,4-D ($10^{-2} - 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) znacznie stymulowały ten proces. Z drugiej strony, wyższe stężenia tej syntetycznej auksyny obniżały lub całkowicie hamowały formowanie zarodków. Dodanie do pożywki $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 2,4-D + 10% mleczka kokosowego (CW) powodowało całkowite zahamowanie procesu embriogenezy [13].

Kultury in vitro stanowią zwykle mieszaninę komórek anergizowanych i nieanergizowanych. Proces anergizacji nie należy do zjawisk określonych jako "wszystko albo nic", ponieważ w tej samej kulturze występują zwykle komórki o różnym stopniu anergizacji. Ponadto, anergizacja komórek jest procesem odwracalnym, może więc następować utrata nabytych uprzednio zdolności anergizacyjnych.

Uważa się, że komórki w kulturze mogą przekazywać sobie pewne substancje. Zjawisko takie obserwowano w anergizowanych w stosunku do cytokinin kulturach tytoniu [17, 28]. Obserwowano np., że wzrost komórek parenchymy rdzenia wymagał początkowo obecności egzogennych cytokinin, jednakże z określoną częstotliwością pojawiały się komórki niezależne od obecności cytokinin w pożywce [17]. Przypuszcza się, że syntetyzowały one cytokininy w ilości umożliwiającej ich wzrost. Ponadto jest prawdopodobne, że komórki takie przesyłały te hormony do komórek sąsiednich, co powodowało rozprzestrzenianie się procesu anergizacji.

Badania kariologiczne komórek kultur anergizowanych nie wykazały istnienia zależności pomiędzy zmianami w liczbie chromosomów a zdolnością do anergizacji [17]. Analiza linii komórkowej tytoniu anergizowanej w stosunku do cytokinin wykazała, że zmiany w liczbie chromosomów nie są skorelowane ze stopniem anergizacji ani ze zdolnością komórek do powrotu do stanu normalnego, tj. nieanergizowanego.

Sugerowano, że hamujące działanie 2,4-D na embriogenezę odbywa się pośrednio poprzez produkcję etylenu [21, 27]. Wykazano, że także etophon (kwas dwuchlorofosfonowy), który uwalnia etylen z tkanek roślinnych, hamuje rozwój i dojrzewanie somatycznych zarodków, nie ogranicza natomiast wzrostu i namnażania embriogenego kalusa. Wysoka zawartość etylenu może powodować zwiększenie aktywności celulazy i pektynazy, co w konsekwencji doprowadzi do rozpadania się skupień komórek przed ich polaryzacją i rozwojem zarodków.

CZYNNIKI WARUNKUJĄCE SOMATYCZNĄ EMBRIOGENEZĘ

Warunkiem uzyskania somatycznej embriogenezy jest obok doboru eksplantatu i fitohormonów, także użycie pożywek o odpowiednim składzie. Przedstawiono 5 klas związków, których obecność jest konieczna dla indukcji i rozwoju somatycznych zarodków, u większości gatunków roślin. Są to nieorganiczne makro- i mikroelementy, źródło węgla, witaminy oraz zredukowany azot. Stosowane są też naturalne komponenty, których skład jest często nieznany; należą do nich hydrolizaty białek zwierzęcych, składniki soków i owoców, endosperma lub wyciągi z drożdży. Wśród tej grupy związków najczęściej stosowane jest mleczko kokosowe, które wywiera korzystny wpływ na indukcję i rozwój somatycznych zarodków.

Najczęściej stosowana jest pożywka Murashige i Skooga. Szczegółowe omówienie rodzaju stosowanych pożywek i roli poszczególnych składników zawierają prace przeglądowe [17, 20, 24, 29].

LITERATURA

- [1] ABE T, FUTSUHARA Y. Efficient plant regeneration by somatic embryogenesis from root callus tissue of rice. *J Plant Physiol* 1985; 121: 111–118.
- [2] BEAULIEU GC, ROGERS SO, BENDICH AJ. DNA extracted from wheat leaves is highly degraded: a possible basis for the difficulty in establishing leaf cell cultures in the *Gramineae*, 1/st Intern. Cong Plant Molec Biol Savannah GA 1985; 11 Lett 1975; 5: 325–331.
- [3] DUBOIS T, GUEDIRAM, DUBOIS J, VASSEUR J. Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium* is callose an early marker? *Ann Bot* 1990; 65: 539–545.
- [4] DUBOIS T, DUBOIS J, GUEDIRA M, VASSEUR J. Embryogénèse somatique directe sur les style de *Cichorium*: effets de la temperature et origine des embryoides. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris* 307, 669–675.
- [5] DUNCAN DR, WILLIAMS ME, ZEHR BE, WITHOLM JM. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta* 1985; 165: 322–332.
- [6] ELTJO GM, MELJER M, SIOMMONDS J. Polyamine levels in relation to growth and somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* L. *J Exp Bot* 1988; 39: 787–794.
- [7] ESAN E. A detailed study of adventive embryogenesis in the *Rutaceae*. University of California: Riverside. PhD Thesis, 1973.
- [8] EVANS DA, SHARP WR, FLICK CE. Growth and behavior of cell cultures. [w] Thorpe TA [red.] Plant tissue culture. Methods and Applications in Agriculture. New York: Academic Press, 1981, 45–113.
- [9] FAHEJ J, REED JN, READDY TL, PEACE GM. Somatic embryogenesis from three commercially important inbreds of *Zea mays*. *Plant Cell Rep* 1986; 5: 35–38.
- [10] HALPERIN W. Plant regeneration and genetic variability. [w] Vasil IK, red. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Orlando FL: Academic Press, 1986, 3, 3–47.
- [11] KOCHBA J, SPIEGEL-ROY P, SAFRAN H. Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus*. *Planta* 1972; 106: 237–242.
- [12] KONONOWICZ H, JANICK J. Response of embryogenic callus of *Theobroma cacao* L. to gibberellic acid and inhibitors of gibberellic acid synthesis. *Z Pflanzenphysiol* 1984; 113: 359–366.
- [13] KONONOWICZ H, KONONOWICZ AK, JANICK J. Asexual embryogenesis via callus of *Theobroma cacao* L. *Z Pflanzenphysiol* 1984; 113: 347–358.
- [14] LOWE KDB, TAYLOR P, PATERSON KE. Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B73. *Plant Sci* 1985; 41: 125–132.
- [15] MAHESWARAN G, WILLIAMS EG. Origin and development formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* in vitro. *Ann Bot* 1985; 56: 619–630.

- [16] RAJESEKARAN K, HEIN MB, DAVIS GC, CARNES MG, VASIL IK. Endogenous plant growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Shum. *J Plant Physiol* 1987; 130: 13–25.
- [17] RANGASWAMY NS. Somatic embryogenesis in angiosperm cell tissue and organ cultures. *Proc Indian Acad Sci (Plant Sci)* 1986; 96: 247–271.
- [18] RAJESEKARAN KMB, HEIN MB, VASIL JK. Endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of *Pennisetum purpureum* Schum; Effects of in vivo and in vitro of glyphosate, fluoridone and paclobutrazol. *Plant Physiol* 1987; 84: 47–51.
- [19] RODOJEVIC L. Tissue culture of maize *Zea mays* "Cudu" I. Somatic embryogenesis in the callus tissue. *J Plant Physiol* 1985; 119: 435–441.
- [20] SHARP WR, SENDHAL MP, CALDAS LS, MARAFFA SB. The physiology of in vitro asexual embryogenesis [w] Janick J, red. Horticultural Reviews. IV Publ. Westport. Conn. 1980, 2A: 268–310.
- [21] SONGSTAD D, DUNCAN D, WIDHOLM J. Effect of l-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. *Plant Cell Rep* 1988; 7: 263–265.
- [22] TERZI M, SUNG ZR. Somatic cell genetics of plants. *Critical Reviews in Biotechnology* 1986; 3: 303–330.
- [23] THOMAS MR, SCOTT KJ. Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus initiated from immature embryos and immature inflorescences of *Hordeum vulgare*. *J Plant Physiol* 1985; 121: 159–169.
- [24] THORPE TA. In vitro somatic embryogenesis. *ISI Atlas of Science: Animal and Plant Sciences* 1988; 81–88.
- [25] TOMES DT. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. [w] Brights SWJ, Jones MGK, red. Cereal tissue and cell culture, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publ. Dordrecht, Netherlands 1985; 175–203.
- [26] TOMES DT, SMITH OS. The effect parental genotype of initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Theor Appl Genet* 1985; 70: 505–509.
- [27] VAIN P, YEAN H, FLAMENT P. Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO₃. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1989; 18: 143–151.
- [28] VASIL IK. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *J Plant Physiol* 1987; 128: 193–218.
- [29] VASIL IK, VASIL V. Regeneration in cereal and other grass species. [w] Vasil IK, red. Cell culture and somatic cell genetics of plants, vol 3, Plant regeneration and genetic variability. Acad. Press, Orlando, 1986; 121–150.
- [30] WENZLER H, MEINS F. Mapping of the maize leaf capable of proliferation in culture. *Protoplasma* 1986; 131: 103–105.
- [31] WILLIAMS EG, MAHESWARAN G. Somatic embryogenesis: factor influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 1986; 57: 443–462.

Otrzymano: sierpień 1991 r.

Przyjęto: 6 września 1991 r.

Adres autorki: ul. Banacha 2/6, 90-237 Łódź

MOLEKULARNE I KOMÓRKOWE PODSTAWY UCZENIA U *APLYSIA CALIFORNICA*

MOLECULAR AND CELLULAR BASES OF LEARNING IN *APLYSIA CALIFORNICA*

Dorota KONOPKA

Pracownia Hodowli Komórek i Tkanek
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Streszczenie. *Aplysia californica* jest jednym z najlepiej zbadanych gatunków modelowych w badaniach procesów uczenia. U tego mięczaka spotykamy wszystkie znane z badań nad ssakami typy uczenia, zarówno niekojarzeniowego (nieasocjacyjnego) jak i kojarzeniowego (asocjacyjnego). Wiele badań przeprowadzono na odruchu cofania skrzelii do jamy płaszczowej w odpowiedzi na podrażnienie brzegu płaszczka lub syfonu. Zidentyfikowano obwód doświadczalny zaangażowany w ten odruch. Opracowano metodę odtwarzania synapsy, która in vivo przewodzi ten odruch, w warunkach hodowli in vitro. Stwierdzono, że wzmocnienie przewodzenia na synapsie wynika ze zwiększenia wydzielania neurotransmitera do szczeliny synaptycznej. Podłożem tego procesu są zmiany zachodzące w zakończeniu presynaptycznym. Dochodzi tam do krótkotrwałych zmian w przepływie prądów błonowych (zwiększenie dokomórkowego prądu wapniowego) oraz do zmian długotrwałych, opartych na syntezie nowych białek. Ponadto dla pojawienia się zmian trwających dłużej niż kilka godzin konieczna jest aktywność czynnika transkrypcyjnego CREB (białka łączącego się z sekwencją enhancerową regulowaną przez poziom CAMP).

Słowa kluczowe: pamięć, przyzwyczajanie, torowanie, ułatwienie presynaptyczne, kinaza A, fosforylacja.

Summary. *Aplysia californica* is one of the most widely used model systems to study molecular mechanisms of learning. All types of learning, both nonassociative and associative, known from investigation in higher mammals, have been identified in this mollusk. Especially the gill withdrawal reflex have been successfully investigated. The neuronal circuit involved in this reflex have been identified. The technique of cultivating in vitro sensory – motor synapse have been developed. Elevation of synaptic transmission arised from elevation in neurotransmitter released to the synaptic cleft. Changes evaluated in the presynaptic element are the bases of this elevation. During induction of short-lasting changes there are changes in transmembranes currents (especially K^+ and Ca^{2+} currents), while long-lasting changes require mediated via cAMP-dependent, protein kinase A protein biosynthesis. Finally, activation of cAMP dependent transcription factor – CREB (protein which binds to the enhancer element regulated through cAMP) is also necessary for the long lasting changes.

Key words: memory, habituation, sensitization, presynaptic facilitation, kinase A, phosphorylation.

Jest wiele rodzajów pamięci (pamięć przestrzenna, pamięć wydarzeń) i nie wiadomo, czy są one takie same u człowieka i innych zwierząt. Wiadomo natomiast, że zachowanie każdego zwierzęcia zmienia się pod wpływem bodźców płynących ze środowiska i że zmiany te mogą być trwałe. Stąd można określić uczenie się jako zdolność do zdobywania nowej wiedzy o środowisku, a pamięć jako zdolność jej przechowywania [22].

Przyjmuje się, że pamięć jest kodowana przez sieci neuronalne. W toku uczenia modyfikowana jest synapsa pomiędzy konkretnymi neuronami. Ulega ona wzmocnieniu – to znaczy ułatwione jest przekazywanie (transmisja) pomiędzy tymi neuronami, lub osłabieniu wtedy, kiedy przekazywanie jest hamowane [6].

Niezależnie od tego, z jaką pamięcią mamy do czynienia i jaki jest mechanizm jej powstawania, ze względu na czas trwania możemy wyróżnić pamięć krótkotrwałą (*short-term memory* – STM) i długotrwałą (*long-term memory* – LTM) [11]. Opisano je na podstawie przebiegu krzywej zapominania. W ciągu pierwszych kilku minut po wyuczeniu jakiegoś testu poziom wykonania wynosi ok. 100% (pamięć krótkotrwała), a następnie gwałtownie spada do mniej więcej 30% i na tym poziomie utrzymuje się przez długi czas (pamięć długotrwała) [17]. Okazało się później, że te dwa rodzaje pamięci można odróżnić farmakologicznie (tab. 1).

Jednym z modelowych gatunków stosowanych do badań nad komórkową naturą uczenia jest *Aplysia californica* (zając morski), ślimak z podtypu tyłoskrzelnych. Został on dokładnie przebadany przez Erica Kandela i jego zespół [16]. Aż do niedawna uważano, że bezkręgowce nie są w stanie się uczyć, a wykazują jedynie genetycznie zaprogramowane odruchy proste. Jednakże nie ma obecnie wątpliwości, że zwłaszcza u owadów i ślimaków (wyższe bezkręgowce) mamy do czynienia z zachowaniami plastycznymi, podatnymi na zmiany w wyniku działania czynników środowiska. Bardzo dobrze przebadano odruch cofania miękkich organów zewnętrznych (głowa, ogon, skrzel) do jamy płaszczowej w odpowiedzi na działanie potencjalnie szkodliwych czynników środowiska. Odruch ten jest częścią ogólnego zachowania obronnego, porównywalnego z reakcją ucieczki (*defensive escape*) u kręgowców. Ma duże znaczenie biologiczne – chroni podatne na uszkodzenia części ciała zwierzęcia przed urazami. Odruchy te mają jeszcze jedną, istotną z punktu widzenia badaczy zaletę – są przeprowadzone przez krótkie nieskomplikowane sieci neuronalne.

ODRUCHY BADANE U *APLYSIA CALIFORNICA* (tab. 2)

UCZENIE NIEASOCJACYJNE (*NONASSOCIATIVE LEARNING*) – CZYLI PROSTE ZAPAMIĘTYWANIE

Zwierzę uczy się znaczenia pojedynczego bodźca; uzyskuje informację o jego poziomie poprzez przyporządkowanie go do klasy wcześniej zapamiętanych podobnych bodźców.

PRZYWYKANIE (HABITUACJA) ZMNIJSZENIE ODPOWIEDZI NA BODZIEC

Jest to najprostsza forma uczenia nieasocjacyjnego. Została opisana przez Thompsona i Spencera dla ssaków [24]. Charakteryzują ją:

- obniżenie amplitudy odpowiedzi w wyniku działania bodźca,

- spontaniczny powrót normalnej odpowiedzi po zaprzestaniu prezentacji,
- habituowany odruch podlega odwracalnej dyshabituacji,
- przywykanie jest większe przy krótkich przerwach pomiędzy bodźcami niż przy dłuższych,
- przywykanie jest większe w stosunku do słabszych bodźców.

Te cechy spełnia również habituacja odruchu cofania skrzeli u *Aplysia* [24]. Schemat reakcji habituacji pokazano na rysunku 1. Słaby bodziec dotykowy podawany jest do pola receptywnego odruchu (w tym przypadku brzegu płaszczka lub syfonu), na co zwierzę odpowiada cofnięciem narządu efektorowego (skrzeli). Czas trwania i wielkość skurczu określa się za pomocą fotokomórki zamontowanej pod skrzelem. Odpowiedź określa się jako wielkość skurczu lub wielkość postsynaptycznego potencjału pobudzającego (*postsynaptic excitatory potential* – EPSP) w komórce postsynaptycznej.

Można wywołać przywykanie krótko- i długotrwałe w zależności od wzorca prezentacji bodźca.

TABELA 1. Rodzaje pamięci

Rodzaj pamięci	Czas trwania	Obserwowane zmiany
Pamięć krótkotrwała	Kilka minut	Chwilowa zmiana w przepływie prądów błonowych
Pamięć średniotrwała	Kilka godzin	Fosforylacja wcześniej istniejących białek
Pamięć długotrwała	Dni i lata	Synteza nowych białek

TABELA 2. Odruchy badane u *Aplysia californica*

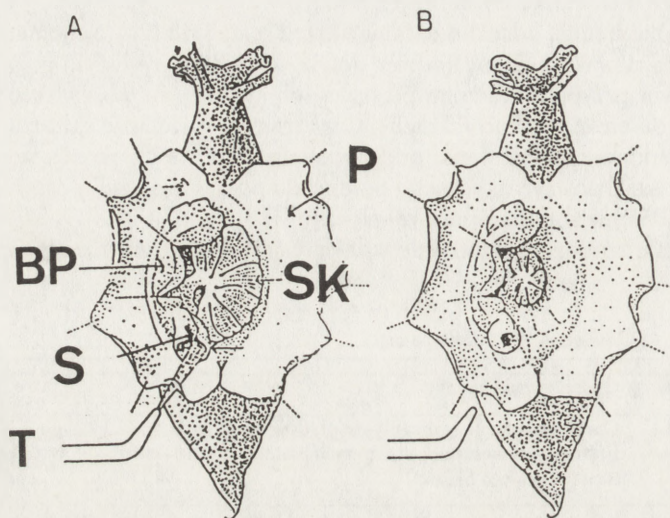
Uczenie niekojarzeniowe (nieasocjacyjne)		kojarzeniowe (asocjacyjne)	
przywykanie (habituacja)	torowanie (sensytyzacja)	warunkowanie klasyczne	warunkowanie instrumentalne
krótkotrwałe	krótkotrwałe	krótkotrwałe	krótkotrwałe
długotrwałe	długotrwałe	długotrwałe	długotrwałe
		różnicujące	

TOROWANIE (SENSYTYZACJA) – ZWIĘKSZENIE ODPOWIEDZI NA BODZIEC

Jest to elementarna forma uczenia nieasocjacyjnego, podczas której zwierzę uczy się wzmacniać swoje odruchy i odpowiadać silniej na różne, uprzednio neutralne lub obojętne bodźce po jednorazowym nawet podaniu silnego bodźca bezwarunkowego. Nie jest to po prostu usunięcie wcześniej istniejącego przywykania, gdyż w przeciwieństwie do niego torowanie jest uogólnionym pobudzeniem, a przywykaniu podlega tylko jeden odruch [16, 20]. Dodatkowo u *Aplysia* obie te formy uczenia rozwijają się w ontogenezie *Aplysia* obie te formy uczenia rozwijają się w ontogenezie niezależnie, według innego wzoru czasowego [25, 26], co podkreśla ich odrębny charakter. Opis torowania można przedstawić na podstawie rysunku 1.

Torowanie odruchu cofania skrzeli u *Aplysia* polega na zwiększeniu odpowiedzi na słaby bodziec podawany do pola receptywnego po podawaniu w dowolną część ciała silnego bodźca awersyjnego (szok elektryczny). Odpowiedź mierzona jest jako czas trwania

i wielkość skurczu skrzeli oraz jako poziom EPSP (pobudzającego potencjału postsynaptycznego) wywołanego w komórce postsynaptycznej. Trening torujący może dawać początek pamięci krótko- i długotrwałej, w zależności od liczby ekspozycji na bodziec bezwarunkowy i liczby powtórzeń całych sesji [17].



Rys. 1. Badanie odruchu cofania skrzeli do jamy płaszczowej; ślimak *Aplysia californica* (zając moriski): przypięte parapodia (P) odsłaniają wnętrze jamy płaszczowej: A – zwierzę niestymulowane z skurczonym skrzelom (S) i syfonem (SF); B – zwierzę po podaniu bodźca do pola receptywnego (brzeg płaszcza BP) ze skurczonym skrzelom i syfonem; czas trwania skurczu określa zamontowana pod skrzelom fotokomórka; bodźce są podawane w postaci pulsów wody z tryskawki (T)

UCZENIE ASOCJACYJNE (*ASSOCIATIVE LEARNING*)

Zwierzę uczy się związków przyczynowo-skutkowych istniejących w otoczeniu.

WARUNKOWANIE KLASYCZNE (*CLASSICAL CONDITIONING - CC*).

Zwierzę uczy się nowego znaczenia tego, co było do tej pory bodźcem obojętnym lub nieszkodliwym w wyniku skojarzenia czasowego tego bodźca z silnym bodźcem bezwarunkowym. Zwierzę nabywa w ten sposób wiedzę o związkach przyczynowych w otoczeniu [6, 22]. Bodziec warunkowy (*conditioned stimulus - CS*) uzyskuje dodatkowe znaczenie przez to, że jest zapowiedzią następującego po nim bodźca bezwarunkowego (*unconditioned stimulus - UC*).

Od torowania warunkowanie klasyczne (CC) różni się tym, że:

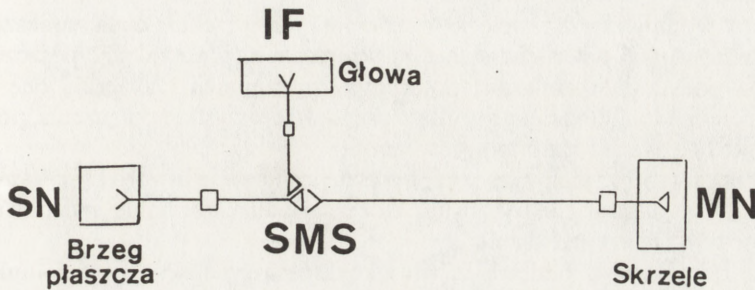
- w CC wzmocnienie ograniczone jest tylko do jednej drogi neuronalnej,
- w CC konieczny jest określony związek czasowy pomiędzy prezentacją bodźców.

Jeżeli: US wyprzedza CS, czas pomiędzy prezentacją jest zbyt duży albo zbyt mały, to warunkowanie klasyczne nie zachodzi [22].

W wyniku dobrania odpowiednich parametrów treningu można wywołać u zwierzęcia CC krótko- i długotrwałe.

U *Aplysia* odruch cofania skrzeli można także poddawać warunkowaniu klasycznemu, a nawet, dzięki temu że są dwa niezależne pola receptywne dla tego odruchu (brzeg

płatcza i syfon), poddawać warunkowaniu różnicującemu [22]. Schemat doświadczenia przedstawia rysunek 1.



Rys. 2. Schemat obwodu neuronalnego zaangażowanego w badany odruch cofania skrzeli u *Aplysia californica*; neurony czuciowe (SN), które unerwiają pole receptywne odruchu – w tym przypadku brzeg płatcza – łączy się bezpośrednio z neuronem ruchowym (MN), który unerwia efektor – skrzela; utworzona przez te neurony synapsa czuciowo-ruchowa (SMS) jest modyfikowana przez wstawkowy neuron ułatwiający (IF), który wydziela serotoninę

Bodziec warunkowy (lekkie dotknięcie) jest podawany do pola receptywnego, a silny bodziec bezwarunkowy (szok elektryczny) do innej części ciała zwierzęcia – głowa, ogon [16, 22]. Wielkość reakcji określa się na podstawie czasu trwania i wielkości skurczu skrzeli oraz jako wielkości EPSP.

KOMÓRKOWE PODŁOŻE UCZENIA U *APLYSIA CALIFORNICA*

Kolejnym etapem badań zjawisk, które leżą u podłoża pamięci była identyfikacja sieci neuronalnych odpowiedzialnych za określone zahamowanie. Znanych jest już większość komórek zaangażowanych w odruch cofania skrzeli do jamy płaszczowej [16].

OBWÓD NEURONALNY ZAANGAŻOWANY W ODRUCH COFANIA SKRZELI U *APLYSIA*

W omawianych powyżej odruchach pobudzenie odbierane jest z pola receptywnego – w tym przypadku – brzegu płatcza i syfonu. Zidentyfikowano 2 populacje neuronów czuciowych (*sensory neuron* – SN), każda złożona z 24 komórek. Tworzą one skupienia w zwoju nerwowym brzuszny (*abdominal ganglion*). Neurony jednego z nich (*the left E cluster*) odbierają pobudzenie ze skóry syfonu, neurony drugiego (*the right E cluster*) z brzegu płatcza. Tworzą one połączenia z neuronami ruchowymi (*motoneuron* – MN), czyli synapsy czuciowo-ruchowe (*sensomotoryczne*). Neurony ruchowe unerwiają bezpośred-

rednio mięśnie odpowiedzialne za skurcz. Znanych jest jak dotąd 6 MN dla skrzel. Ciała ich leżą również w zwoju brzuszny. Synapsa czuciowo-ruchowa jest modyfikowana przez torujące neurony wstawkowe (*facilitatory interneurons* – FI) [16, 22]. Rysunek 2 przedstawia schematycznie połączenia neuronalne zaangażowane w odruch cofania skrzel.

Dalej upraszczano układ doświadczalny, tak aby wyeliminować wszelkie pobudzenia wynikające ze spontanicznej aktywności neuronów i przypadkowych pobudzeń. Ponieważ ciała wszystkich neuronów zaangażowanych w ten odruch leżą w zwoju nerwowym brzuszny, izolowano go:

- najpierw wyjmując przez nacięcie w skórze na powierzchnię ciała; umieszczano go na jasnym rusztowaniu i unieruchamiano, co pozwalało na identyfikację poszczególnych neuronów na podstawie rozmiarów, położenia i pigmentacji (zawierają one barwnik zbliżony do hemoglobiny); odcinano w takim preparacie wszystkie połączenia, poza żądanymi [31]; są to tak zwane *semi-intact preparation*;

- potem hodowano wyizolowany zwoj brzuszny całkowicie *in vitro* [16]; stymuluje się takie preparaty impulsami elektrycznymi, które naśladują normalne wyładowania, lub podając do pożywki neuroprzebieżnik.

Udało się odtworzyć w hodowli *in vitro* konkretną synapsę o znanej funkcji [41]. Zidentyfikowane neurony ze zwoju brzuszego przenosi się do pożywki zawierającej hemolimfę *Aplysia*. Najczęściej odtwarza się synapsę pomiędzy (jednym lub więcej) neuronem czuciowym LE i ruchowym L7 (*major gill motor cell*), niekiedy razem z neuronem pośredniczącym, zwykle MCC (*metacerebral cell*). Po około 5 dniach hodowli neurony tworzą sieć połączeń i odtwarza się synapsa czuciowo-ruchowa.

ZMIANY W WYDZIELANIU NEUROPRZEKAŹNIKA NA SYNAPSIE CZUCIOWO-RUCHOWEJ

Mając tak uproszczony model doświadczalny można szczegółowo badać zmiany wywołane w komórce przez pobudzenie wywołane podawaniem określonego neurotransmitera lub stymulacją elektryczną.

Zmiany, które leżą u podstaw tak przywykania jak i torowania, związane są ze zmianą ilości neuroprzebieżnika uwalnianego do szczeliny synaptycznej na określonej synapsie czuciowo-ruchowej [16, 24]. W procesie przywykania dochodzi do funkcjonalnego osłabienia aktywności synapsy czuciowo-ruchowej. Jest to proces hamowania homosynaptycznego (*homosynaptic depression*). Badania Castellucci'ego i Kandela [22] wykazały, że przyczyną osłabienia przewodnictwa nie jest zmniejszenie wrażliwości receptorów na błonie postsynaptycznej, ale uwalnianie mniejszej liczby pęcherzyków zawierających neuroprzebieżnik.

W procesach torowania synapsa czuciowo-ruchowa jest modyfikowana przez wstawkowy neuron torujący. W związku z tym dochodzi do zwiększenia wydzielania neuroprzebieżnika na synapsie czuciowo-ruchowej; po zadziałaniu bodźca o tej samej sile na neuron czuciowy obserwujemy większy skurcz (silniejsze pobudzenie neuronu ruchowego). Proces ten nosi nazwę ułatwienia presynaptycznego (*presynaptic facilitation*) [22].

Jedną z cech, która odróżnia krótkotrwałe warunkowanie klasyczne od krótkotrwałego torowania, jest to, że zwiększenie przewodnictwa spowodowane warunkowaniem jest większe, w wyniku bezpośredniego związku czasowego obu bodźców. Jest to zależne od aktywacji zwiększenia ułatwienia presynaptycznego (*activity dependent amplification of presynaptic facilitation*) [22]. W warunkowaniu klasycznym następuje pobudzenie drogi

warunkowej i wkrótce potem bezwarunkowej. Ponieważ CS poprzedza US, neuron sensoryczny na skrzyżowaniu obu dróg jest wprawiany w aktywność tuż przed tym, jak osiągnie go pobudzenie bezwarunkowe. US powoduje zasadniczo większe pobudzenie, gdy wyładowuje się na neuronie już częściowo pobudzonym, niż wtedy gdy natrafia na neuron o potencjale spoczynkowym. Zatem przynajmniej pewne aspekty CC mają miejsce w obrębie neuronu sensorycznego.

MOLEKULARNE PODŁOŻE PAMIĘCI

Jak wspomniano, pamięć można podzielić ze względu na czas trwania na krótko- i długotrwałą. Badania farmakologiczne i behawioralne wskazują na istnienie jeszcze co najmniej jednej fazy – pamięci średniotrwałej, trwającej od kilku do kilkunastu godzin po treningu. Wszystkie te rodzaje pamięci mają różne mechanizmy komórkowe i dlatego będą je omawiać oddzielnie.

PAMIĘĆ KRÓTKOTRWAŁA

Krótkotrwałe zmiany w ilości wydzielanego neuroprzekaźnika są spowodowane zwiększeniem przekazywalności na synapsie czuciowo-ruchowej i nie są zależne od syntezy białek. Bodziec torujący, który aktywuje neuron pośredniczący, powoduje, że na synapsie pomiędzy nim a zakończeniem presynaptycznym synapsy czuciowo-ruchowej dochodzi do uwolnienia neuroprzekaźnika pobudzającego. U *Aplysia* poznano do tej pory trzy rodzaje torujących neuronów wstawkowych różniących się rodzajem wydzielanego neurotransmitera [16, 22]:

- uwalniających r-HT (serotoninę),
- uwalniających SCP (*small cardiac peptide*) a i b,
- komórkę L29, która wydziela niezidentyfikowany dotąd przekaźnik; jest on składowany w pęcherzykach podobnych do serotonergicznym.

Ponadto w tej komórce występuje wysoce specyficzny system pobierania serotoniny (*high-affinity uptake system*) [22]. Wszystkie te neuroprzekaźniki pobudzające działają na zakończenie presynaptyczne synapsy czuciowo-ruchowej. Łączą się ze swoistymi receptormi błonowymi i poprzez białko G [8] pobudzają cyklazę adenylanową [22]. Powoduje to przejściowy wzrost poziomu cAMP w zakończeniach sensorycznych [16]. Dowodem na to są doświadczenia przeprowadzone na izolowanych zwojach brzusznych, stymulowanych serotoniną. Po silnej stymulacji w zidentyfikowanych neuronach dochodziło do kilkukrotnego wzrostu poziomu cAMP [16]. Co więcej, zastosowano także zdolny do przenikania przez błonę komórkową analog cAMP – dimaślan-cAMP [16] i iniekcję oczyszczonego cAMP do ciała komórki sensorycznej [7]. Za każdym razem wynik był taki sam – zwiększenie przewodnictwa na synapsie czuciowo-ruchowej mierzone jako zmiana EPSP w neuronie ruchowym. Efekt ten jest farmakologicznie specyficzny – nie wywołują go inne cykliczne nukleotydy. Podobne rezultaty daje inkubacja izolowanego zwoju brzuszego z IBMX (isobutylo-metylsantyna), specyficznym inhibitorem fosfodiesteraz, który powoduje wzrost endogennego poziomu cAMP [16].

Przyjmuje się, że efekty cAMP w komórkach eukariotycznych zachodzą poprzez fosforylację reszt serynowych i treoninowych w specyficznych produktach białkowych [23]. Cykliczne AMP powoduje aktywację cAMP-zależnej kinazy białkowej. Nieaktywna kinaza A jest heterodimerem złożonym z 2 podjednostek katalitycznych i 2 regulatorowych. Podjednostka regulatorowa może łączyć się z cAMP, co powoduje dysocjację kompleksu i uwolnienie podjednostki katalitycznej, która przeprowadza fosforylację [23]. Klein i Kandel [16] sugerowali, że stymulowany przez 5-HT wzrost poziomu cAMP powoduje aktywację zależnej od cAMP kinazy białkowej (kinaza A). Zgodnie z tym przypuszczeniem obserwowano wzrost fosforylacji określonych białek w komórce presynaptycznej po podaniu 5-HT do odtworzonej *in vitro* synapsy czuciowo-ruchowej [32]. Nie stwierdzono, aby w wyniku stymulacji zmniejszał się poziom ufosforylowania jakiegokolwiek białka. Fosforylacja ta jest przejściowa, po 24 godzinach już się jej nie wykrywa.

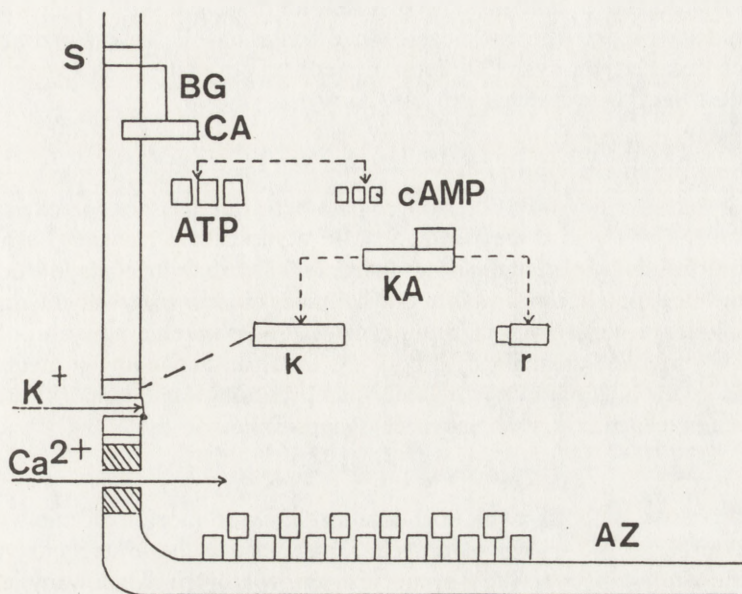
W jaki sposób wiąże się wzrost fosforylacji określonych białek ze wzrostem wydzielania neuroprzekaźnika na synapsie czuciowo-ruchowej? Czynnikiem niezbędnym przy wydzielaniu neurotransmitera są jony wapnia, które napływają do zakończenia presynaptycznego [1]. Wzrost wydzielania może być uwarunkowany zwiększonym napływem wapnia. W normalnych warunkach, podczas repolaryzacji dokomórkowy prąd wapniowy jest maskowany przez odkomórkowy prąd potasowy [16].

Badano zmiany w wielkości obu prądów wywołane przez podanie oczyszczonej podjednostki katalitycznej do komórek w izolowanych zwojach brzusznych. Stwierdzono, że znacznie zwiększa się napływ wapnia do zakończenia nerwowego. Dzięki dokładnej analizie ustalono, że kinaza A nie działa bezpośrednio na dokomórkowy prąd wapniowy, ale modyfikuje właściwości nieznaną dotąd klasy kanałów potasowych [16]. Ponieważ kanały te są modulowane przez serotoninę, nazwano je $I_{k+(s)}$ [16]. W przeciwieństwie do pozostałych klas kanałów potasowych jest on aktywowany na poziomie spoczynkowym, jest duży w czasie szczytu potencjału czynnościowego, nie jest szybki, nie zależy od napływu jonów Ca^{2+} , nie jest blokowany przez jony Ba^{2+} [16, 22]. Serotonina nie zmienia ani poziomu przewodzenia przez ten kanał, ani jego selektywności dla jonów potasu, a jedynie zmniejsza prawdopodobieństwo jego otwarcia [31].

Zamknięcie kanału typu S powoduje zwolnienie repolaryzacji, wydłużenie czasu trwania potencjału czynnościowego, w związku z czym dłużej pozostają otwarte zależne od napięcia kanały wapniowe i więcej wapnia napływa do komórki [7]. Efekt serotoniny naśladuje podanie do neuronu presynaptycznego TEA (tetraetyloamonu), który blokuje późne prądy potasowe (*delayed potassium current*) [16]. Postuluje się, że zamknięcie kanału potasowego typu S spowodowane jest przeprowadzaną przez podjednostkę regulatorową kinazy A fosforylacją białka tego kanału lub jego białka regulatorowego [16, 22].

Rysunek 3 obrazuje postulowany wyżej mechanizm zmian w zakończeniu presynaptycznym, w których wyniku po standardowym pobudzeniu wydzielane jest więcej neurotransmitera.

W krótkotrwale zwiększenie przekazywania synaptycznego jest być może włączony drugi system przekaźników II rzędu. Podanie estrów forbolu do pierwotnej hodowli tkankowej z odtworzoną synapsą czuciowo-ruchową z neuronem wstawkowym powoduje zwiększenie przewodnictwa, nawet jeżeli synapsa była wcześniej poddana hamowaniu. Towarzyszy temu przemieszczenie kinazy C z frakcji cytozolowej do błony komórkowej [5, 29]. Zidentyfikowano dwa białka, których poziom fosforylacji jest zależny od serotoniny oraz jest regulowany przez kinazę A i C [32].



Rys. 3. Schemat zmian wywołanych w zakończeniu presynaptycznym synapsy czuciowo-ruchowej w procesie torowania: S – związanie serotoniny z receptorem błonowym, BG – aktywacja białka G [8], CA – pobudzenie cykazy adenylationowej – wzrasta poziom cAMP w zakończeniu nerwowym, KA – aktywacja cAMP zależnej kinazy białkowej A ; uwolnienie podjednostki katalitycznej (k) i regulatorowej (r), K⁺ – przeprowadzana przez podjednostkę katalityczną kinazy A fosforylacja białka kanału potasowego typu S (bezpośrednio lub poprzez białko regulatorowe powoduje jego zamknięcie); wolniejsza jest repolaryzacja potencjału czynnościowego, Ca²⁺ – dłużej pozostają otwarte zależne od potencjału błonowego kanały wapniowe (Ca²⁺), dzięki czemu do zakończenia presynaptycznego napływa więcej jonów wapnia, AZ – umożliwia to wydzielenie większej ilości neuroprzekaźnika magazynowanego w obszarze strefy aktywnej zakończenia presynaptycznego

PAMIĘĆ ŚREDNIOTRWAŁA (*INTERMEDIATE MEMORY*)

Badania behawioralne i neurofizjologiczne sugerują, że pamięć krótkotrwała i długotrwała mają miejsce w tym samym locus [16]; wydaje się, że przejście pomiędzy oboma tymi procesami ma charakter ciągły.

Pamięć krótkotrwała opiera się na chwilowej zmianie poziomu cAMP i nieco dłużej trwającej zmianie w prądach dokomórkowych, podczas gdy do konsolidacji śladu pamięciowego potrzeba zmiany w ekspresji genów komórkowych. Ich produkty białkowe są syntetyzowane w cytoplazmie komórki i konieczny jest czas, aby zostały przetransportowane do właściwego miejsca wzmocnienia zakończenia nerwowego [15]. Jaki mechanizm może zapewniać wzmożone uwalnianie neurotransmitera, zanim nowe produkty białkowe osiągną swoje miejsce docelowe, gdzie zaczną wywierać swoje działanie? Przypuszcza się, że jest to spowodowane potranslacyjną modyfikacją wcześniej istniejących białek (*covalent modification of pre-existing proteins*), a najprawdopodobniej – fosforylacją. Tak zmodyfi-

kowane białka wykonują swoje funkcje dopóty, dopóki fosfatazy nie odszczepią reszt fosforowych. Część takich zaktywowanych białek może przenosić do jądra informację dotyczącą zmiany w ekspresji genów, a część może działać na miejscu, np. przez zamykanie odpowiednich kanałów jonowych [30]. Jednak jak do tej pory nie ma zbyt wiele dowodów na to, że postulowany wyżej mechanizm jest słuszny.

PAMIĘĆ DŁUGOTRWAŁA (LONG-TERM MEMORY)

Poddając zwierzę treningowi o określonych parametrach (zwłaszcza przez powtarzanie ekspozycji) można wywołać u niego długotrwałe wzmocnienie transmisji synaptycznej spowodowane trwałym zwiększeniem ilości neuroprzekaźnika wydzielanego w odpowiedzi na pobudzenie. Jest ono spowodowane: przynajmniej częściowo, trwałymi zmianami w morfologii zakończeń nerwowych neuronu czuciowego (tworzenie nowych połączeń synaptycznych w obrębie wzmacnianej drogi) [9], trwałymi zmianami w mechanizmach komórkowych kontrolujących to wydzielanie (przeprogramowanie komórki prowadzące do zwiększenia przekazywania na pojedynczej synapsie).

ZMIANY MORFOLOGICZNE

Podczas procesów długotrwałych dochodzi u *Aplysia* do morfologicznie wyrażonych zmian w strukturze zakończeń synaptycznych. Zmienia się wielkość strefy aktywnej oraz liczba i rozmieszczenie pęcherzyków synaptycznych, w których składowany jest neurotransmitter. Zmiany te mogą reprezentować anatomiczny substrat konsolidacji śladu pamięciowego [2].

Ostatnio pojawiły się doniesienia, że cAMP indukuje zależne od fosforylacji zmiany w morfologii stożków wzrostu neuronów (*neuronal growth cones*). Prawdopodobnie warunkują one różnicowanie się stożków (wzrost, zmiana struktury), które towarzyszy wzrostowi neurosekrecji [12]. Można sądzić, że podczas torowania ilość wydzielanego neuroprzekaźnika zwiększa się w wyniku tworzenia nowych miejsc uwalniania neuroprzekaźnika i przebudowy morfologicznej zakończenia nerwowego przystosowującej go do podwyższonej aktywności wydzielniczej.

W odtworzonej *in vitro* synapsie czuciowo-ruchowej L7/LE wywoływano długoterminowe zmiany przez podawanie stymulacji naśladującej normalne uczenie. Stwierdzono, że zmiany strukturalne zależą od wzajemnego oddziaływania neuronu presynaptycznego z odpowiednią komórką postsynaptyczną [13, 14].

PROCESY PRZEPROGRAMOWANIA KOMÓRKI

Pamięć długotrwałą można zablokować przez podawanie zwierzętom inhibitorów syntezy mRNA i białek. Ślad pamięciowy jest wrażliwy na zniszczenie przez te związki, gdy są one podawane podczas treningu lub tuż zaraz po nim [3, 21].

Do hodowanych *in vitro* neuronów dodawano inhibitory polimeraz RNA (aktynowinę D, w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$), polimerazy RNA II (α -amanitynę, w stężeniu 2 $\mu\text{g/ml}$) lub inhibitory translacji (anizomycynę, w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$, emetynę w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$). Związki te przejściowo hamują syntezę białek; po wypłukaniu z pożywki w ciągu 2–4 godzin komórka podejmuje na nowo swoje funkcje. Komórki stymulowano, podając w określony sposób, naśladujący naturalne pobudzenie 5-HT oraz w różnych punktach czasowych, odpowiednie inhibitory. Podanie inhibitorów przed, równocześnie lub po neuroprzekaź-

niku nie upośledzało w żadnym stopniu procesów STM. Przy indukcji LTM podanie inhibitorów na 12 godzin przed i w 4 godziny po 5-HT nie zaburzało tworzenia LTM. Jedynie punkt 0,5 godziny po indukcji jest wrażliwy na zaburzenia. Podanie inhibitora przez cały okres po zaindukowaniu neuroprzekaznikiem (od 2 godzin) nie wpływało na konsolidację śladu pamięciowego [32]. Można zatem wysnuć wniosek, że istnieje charakterystyczne okienko czasowe, w ciągu którego konieczna jest synteza nowych białek [21]. Obejmuje czas od ok. 0,5 do 2 godzin po stymulacji. Nowe białka potrzebne są prawdopodobnie w procesach konsolidacji śladu pamięciowego.

Krótkotrwałe zmiany w ilości wydzielanego neurotransmitera są spowodowane przejściową, cAMP-zależną modulacją funkcji kanałów jonowych. Natomiast w komórkach poddanych stymulacji wywołującej długotrwałe wzmocnienie przewodnictwa cAMP pozostaje na takim samym poziomie jak w komórkach niestymulowanych. Wzrost aktywności kinazy A jest spowodowany trwałą zmianą jej właściwości i wymaga syntezy nowych białek [4]. Greenberg i wsp. [15, 20, 30] stwierdzili, że w wyniku zmiany wzajemnego stosunku podjednostek kinazy A enzym ten jest aktywowany przy niższych niż normalnie (podprogowych) stężeniach cAMP. Po indukcji poziom podjednostki katalitycznej nie zmienia się, natomiast poziom podjednostki regulatorowej maleje (raczej na skutek szybszej degradacji niż zwiększonej syntezy) [28]. Konsolidacji śladu pamięciowego towarzyszy stały wzrost przewodzonej przez cAMP fosforylacji pewnych białek. Są to te same białka, które podlegają przejściowej fosforylacji po indukcji zmian średnio- i krótkotrwałych. Jednym z nich jest aktyna [32].

Niewiele wiadomo o genach efektorowych aktywowanych w procesach zmian długotrwałych. W komórkach eukariotycznych kinaza A wywiera wpływ na ekspresję genów poprzez fosforylację białek jądrowych – tzw. czynników transkrypcyjnych. Łączą się one ze specjalnymi sekwencjami w promotorach genów elementami indukowanymi przez cAMP (CRE – *cAMP responsive element*), pobudzając lub hamując transkrypcję. W układzie nerwowym u *Aplysia* są takie białka (tzw. *CREBP-like proteins*). Podanie do komórek dużej liczby fragmentów DNA zawierających sekwencję CRE poprzez iniekcję do jąder hodowli komórkowej *in vitro* blokuje powstawanie długotrwałego wzmocnienia przewodnictwa synaptycznego [10]. Tłumaczy się to w ten sposób, że nadmiar oligonukleotydu wiąże obecne w jądrze czynniki reagujące z tą sekwencją, która normalnie występuje tylko w odcinkach regulatorowych pewnych genów.

UWAGI KOŃCOWE

Na koniec pozostaje do przedyskutowania problem, czy uzyskane w badaniach na *Aplysia* wyniki znajdują potwierdzenie w badaniach nad uczeniem się i pamięcią u wyższych zwierząt. Szeroko rozpowszechnionym modelem uczenia u kręgowców jest zjawisko długotrwałego wzmocnienia przewodnictwa synaptycznego (*long-term potentiation* – LTP). Zjawisko to jest szczególnie wygodne do badań mechanizmów komórkowych zmian długotrwałych, a to dzięki temu, że można je wywołać na skrawkach mózgu hodowanych *in vitro*, co bardzo upraszcza model doświadczalny. Z badań wynika, że kluczową rolę w procesach plastyczności ma kinaza C w zakończeniach postsynaptycznych [18, 19]. Stoi to w pewnej sprzeczności z modelem Kandela, gdzie fosforylacja w odpowiedzi na pobu-

dzenie przeprowadzana jest głównie przez kinazę A. Dodatkowo rolę kinazy C potwierdzają badania nad *Drosophila melanogaster*, u której udało się uzyskać mutanty upośledzone pod względem zdolności uczenia się. Muchy te miały mutację turnip w genie na kinazę C [33], w wyniku czego produkowały nieaktywny enzym. Tym niemniej inny szczep *Drosophila* ma mutację w genie na kinazę A i również jest upośledzony pod względem uczenia się.

Być może wyniki te nie do końca się wykluczają. Jak już wcześniej wspomniano, u podstaw różnych rodzajów pamięci mogą leżeć różne mechanizmy. Odruch cofania skrzeli należałoby raczej porównać z odruchami rdzeniowymi kręgowców, a nie z mechanizmami działającymi w korze asocjacyjnej [34]. Należałoby także ustalić, w jakim stopniu podawanie do pożywki neuroprzekaznika naśladuje naturalną stymulację. I wreszcie ostatnie doniesienia sugerują, że po pobudzeniu receptorów błonowych przez neuroprzekaznik może dochodzić do pobudzenia kilku dróg przekazników II rzędu, z których dotychczas skupiano się na jednej. Aczkolwiek wyniki grupy Kandela są bardzo atrakcyjne i spójne, trzeba pamiętać o poczynionym przez nich założeniu. Gdy mówi on w swoich pracach, że zablokowanie syntezy białka blokuje również procesy tworzenia długotrwałych śladów pamięciowych, należy przez to rozumieć, że nie dochodzi do wytworzenia długotrwałego zwiększenia EPSP w komórce postsynaptycznej w hodowli neuronalnej. Pamięć jest zapewne zjawiskiem znacznie bardziej złożonym i nie można w sposób prosty ekstrapolować wyników z pojedynczych komórek na cały organizm.

PODZIĘKOWANIE

Bardzo dziękuję doc. dr hab. Leszkowi Kaczmarkowi za pomoc i cenne uwagi, którym służył mi podczas przygotowywania tej pracy.

LITERATURA

- [1] AUGUSTINE GJ, CHARLTON MP, SMITH SJ. Calcium action in synaptic transmitter release. *Ann Rev Neurosci* 1987; 10: 633–693.
- [2] BAILEY CH, CHEN M. Long-term memory in *Aplysia* modulates the total number of varicosities of single identified sensory neurons. *PNAS USA* 1988; 85: 2373–2377.
- [3] BARZILAI A, KENNEDY TE, SWEATT JD, KANDEL ER. 5-HT modulates protein synthesis and the expression of specific proteins during long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 1989; 2: 1577–1578.
- [4] BERGOLD PJ, SWEATT JD, WINICOVI I, WEISS KR, KANDEL ER, SCHWARTZ JH. Protein synthesis during acquisition of long-term facilitation is needed for the persistent loss of regulatory subunits of the *Aplysia* cAMP – dependent protein kinase. *PNAS USA* 1990; 87: 3788–3791.
- [5] BRAHA O, DALE N, HOCHNER B, KLEIN M, ABRAMS TW, KANDEL ER. Second messenger involved in the two processes of presynaptic facilitation that contribute to the sensitization and dishabituation. *PNAS USA* 1990; 87: 2040–2044.
- [6] BYRNE JH. Cellular analysis of associative learning. *Physiol Rev* 1987; 67(2): 329–439.
- [7] CAMARDO JS, SHUSTER MJ, SIEGELBAUM S. Modulation of a potassium channel in *Aplysia* sensory neurons: Role of protein phosphorylation. *Molecular Aspects of Neurobiology*, Berlin-Heidelberg 1986: 106–112.
- [8] CHIN GJ, VOGEL SS, ELSTE AM, SCHWARTZ JH. Characterization of synaptophysin and G protein in synaptic vesicles and plasma membrane of *Aplysia californica*. *Brain Res* 1990; 508: 265–272.
- [9] DALE N, SCHACHER S, KANDEL ER. Long-term facilitation in *Aplysia* involves increase in transmitter release. *Science* 1988; 239: 282–285.

- [10] DASH PK, HOCHNER B, KANDEL ER. Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neuron blocks long-term facilitation. *Nature* 1990; **345**: 718–721.
- [11] DAVIS HP, SQUIRE LR. Protein synthesis and memory. *Physiol Bull* 1984; **96**: 518–559.
- [12] FORSCHER P, KACZMAREK LK, BUCHNAN J, SMITH SJ. Cyclic AMP induces changes in distribution and transport of organelles within growth cones of *Aplysia* bag cell neurons. *J Neurosci* 1987; **7**(11): 3601–3611.
- [13] GLANZMAN DL, KANDEL ER, SCHACHER S. Identified target motor neuron regulates outgrowth and formation of *Aplysia* sensory neurons in vitro. *Neuron* 1989; **3**: 441–450.
- [14] GLANZMAN DL, KANDEL ER, SCHACHER S. Target-dependent structural changes accompanying long-term synaptic facilitation in *Aplysia* neurons. *Science* 1990; **234**: 1249–1254.
- [15] GREENBERG SM, CASTELLUCCI VF, BAYLEY H, SCHWARTZ JH. A molecular mechanism for long-term sensitization in *Aplysia*. *Nature* 1987; **329**: 62–65.
- [16] KANDEL ER, SCHWARTZ JH. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science* 1982; **218**: 433–443.
- [17] KANDEL ER, CASTELLUCCI VF, GOELET P, SCHACHER S. Cell-biological interrelationships between short-term and long-term memory. *Molec Neurobiol Neurology and Psychiatry*, ER Kandel, Raven Press, New York 1987; 111–131.
- [18] MALENKA RC, MADISON DV, NICOLL RA. Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* 1986; **321**: 175–177.
- [19] MALINOW R, MADISON DV, TSIEN RW. Persistent protein kinase activity activation underlying long-term potentiation. *Nature* 1988; **335**: 820–824.
- [20] MARCUS EA, NOLEN TG, RANKIN C, CAREW TJ. Behavioral dissociation of dishabituation, sensitization and inhibition in *Aplysia*. *Science* 1988; **241**: 210–213.
- [21] MONTAROLO PG, GOELET P, CASTELLUCCI VF, MORGAN J, KANDEL ER, SCHACHER S. A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 1986; **234**: 1249–1254.
- [22] MONTAROLO P, SCHACHER S, CASTELLUCCI VF, HAWKINS RD, ABRAMS TW, GOELET P, KANDEL ER. Interrelationships of cellular mechanism for different forms of learning and memory. *Molecular Aspects of Neurobiology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1986: 1–14.
- [23] NESTLER EJ, GREENGARD P. Protein phosphorylation in the nervous system. A Neuroscience Institute Publication, John Wiley and Son., 1984.
- [24] PINSKER H, KUPFERMANN I, CASTELLUCCI VF, KANDEL ER. Habituation and dishabituation of the gill - withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 1969; **167**: 1740–1742.
- [25] RANKIN CH, CAREW TJ. Dishabituation and sensitization emerge as a separate process during development in *Aplysia*. *J Neurosci* 1988; **8**(1): 197–211.
- [26] RAYPORT CH, CAMARDO JS. Differential emergence of cellular mechanism mediating habituation and sensitization in the developing *Aplysia* nervous system. *J Neurosci* 1984; **4**(10): 2528–2532.
- [27] RAYPORT SG, SCHACHER S. Synaptic plasticity in cell culture of identified *Aplysia* neurons mediating short-term habituation and sensitization. *J Neurosci* 1986; **6**(3): 759–763.
- [28] RIABLOW KT, FINK JS, GILMAN MZ, WALSH DA, GOODMAN RH, FORAMISCO JR. The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase induces expression of genes containing cAMP-responsive enhancer elements. *Nature* 1988; **336**: 83–86.
- [29] SACTOR TC, SCHWARTZ JH. Sensitizing stimuli cause translocation of protein kinase C in *Aplysia* sensory neurons. *PNAS USA* 1990; **87**: 2036–2039.
- [30] SCHWARTZ JH, GREENBERG SM. Molecular mechanism for memory: Second-messenger induced modification of protein kinases in nerve cell. *Ann Rev Neurosci* 1987; **10**: 59–476.
- [31] STRONG JA, KACZMAREK LR. Multiple components of delayed potassium current in peptidergic neurons of *Aplysia*: modulation by an activator by adenylyl cyclase. *J Neurosci* 1986; **6**(3): 814–822.
- [32] SWEAT JD, KANDEL ER. Persistent and transcriptionally-dependent increase in protein phosphorylation in long-term facilitation of *Aplysia* sensory neurons. *Nature* 1989; **339**: 51–54.
- [33] TULLY T. *Drosophila* learning and memory. *TINS* 1987; **10**(8): 330–335.
- [34] WOOLF CJ, WALTERS ET. Common patterns of plasticity contributing to nociceptive sensitization in mammals and *Aplysia*. *TINS* 1991; **14**(2): 74–78.

Otrzymano: wrzesień 1991 r.

Przyjęto: 20 października 1991 r.

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

MODYFIKACJE GENETYCZNE CYTOCHROMU C I ICH IMPLIKACJE W JEGO FUNKCJI BIOLOGICZNEJ*

GENETIC MODIFICATIONS OF CYTOCHROME C AND THEIR IMPLICATIONS OF ITS BIOLOGICAL FUNCTION

Robert TRZOS, Bohdan TURZYNA

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Streszczenie. Przedstawiono użycie wybranych metod modyfikacji genetycznych cytochromu c w badaniu roli poszczególnych aminokwasów w różnych funkcjach biologicznych tej cząsteczki. Omówiono asocjację apocytochromu c z zewnętrzną błoną mitochondrialną, mechanizm tworzenia holocytochromu c w przestrzeni międzymbłonowej, a także rolę aminokwasów w wiązaniu hemu i transporcie elektronów. Wspomniano również o szczególnej roli niektórych aminokwasów w utrzymaniu i ustaleniu właściwej konformacji cytochromu c.

Słowa kluczowe: apocytochrom c, holocytochrom c, mutageneza

Summary. Some aspects of genetic modifications and their implications in biological role of cytochrome c has been described. The following problems have been discussed: association of apocytochrome c with outer mitochondrial membrane, formation of holocytochrome c in the intermembrane space, role of aminoacids in bounding heme and in electron transport. Special role of some aminoacids in holding the proper conformation of cytochrome c has been emphasized.

Key words: apocytochrome c, holocytochrome c, mutagenesis

METODY STOSOWANE W MODYFIKACJACH GENETYCZNYCH CYTOCHROMU C

W okresie ostatnich trzech lat ukazało się wiele prac dotyczących genetycznych modyfikacji białek, które uczestniczą w mitochondrialnym transporcie elektronów [11, 14, 29, 33, 45, 47, 58, 59]. Znana jest sekwencja nukleotydów genu *CYC 1* i *CYC 2*, kodujących

*Pracę przygotowano w ramach grantu: DNS-P/01/060/90-2 z grudnia 1990 r.

odpowiednio izo-1 i cytochrom c i izo-2 cytochrom c u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [7, 8, 19, 22, 24, 26, 34, 49, 53] grzyba *Neurospora crassa* [54], szczura [15, 16, 46, 54], myszy [54], gołębia [32] i człowieka [17]. Najbardziej dogodnym materiałem badawczym są drożdże piekarskie, na których dokonuje się większości doświadczeń nad modyfikacjami genetycznymi [6, 9, 10, 12, 13, 26, 28, 36]. System genetyczny tego jednokomórkowego organizmu eukariotycznego jest dobrze poznany, co umożliwia szerokie stosowanie technik mutagenyzy. U tego gatunku drożdży istnieją dwa rodzaje cytochromu c określonych jako izo-1 i izo-2. Są one identyczne w 80%, a izo-1 cytochrom c stanowi 95% całej puli cytochromu c w komórce [13]. W przeważającej większości doświadczeń używa się właśnie izo-1 cytochromu c [8]. Obiektem badań są jednak również cytochromy c poprzednio wymienionych zwierząt: myszy, szczura, gołębia, a także człowieka [15–17, 23, 30, 31, 46, 48, 50, 54] i roślin [27]. Prowadzono również doświadczenia nad ekspresją i funkcjonowaniem cytochromu c różnych organizmów w komórkach drożdży [30, 31, 49, 50]. Biosynteza, ekspresja i transport przez zewnętrzną błonę mitochondrialną cytochromów typu c w komórkach eukariotycznych są bardzo istotnym problemem badań biochemicznych, biofizycznych oraz genetycznych [1, 11, 21, 39, 40, 44, 47, 55–57].

Przedstawiony niżej krótki opis technik najczęściej używanych ma na celu zobrazowanie roli modyfikacji genetycznych w tych badaniach. Jednym z prostszych sposobów nie wymagających bardzo skomplikowanych metod inżynierii genetycznej jest poddawanie komórek drożdży działaniu czynników mutagennych [24]. Mogą to być substancje chemiczne, np. dietyl, kwas azotawy, diepoksybutan lub promieniowanie X czy UV [10, 24]. Aktywność cytochromu c określa się przez wielkość kolonii hodowanych na pożywce z mleczanem, aby wyeliminować dostęp energii z procesów beztlenowych [10, 24]. Następnym etapem jest dokładne zlokalizowanie mutacji w obrębie danego genu, co dokonuje się przez sekwencjonowanie określonego odcinka DNA. Drugi sposób modyfikacji cytochromu c opiera się na metodzie kierowanej mutagenyzy. Umożliwia ona dokonywanie ściśle określonych zmian w sekwencji DNA [3, 6, 10, 20, 23, 26, 30, 48, 50, 51, 56], a polega głównie na konstrukcji odpowiednich plazmidów przy pomocy enzymów restrykcyjnych i wektorów. W procesie wprowadzania żądanych sekwencji nukleotydów do plazmidu, szczególnie użyteczne są wektory fagowe M 13. Również w tej metodzie ostatecznym potwierdzeniem modyfikacji jest sekwencjonowanie DNA.

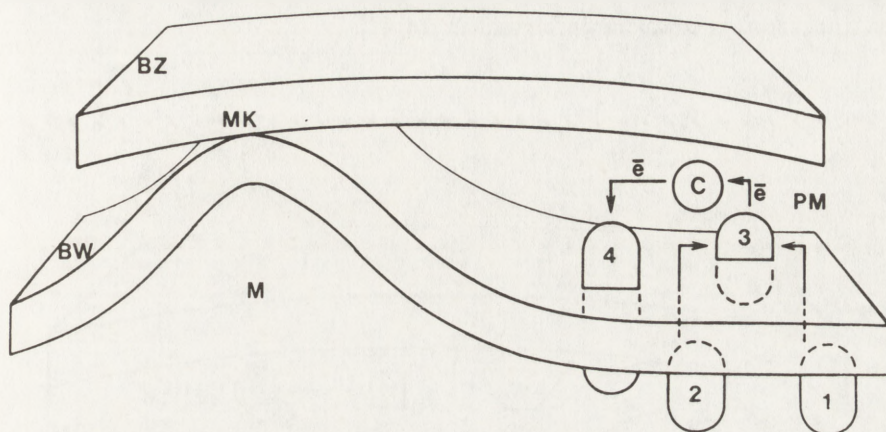
Każda z opisanych powyżej metod ma swoje wady i zalety. Pierwsza z nich jest metodą stosunkowo prostą, ale wszelkie mutacje mają charakter przypadkowy. Druga metoda wymaga bardzo skomplikowanych technik mutagenyzy in vitro, lecz otrzymane mutacje są ściśle zdefiniowane.

SYNTEZA I TRANSPORT APOCYTOCHROMU C TWORZENIE HOLOCYTOCHROMU C W PRZESTRZENI MIĘDZYBŁONOWEJ MITOCHONDRIMUM

SYNTEZA I TRANSPORT APOCYTOCHROMU C

Cytochrom c stanowi część łańcucha oddechowego zlokalizowanego w mitochondrium. Schemat tego układu przedstawia rysunek 1. Cytochrom c bierze udział w transporcie

elektronów pomiędzy reduktazą cytochromu c a oksydazą cytochromu c [4]. Te ostatnie są białkami integralnymi wewnętrznej błony mitochondrialnej w przeciwieństwie do cytochromu c, który będąc białkiem peryferycznie związanym z wewnętrzną błoną mitochondrialną, znajduje się w przestrzeni międzybłonowej i kontaktuje się z tymi dwoma kompleksami enzymatycznymi.



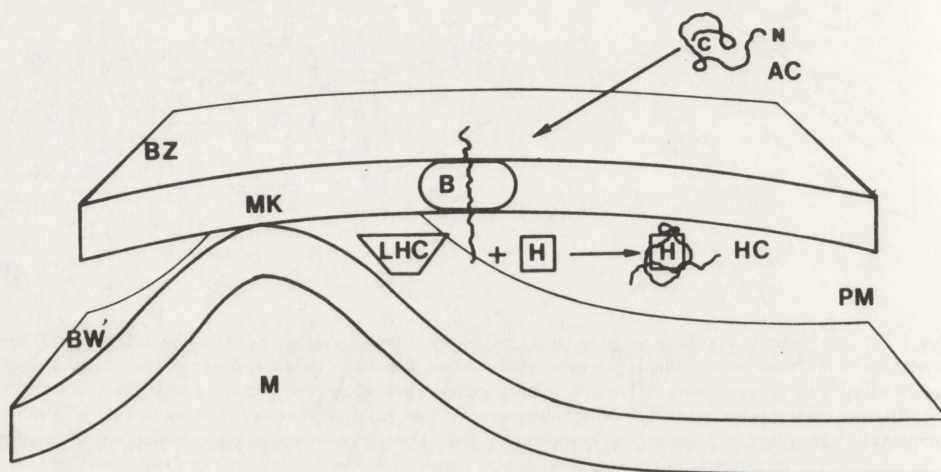
Rys. 1. Schemat łańcucha oddechowego wewnętrznej błony mitochondrialnej i miejsca kontaktowego: BZ – zewnętrzna błona mitochondrialna, BW – wewnętrzna błona mitochondrialna, PM – przestrzeń międzybłonowa, M – matryks mitochondrialna, MK – tzw. miejsca kontaktowe, gdzie zewnętrzna i wewnętrzna błona mitochondrialna przylegają do siebie, C – cytochrom c przenoszący elektrony pomiędzy reduktazą cytochromu c (kompleks 3) a oksydazą cytochromową (kompleks 4), 1–4 – kompleksy łańcucha oddechowego; w transporcie elektronów między kompleksem 1 i 3 oraz 2 i 3 uczestniczy koenzym Q

Sekwencja aminokwasowa cytochromu c, jak i nukleotydowa jego genu jest dobrze poznana dla 90 różnych gatunków [4, 24, 48]. Poznana jest również struktura oksydazy cytochromu c i jej ośmiu podjednostek w tym miejscu, w którym przyłącza ona cytochrom c podczas transportu elektronów [5].

Cytochrom c jest konserwatywnym białkiem, ponieważ sekwencja aminokwasów u wielu gatunków jest bardzo podobna. Gen kodujący apocytochrom znajduje się w jądrowym DNA. Białko to syntetyzowane jest na wolnych rybosomach cytoplazmatycznych, następnie jest uwalniane do cytoplazmy i transportowane do mitochondriów [20, 38]. Apocytochrom c po syntezie nie podlega posttranslacyjnym modyfikacjom, z wyjątkiem metylacji u niektórych gatunków [6, 8] i w takiej natywnej postaci ulega asocjacji z zewnętrzną błoną mitochondrialną [48].

W przeciwieństwie do większości prekursorowych białek transportowanych z cytoplazmy do mitochondrium, apocytochrom c nie ma tzw. sekwencji sygnałowej [4, 20, 25, 48]. Na ogół jest ona konieczna, aby określone białko czy peptyd zostały umieszczone we właściwym miejscu w określonej organelli komórkowej. Sekwencja sygnałowa (ok. 20 aminokwasów na N-końcu peptydu) jest swoiście wiązana z białkiem receptorowym na powierzchni błony docelowej organelli [25]. W przypadku apocytochromu c, rolę sekwencji sygnałowej spełniają niektóre aminokwasy wchodzące w skład jego pełnej sekwencji [48].

Receptor błonowy dla apocytochromu c nie został jeszcze zidentyfikowany. Może nim być białko znajdujące się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, związane z łażą hemową cytochromu c znajdującą się w przestrzeni międzybłonowej [20, 25]. Układ ten, przedstawiony schematycznie na rysunku 2, jest odporny na łagodną proteolizę, podczas gdy receptory innych białek po trawieniu tracą aktywność [23, 25]. Przed asocjacją z błoną, apocytochrom c nie ma ostatecznej trzeciorzędowej struktury charakteryzującej holocytochrom c ani żadnych kowalencyjnych wiązań [18, 42].



Rys. 2. Schemat transportu apocytochromu c przez zewnętrzną błonę mitochondrialną przy udziale hipotetycznego białka B; tworzenie holocytochromu c przy udziale łaży hemowej cytochromu c: BZ – zewnętrzna błona mitochondrialna, BW – wewnętrzna błona mitochondrialna, M – matryks mitochondrialna, MK – miejsce kontaktowe, B – hipotetyczne białko wiążące apocytochrom c, LHC – łaża hemowa cytochromu c, H – hem, AC – apocytochrom c, HC – holocytochrom c (schemat opracowano wg danych Pfannera i wsp. [41])

SEKWENCJE AMINOKWASÓW APOCYTOCHROMU C UCZESTNICZĄCE W WIĄZANIU Z ZEWNĘTRZNĄ BŁONĄ MITOCHONDRIALNĄ. TWORZENIE HOLOCYTOCHROMU C

Wbrew wcześniejszym przypuszczeniom, iż ta sama sekwencja aminokwasów apocytochromu c jest odpowiedzialna zarówno za wiązanie hemu, jak i za transport tego białka przez błonę [25], obecnie przyjmuje się, że istnieją dwa różne miejsca apocytochromu c odpowiedzialne za te dwie funkcje biologiczne [48]. Wydaje się to uzasadnione z ewolucyjnego punktu widzenia. W badaniu zależności obu tych funkcji cytochromu c wykonano doświadczenia, w których użyto apocytochromu c zsyntetyzowanego w układzie bezkomórkowym [2, 23, 50], jak również stosowano układ łączący elementy pochodzące z różnych organizmów (np. apocytochrom c z *Drosophila melanogaster* i mitochondria mysie). W celu ustalenia sposobu asocjacji apocytochromu c z zewnętrzną błoną mitochondrialną podda-

no analizie następujące części łańcucha apocytochromu c o różnej liczbie aminokwasów liczonej od N-końca:

- 58 aminokwasów – efekt: stopień asocjacji takiego peptydu jest prawie identyczny jak natywnego apocytochromu c;
- 50 aminokwasów – efekt: duże obniżenie zdolności łączenia się z zewnętrzną błoną mitochondrium;
- 36 aminokwasów – efekt: bardzo niski stopień asocjacji z zewnętrzną błoną mitochondrium.

Haukvoort i wsp. [23] badali również zmodyfikowany apocytochrom c, w którym pewne aminokwasy lub fragmenty peptydowe zostały zastąpione innymi, nie występującymi w natywnym apocytochromie c. Obserwowano wpływ tych modyfikacji na transport i asocjację z zewnętrzną błoną mitochondrialną. Otrzymano 5 różnych form apocytochromu c:

1. Zamieniono 5 aminokwasów w pozycjach: 90 Glu na Cys, 91 Arg na Leu, 92 Gly na Pro, 96 Ala na Pro, 100 Ser na Pro. Nie powodowało to istotnych zmian w asocjacji białka z błoną mitochondrialną; jednak struktura alfa helisy na C-końcu była zaburzona.

2. Począwszy od 90 aminokwasu dołączono peptyd 30-aminokwasowy, nie występujący w formie natywnej. Taki "analog" apocytochromu c również asocjował z zewnętrzną błoną mitochondrialną bez przeszkód.

3. Zmieniono 3 aminokwasy (lizyny) w pozycjach: 5, 7, 8 kolejno na Gln, Glu, Asn. Powodowało to całkowity brak asocjacji z błoną mitochondrialną.

4. Peptyd składający się z dwóch natywnych fragmentów apocytochromu c od 1 do 36 aminokwasu oraz od 66 do 104 aminokwasu (który nie miał jednak sekwencji od 37 do 65 aminokwasu) był całkowicie funkcjonalny.

5. Peptyd, który składał się z fragmentu natywnego apocytochromu c od 1 do 35 aminokwasu oraz części od 36 do 87 aminokwasu o sekwencji nie występującej w apocytochromie c, nie przyłączał się do błony mitochondrialnej.

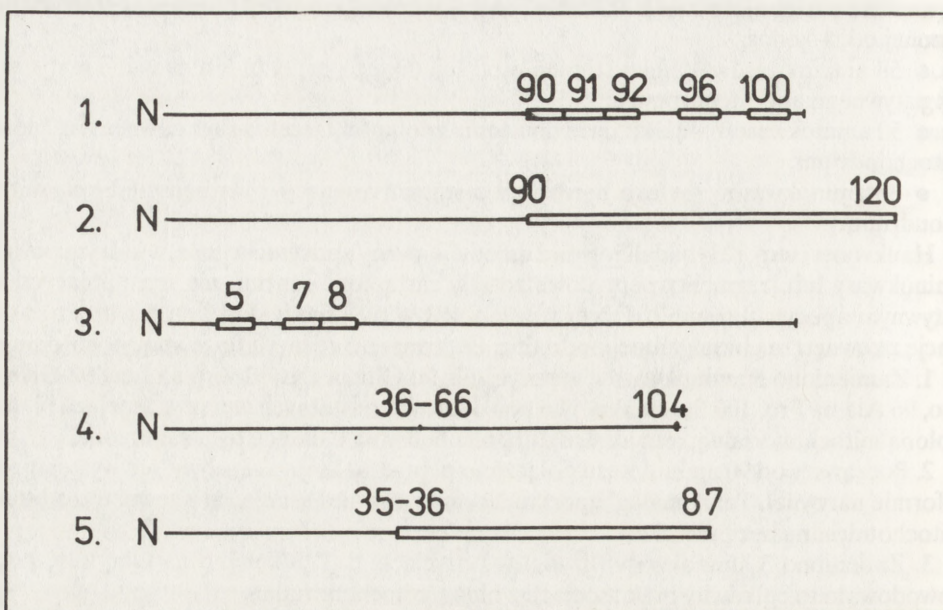
Schemat tych doświadczeń przedstawia graficznie rysunek 3.

Dokonywano także zamiany dwóch cystein w pozycjach 14 i 17 wiążących tioeterowo hem [23, 24, 48, 50]. Gdy zastąpiono obie cysteiny seryną lub elaniną, apocytochrom c asocjował z zewnętrzną błoną mitochondrium [23]. Natomiast zamiana reszt cysteinowych na aminokwasy aromatyczne (tryptofan, tyrozynę czy fenyloalaninę) powodowała całkowity brak asocjacji i transportu przez błonę mitochondrialną [12, 23, 24].

Przedstawione wyniki doświadczeń wskazują, iż istotną częścią apocytochromu c dla jego asocjacji i transportu przez błonę mitochondrialną są:

- (1) N-końcowa sekwencja apocytochromu c, szczególnie Lys 5, 7, 8;
- (2) sekwencja aminokwasów do 58 oraz między 66 a 90 aminokwasem.

Interesujący jest fakt, że obecność w apocytochromie c cystein wiążących kowalencyjnie hem nie jest warunkiem transportu tego białka. Transport apocytochromu c i przyłączanie hemu różni się swoim mechanizmem od transportu innych składników łańcucha oddechowego. Transport większości białek do mitochondrium zależy od ATP i zachodzi poprzez tzw. miejsca kontaktowe (*contact sites* – miejsca, w których blisko przylegają błony: zewnętrzna i wewnętrzna), co schematycznie zaznaczono na rysunku 1. W transporcie tym bierze udział białko zwane GIP (*general insertion protein*), do którego są kierowane peptydy rozpoznane przez swoiste receptory na powierzchni zewnętrznej błony mitochondrialnej. Transport prawie wszystkich białek do mitochondrium jest uzależniony od potencjału błonowego; wyjątkiem jest transport apocytochromu c i poryny [20, 25, 41].



Rys. 3. Ilustracja doświadczenia Haukvoorta i wsp. [23] dotyczącego asocjacji cytochromu c z zewnętrzną błoną mitochondrialną; prostokąty oznaczają zmodyfikowane fragmenty łańcucha polipeptydowego (wg [23] zmodyfikowane)

Jak wspomniano, charakter miejsca wiążącego apocytochrom c do zewnętrznej błony mitochondrialnej nie jest wyjaśniony. Najważniejszą rolę w transporcie i tworzeniu holo-cytochromu c pełni jednak z pewnością liaza hemowa cytochromu c (rys. 2). Enzym ten katalizuje powstanie kowalencyjnych wiązań pomiędzy cysteinami apocytochromu c a grupami winylowymi hemu [37, 38, 41]. Jak zgodnie podkreśla większość autorów, jest to zasadniczy etap w tworzeniu holo-cytochromu c [12, 13, 35, 36]. Aby ten proces mógł zajść, hem wcześniej musi zostać zredukowany przez NADH i nukleotydy flawinowe [8, 38]. Hamując dołączanie hemu, hamuje się również transport apocytochromu c. Wskazuje to na integrację obu tych procesów w trakcie tworzenia holo-cytochromu c.

AMINOKWASY WIĄŻĄCE HEM I ICH ROLA W TRANSPORCIE ELEKTRONÓW

Hem jest zbudowany z czterech pierścieni pirolowych, których dwie grupy winylowe są związane kowalencyjnie z apocytochromem c poprzez dwie cysteiny. Należy zwrócić uwagę na istniejące różnice w umiejscowieniu niektórych aminokwasów a pełniących tę samą funkcję. Różnice te występują między kręgowcami a niższymi organizmami. Na przykład u *Saccharomyces cerevisiae* cysteiny wiążące hem występują w pozycjach 19 i 22, natomiast

u kręgowców w pozycjach 14 i 17. Takie różnice pojawiają się w kilku miejscach łańcucha peptydowego cytochromu c.

Atom żelaza obecny w hemie cytochromu c nie ma wolnych miejsc koordynacyjnych. Histydyna i metionina w pozycjach 23 i 85 są aminokwasami, które zajmują 5 i 6 pozycje koordynacyjne żelaza [9, 30, 31]. Z tego powodu cytochrom c nie reaguje z tlenem, tlenkiem węgla czy cyjankami.

Do tej pory tylko u dwu wiciowców stwierdzono cytochrom c, którego hem związany jest tylko jednym wiązaniem kowalencyjnym z łańcuchem peptydowym [50]. Wynika to z zastąpienia cysteiny przez alaninę. Jak wskazują dotychczasowe wyniki, taki cytochrom spełnia swą funkcję transportu elektronów. Również ludzki cytochrom c, w którym Cys-14 doświadczalnie zastąpiono Ala, funkcjonował normalnie i uzupełniał brak izo-1 cytochromu c u drożdży, co świadczy, że Cys-14 nie jest niezbędna dla funkcjonowania ludzkiego cytochromu c [50]. Jednakże zastąpienie Cys-19 u drożdży (odpowiednik Cys-14 w ludzkim cytochromie c) innym aminokwasem jest niemożliwe [24, 50].

Modyfikacje aminokwasów, które są ligandami żelaza hemu, tzn. His-23 i Met-85 (u kręgowców odpowiednio His-18 i Met-80 wg [30]) prowadzą do znacznego obniżenia, a nawet zniesienia funkcjonalności cytochromu c [24, 30]. Aminokwasy te są odpowiedzialne nie tylko za stabilizację konformacji cytochromu c, ale biorą udział w transporcie elektronów w łańcuchu oddechowym [9, 24, 30, 31].

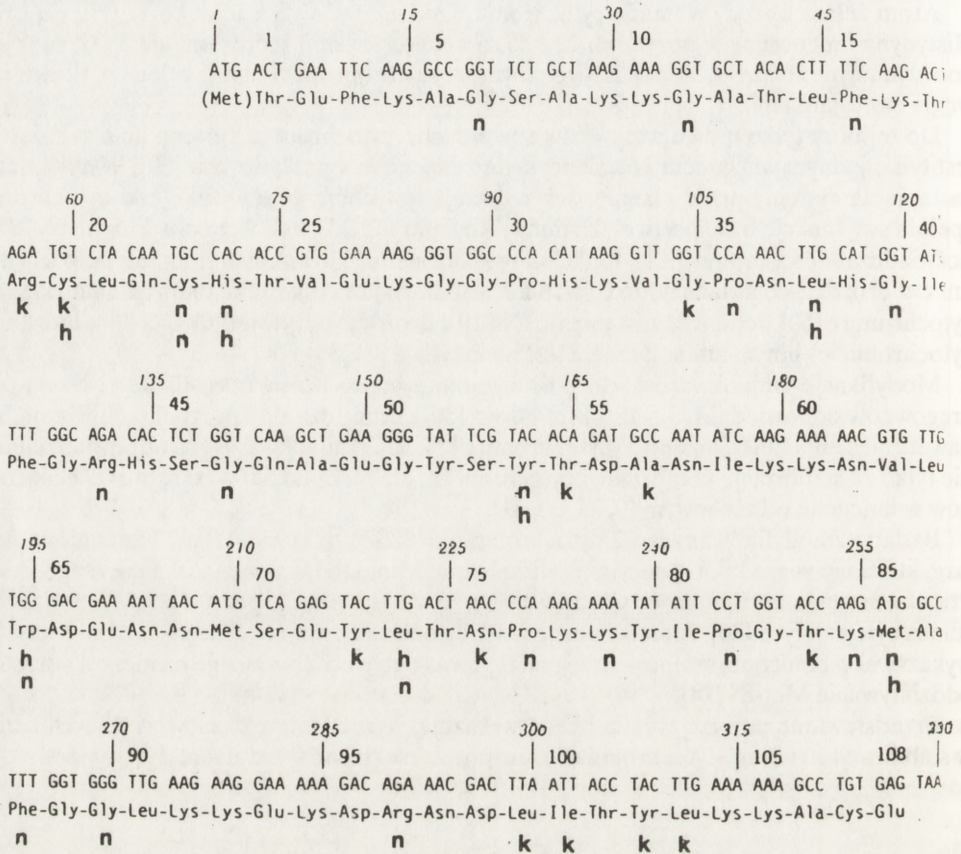
Badano zmodyfikowany izo-2 cytochromu c drożdży, w którym His-23 zmieniono na Arg, która nie wiąże koordynacyjnie żelaza hemu. Mimo to taka cząsteczka nie reagowała z tlenkiem węgla czy tlenem, co wskazywałoby, że wszystkie sześć pozycji koordynacyjnych żelaza było zajętych [30]. Jednak fakt, że izo-1 cytochrom c mający Ileu-85 zamiast Met-85 wykazywał w obniżonej temperaturze nadal pewną aktywność, wskazuje na niezbyt swoiste oddziaływanie Met-85 [24].

Przedstawione powyżej wyniki badań wykazują, że rola aminokwasów wiążących hem w stabilizacji struktury cytochromu c i transporcie elektronów jest nadal dyskusyjna.

ROLA NIEKTÓRYCH AMINOKWASÓW WE WŁAŚCIWEJ KONFORMACJI CYTOCHROMU C

Aminokwasy wchodzące w skład cytochromu c można podzielić na: a) ewolucyjnie niezmiennie, b) konserwatywne, c) ewolucyjnie zmienne [24, 26, 30]. Do pierwszej grupy należą te aminokwasy, których obecność stwierdza się u prawie wszystkich przebadanych organizmów na tych samych lub odpowiadających im miejscach. Do aminokwasów konserwatywnych należą te, które są zastępowane u niektórych organizmów aminokwasami pełniącymi te same funkcje np. Arg na Lys czy Ileu na Val. W trzeciej grupie są aminokwasy, które najczęściej ulegają zmianom, co nie powoduje żadnych biologicznie ważnych różnic.

Ewolucyjnie niezmiennymi lub konserwatywnymi aminokwasami są omówione wcześniej wiążące hem Cys-19 i Cys-22, His-23 i Met-85. Zamiany innych aminokwasów niezmiennych: Tyr-53 na Asp, Asn-75 na Thr i Leu-99 na Phe powodują ten sam efekt, co zamiany reszt wiążących hem (tzn. całkowity brak izo-1 cytochromu c), ponieważ spełniają one równie ważne funkcje. Sekwencję nukleotydową genu CYC 1 i aminokwasową izo-1 cytochromu c z drożdży przedstawia rysunek 4.



Rys. 4. Sekwencja nukleotydowa genu *CYC 1* i aminokwasowa izo-1 cytochromu c drożdży; małe litery oznaczają odpowiednio: h – aminokwasy zaangażowane w interakcję z hemem, n – aminokwasy ewolucyjnie niezmiennne, K – aminokwasy konserwatywne (wg [24] zmodyfikowane)

Według [24] Tyr-53 i Leu-99 są odpowiedzialne za utrzymanie właściwego środowiska hydrofobowego dla hemu. Asn-75 kontaktuje się ze środowiskiem zewnętrznym. Nie zawsze podstawienie aminokwasów ewolucyjnie niezmiennych powoduje powstanie szczepów mających niefunkcyjny cytochrom c lub nie mających go w ogóle. Takimi wyjątkami są Gly-6, Trp-64, Pro-76 i Lys-77. Są one ewolucyjnie niezmiennne, natomiast pewne ich podstawienia nie powodują zmian w funkcjonowaniu izo-1 cytochromu c [24, 26]. Zaobserwowano również sytuację odwrotną: zastąpienie dwóch aminokwasów ewolucyjnie zmiennych Leu-14 i His-38 u drożdży przez Pro powoduje całkowity brak funkcji cytochromu c. Tłumaczy się to tym, że prolina ze względu na swą budowę zaburza w dużym stopniu strukturę holocytochromu c. Należy jednak podkreślić, że oba te aminokwasy mają ważną rolę biologiczną w cytochromie c. Zaburzenia we właściwej konformacji powodowane są

również przez podstawienie aminokwasów: Pro-35, Tyr-72, Pro-76, Asn-75, Lys-84, Leu-99 oraz Leu-103. Zmiany w tych pozycjach powodują obniżenie ilości cytochromu c i upośledzenie biologicznej funkcji cytochromu c. Interesujące są aminokwasy, których podstawienia nie powodują znacznego zmniejszenia ilości cytochromu c, lecz całkowicie znoszą jego funkcję w temperaturze 22°C. Są to zmiany Gly-34 na Ser, Leu-37 na Trp lub Ser, Trp-64 na Gly lub Ser oraz Tyr-72 na Asp i Pro-76 na Leu.

U drożdży podczas transportu apocytochromu c do mitochondrium ewolucyjnie zmienia na Lys-77 ulega potrójnej metylacji [6, 8, 26]. Sugerowało to szczególną rolę tego aminokwasu. Jednak zamiana Lys na Arg, która nie ulega metylacji, nie powoduje obniżenia aktywności holocytochromu c, a nawet obserwowano pewien jej wzrost [6, 26]. Podobny wzrost aktywności był obserwowany u mutantu, gdzie Asn-87 zastąpiono Ileu [9]. Modyfikacje Pro-30 na Ala osłabiają wiązania wodorowe pomiędzy grupą karbonylową Pro a iminową His-18, co wpływa na wiązanie z hemem. To z kolei oddziałuje na wiązanie Met-80 z hemem [30] stabilizowane przez Tyr-67. Mimo iż cytochrom c jest jedną z mniejszych metaloprotein, wyjaśnienie wszystkich biologicznych oddziaływań, w jakie jest on zaangażowany, nie jest jeszcze możliwe.

BIBLIOGRAFIA

- [1] ARAI H, SANBONGI Y, IGARASHI Y, KODAMA T. Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome c 551 from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* 1990; **261**: 196–198.
- [2] di BELLO C, TONELLATO M, LUCCHARI A, DUSO O, GOZZINI L, VITA C. Solid phase synthesis of the native sequence of horse heart cytochrome c (66–104)-nonatriacontapeptide and of a C-terminal carboxamide analog selectively modified at Met-80. *Int J Peptide Protein Res* 1990; **35**: 336–345.
- [3] BIEL SW, BIEL AJ. Isolation of a *Rhodobacter capsulatus* mutant that lacks c-type cytochromes and excretes porphyrins. *J Bacteriol* 1990; **172**: 1321–1326.
- [4] BOSSHARD HR. Funkcja cytochromu c – wzorzec molekularnego rozpoznania. *Post Biochem* 1984; **30**: 225–230.
- [5] CAPALDI RA. Structure and function of cytochrome c oxidase. *Ann Rev Biochem* 1990; **59**: 569–596.
- [6] CESSAY JK, BERGMAN LW, TUCK MT. Further investigation regarding the role of trimethyllysine for cytochrome c uptake into mitochondria. *Int J Biochem* 1991; **23**: 761–768.
- [7] CLEMENTS JM, O'CONNELL LI, TSUNASAWA S, SHERMAN F. Expression and activity of rat cytochrome c in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1989; **83**: 1–14.
- [8] CROW JF, DOVE WF. Studies of yeast cytochrome c: How and why they started and why they continued. *Genetics* 1990; **125**: 9–12.
- [9] DAS G, HICKEY DR, MCLENDON D, MCLENDON G, SHERMAN F. Dramatic thermostabilization of yeast iso-1cytochrome by an asparagine-isoleucine replacement at position 57. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 496–499.
- [10] DAS G, HICKEY DR, PRINCIPIO L, CONKLIN KT, SHORT J, MILLER JR, MCLENDON G, SHERMAN F. Replacement of lysine 32 in yeast cytochrome c. *J Biol Chem* 1988; **263**: 18290–18297.
- [11] DONOHUE TJ, MCEWAN AG, van DOREN S, CROFTS AR, KAPLAN S. Phenotypic and genetic characterization of cytochrome c2 deficient mutants of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 1988; **27**: 1918–1925.
- [12] DUMONT ME, ERNST JF, SHERMAN F. Coupling of heme attachment to import of cytochrome c into yeast mitochondria. *J Biol Chem* 1988; **263**: 15928–15937.
- [13] DUMONT ME, MATHEWS AJ, NALL BT, BAIM SB, EUSTICE DC, SHERMAN F. Differential stability of two apo-1cytochromes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1990; **265**: 2733–2739.
- [14] EVANS MJ, SCARPULLA RC. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev* 1990; **4**: 1023–1034.

- [15] EVANS MJ, SCARPULLA RC. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem* 1989; **264**: 14361–14368.
- [16] EVANS MJ, SCARPULLA RC. Both upstream and intron sequence elements are required for elevated expression of the rat somatic cytochrome c gene in cos-1 cells. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 35–41.
- [17] EVANS MJ, SCARPULLA RC. The human somatic cytochrome c gene: two classes of processed pseudogenes demarcate a period of rapid molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9625–9629.
- [18] FISHER WR, TANIUCHI H, ANFINSEN CB. On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome c. *J Biol Chem* 1973; **248**: 3188–3195.
- [19] FORSBURG SL, GUARENTE L. Mutational analysis of upstream activation sequence 2 of the CYC1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: a HAP2-HAP3-responsive site. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 647–654.
- [20] GONZALES DH, NEUPERT W. Biogenesis of mitochondrial c-type cytochromes. *J Bioenerg Biomembr* 1990; **22**: 753–768.
- [21] GRISSHAMMER R, OECKEL C, MICHEL H. Expression in *Escherichia coli* of c type cytochrome genes from *Rhodospseudomonas viridis*. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1088**: 183–190.
- [22] HAHN S, PINKHAM J, WEI R, MILLER R, GUARENTE L. The HAP3 regulatory locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes divergent overlapping transcripts. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 655–663.
- [23] HAUKVOORT TBM, SPRINKLE JR, MARGOLIASH E. Reversible import of apocytochrome c into mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4996–5000.
- [24] HAMPSEY DM, DAS G, SHERMAN F. Amino acid replacement in yeast iso-1-cytochrome c. *J Biol Chem* 1986; **261**: 3259–3271.
- [25] HARTL FU, PFANNER N, NICHOLSON DW, NEUPERT W. Mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* 1989; **988**: 1–45.
- [26] HOLZSCHU D, PRINCIPIO L, CONKLIN KT, HICKEY DR, SHORT J, RAO R, MCLENDON G, SHERMAN F. Replacement of the invariant lysine 77 by arginine in yeast iso-1-cytochrome c results in enhanced and normal activities in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1987; **262**: 7125–7131.
- [27] KEMMERER EC, LEI M, WU R. Structure and molecular evolutionary analysis of a plant cytochrome c gene; surprising implication for *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Evol* 1991; **32**: 227–237.
- [28] KIM KS, PFEIFER K, POWELL L, GUARENTE L. Internal deletions in the yeast transcriptional activator HAP1 have opposite effects at two sequence elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4524–4528.
- [29] KIM CH, ZITOMER RS. Disruption of the gene encoding subunit 6 of the cytochrome bc1 complex causes respiratory deficiency of cells with reduced cytochrome c levels. *FEBS Lett* 1990; **266**: 78–82.
- [30] KOSHY TI, LUNTZ TL, SCHEJTER A, MARGOLIASH E. Changing the invariant proline 30 of rat and *Drosophila melanogaster* cytochromes c to alanine or valine destabilizes the heme crevice more than the overall conformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 8697–8701.
- [31] LUNTZ TL, SCHEJTER A, GARBER EAE, MARGOLIASH E. Structural significance of an internal water molecule studied by site-directed mutagenesis of tyrosine-67 in rat cytochrome c. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 3524–3528.
- [32] MCELLIGOTT DL, SORGER SB, MATIS LA, HEDRICK SM. Two distinct mechanisms account for the immune response (Ir) gene control of the T cell response to pigeon cytochrome c. *J Immunol* 1988; **140**: 4123–4131.
- [33] MCEWAN AG, KAPLAN S, DONOHUE TJ. Synthesis of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c2 in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1989; **50**: 253–258.
- [34] MCNEIL JB. Functional characterization of pyrimidine-rich element in the 5'-noncoding region of the yeast iso-1-cytochrome c-gene. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 1045–1054.
- [35] NARGANG FE, DRYGAS M, KWONG PL, NICHOLSON DW, NEUPERT W. A mutant of *Neurospora crassa* deficient in cytochrome c heme lyase activity cannot import cytochrome c into mitochondria. *J Biol Chem* 1988; **263**: 9388–9394.
- [36] NICHOLSON DW, HEVGERSBERG C, NEUPERT W. Role of cytochrome c heme lyase in the import of cytochrome c into mitochondria. *J Biol Chem* 1988; **263**: 19034–19042.
- [37] NICHOLSON DW, KÖHLER H, NEUPERT W. Import of cytochrome c into mitochondria. Cytochrome c heme lyase. *Eur J Biochem* 1987; **164**: 147–157.
- [38] NICHOLSON DW, NEUPERT W. Import of cytochrome c into mitochondria. Reduction of heme, mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome c. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 4340–4344.

- [39] NORDLING M, YOUNG S, KARLSSON BG, LUNDBERG LG. The structural gene for cytochrome c551 from *Pseudomonas aeruginosa*. The nucleotide sequence shows a location downstream of the nitrite reductase gene. *FEBS Lett* 1990; 259: 230–232.
- [40] NUNN DN, ANTHONY C. The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the cytochrome cL gene of *Methylobacterium extorquens* AM1, a novel class of c type cytochrome. *Biochem J* 1988; 256: 673–676.
- [41] PFANNER N, HARTL FU, NEUPERT W. Import of proteins into mitochondria: a multi-step process. *Eur J Biochem* 1988; 175: 205–212.
- [42] RIETVELD A, PONJEE GAE, SHIFFERS P, JORDI W, van de COOLWJK PJFM, DEMURA, MARSH D, DE KRUIJFF B. Investigations on the insertion of the mitochondrial precursor protein apocytochrome c into model membranes. *Biochim Biophys Acta* 1985; 818: 398–409.
- [43] ROISE D, SCHATZ G. Mitochondrial presequences. *J Biol Chem* 1988; 263: 4509–4511.
- [44] ROOIJEN van CJ, BRUSCHI M, VOORDOUW G. Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome c553 from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J Bacteriol* 1989; 171: 3575–3578.
- [45] SELF SJ, HUNTER CN, LEATHERBARROW RJ. Molecular cloning, sequencing and expression of cytochrome c2 from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem J* 1990; 265: 599–604.
- [46] SIBBALD PR, BLENCOWE BJ. A completely conserved rat U6 snRNA pseudogene coding sequence is sandwiched between a cytochrome c retropseudogene and a LINE-like sequence. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 1063–1068.
- [47] SPANNING van RJ, WANSELL C, HARMS N, OLTMANN LF, STOUTHAMER AH. Mutagenesis of the gene encoding cytochrome c550 of *Paracoccus denitrificans* and analysis of the resultant physiological effects. *J Bacteriol* 1990; 172: 986–996.
- [48] SPRINKLE JRS, HAUKVOORT TBM, KOSHY TI, MILLER DD, MARGOLIASH E. Amino acid sequence for the requirements for the association of apocytochrome c with mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5729–5733.
- [49] TANAKA Y, ASHIKARI T, SHIBANO Y, AMACHI T, YOSHIZUMI H. Construction of a human cytochrome c gene and its functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem Tokyo* 1988; 103: 954–961.
- [50] TANAKA Y, KUBOTA I, AMACHI T, YOSHIZUMI H, MATSUBARA H. Site-directly mutated human cytochrome c with retains heme c via only one thioether bond. *J Biochem* 1990; 108: 7–8.
- [51] VARGA AR, KAPLAN S. Construction, expression and localization of CYCA::PhoA fusion protein in *Rhodobacter sphaeroides* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1989; 171: 5830–5839.
- [52] VERBIST J, LANG F, GABELLINI N, OESTERHELT D. Cloning and sequencing of the fbcF, B and C genes encoding the cytochrome b/c1 complex from *Rhodospseudomonas viridis*. *Mol Gen Genet* 1989; 219: 445–452.
- [53] VERDIERE J, GAISHEM, GUIAROL B, DEFRANOUX N, SLONIMSKI PP. CYP1 (HAP1) regulator of oxygen-dependent gene expression in yeast. II. Missense mutation suggest alternative Zn fingers as discriminating agents of gene control. *J Mol Biol* 1988; 204: 277–282.
- [54] VIRBASIVS J, SCARPULLA RC. Structure and expression of rodent genes encoding the testis specific cytochrome c. Differences in gene structure and evolution between somatic and testicular variants. *J Biol Chem* 1988; 263: 6791–6796.
- [55] VOORDOVW G. Cloning of genes encoding redox protein of known amino acid sequence from a library of the *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) genome. *Gene* 1988; 67: 75–83.
- [56] WACHENFELDT von C, HEDERSTEDT L. *Bacillus subtilis* 13-kilodalton cytochrome c-550 encoded by cccA consist of a membrane-anchor and a heme domain. *J Biol Chem* 1990; 265: 13939–13948.
- [57] WIESSNER C, DUNGER J, MICHEL H. Structure and transcription of the genes encoding the B1015 light harvesting complex beta and alpha subunits and the photosynthetic reaction center L. M. and cytochrome c subunits from *Rhodospseudomonas viridis*. *J Bacteriol* 1990; 172: 2877–2887.
- [58] WINKLER H, ADAM G, MATTES E, SHANZ M, HARTIG A, RUIS H. Co-ordinate control of synthesis of mitochondrial and non-mitochondrial hemoproteins: a binding site for the HAP1 (CYP1) protein in the UAS region of the yeast catalase T gene (CTT1). *EMBO J* 1988; 7: 1799–1804.
- [59] WRIGHT RM, POYTON RO. Release of two *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome genes, COX6 and CYC1, from glucose repression requires the SNF1 and SSN6 gene products. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 1297–1300.

Otrzymano: sierpień 1991 r. Przyjęto: 21 października 1991.
Adres autorów: Al. A. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

METYLACJA DNA U ROŚLIN

DNA METHYLATION IN PLANTS

Maria J. OLSZEWSKA, Tomasz SAKOWICZ

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii
Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie. W materiale zwierzęcym udowodniono hamujący efekt metylacji DNA na ekspresję genów. Mimo licznych metod biochemicznych i cytochemicznych, opisanych w niniejszym artykule, stan wiedzy na ten temat w odniesieniu do materiału roślinnego jest – z nielicznymi wyjątkami – znacznie mniej zaawansowany.

Summary. In animal kingdom it has been proved that DNA methylation inhibits gene expression. In spite of numerous methods, described in the present review, the knowledge of this phenomenon in plant kingdom is, with some exceptions, much less advanced.

Wykaz stosowanych skrótów. 5-azaC – 5-azacytydina; bp – pary zasad; CpG – dinukleotyd deoksytydina-fosforan-deoksyguanozyna; CpXpG – trinukleotyd, X – dowolna zasada; GUS – β -glukuronidaza; m-Alu I – prokariotyczna metylaza Alu I; 5-mC – 5-metylocytozyna; NOR – organizator jąderkowy; ori – miejsce inicjacji replikacji DNA; $^3\text{H-SAM}$ – ^3H -metylo-S-adenozyl-L-metionina.

WSTĘP

DNA wszystkich organizmów poza podstawowymi czterema zasadami zawiera jedną lub więcej tzw. rzadkich zasad. Najczęściej jest to 5-mC, ale także spotykane są, szczególnie u *Prokaryota*, $\text{N}^6\text{-mA}$ i $\text{N}^4\text{-mC}$ [1]. Obecność tych zasad w DNA jest efektem zjawiska metylacji, powszechnie występującego w genomach pro- i eukariotycznych. Metylacja jest jedną z modyfikacji DNA zachodzących we wczesnej fazie postreplikacyjnej. Grupy metylowe są przenoszone z S-adenozylometioniny w reakcjach katalizowanych przez DNA-metylotransferazy (metylazy). Są to enzymy wykazujące znaczny stopień specyficzności u *Pro-* i *Eukaryota*. Dla wszystkich warunkiem ich działania jest obecność hemimetylowanego DNA (por. Hemimetylacja DNA) jako specyficznego substratu. Charakterystyczną cechą metylaz roślinnych jest ich działanie na cytozyny występujące w układach CpG i CpXpG, podczas gdy enzymy zwierzęce metylują tylko C w pierwszym z

wymienionych układów [20]. Wydaje się, że jedyną metylowaną zasadą u *Eukaryota* jest 5-mC, chociaż dane z literatury wskazują, że np. w DNA ryżu występuje wyraźna dominacja metylacji A nad C [6].

U zwierząt najwyższy poziom metylacji DNA stwierdzono u kręgowców – 3–6%, najniższy – u stawonogów – 0,03%; pośrednie wartości znaleziono u jamochłonów, mięczaków i szkarłupni [8]. Poziom metylacji DNA spada w miarę przesuwania się w dół drabiny ewolucyjnej; u wielu najbardziej prymitywnych organizmów nie udało się wykryć metylacji DNA [1, 5, 7]. Natomiast w DNA roślin wyższych zawartość metylowanych zasad jest zwykle bardzo wysoka – do ok. 33%; np. u tytoniu – 32,6%, bobu – 30,5% [21]. Metylowana jest cytozyna zarówno w sekwencji CpG, jak i CpXpG [22]. Wyraźne różnice w liczbie metylowanych zasad pozwalają przypuszczać, że istotnym czynnikiem wpływającym na poziom metylacji są rozmiary genomu, tj. zawartości 2C DNA. Zarówno w genomach zwierzęcych, jak i roślinnych tylko część sekwencji potencjalnie zdolnych do metylacji ulega tej modyfikacji. Badania zmierzające do wskazania specyficznych sekwencji flankujących układy CpG lub CpXpG, które mogłyby odpowiadać za takie zmiany, nie dały pozytywnych wyników [5]. We wszystkich genomach są sekwencje o wyższym poziomie metylacji. Należy do nich większość sekwencji powtarzalnych oraz satelitarny DNA (heterochromatyna). Regiony transkrybowane zawierają DNA niemetylowany lub o niskim poziomie metylacji [7].

BIOLOGICZNE ZNACZENIE METYLACJI DNA

Rola biologiczna, jaką się przypisuje metylacji, polega na funkcjach regulatorowych ekspresji genów organizmów pro- i eukariotycznych. Funkcje te związane są m.in. ze zmianami interakcji DNA-białko oraz ze zmianami konformacji DNA, co z kolei pociąga modyfikacje w przebiegu replikacji, transkrypcji i translacji. Zmiany konformacyjne w strukturze DNA mogą za sobą pociągnąć zmiany interakcji DNA-białka. Także struktura chromatyny, modyfikowana przez metylację, odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji.

Metylacja jest związana z dezaktywacją chromatyny (np. chromosomu X [14]). Również nieaktywna transkrypcyjnie heterochromatyna, zawierająca satelitarny DNA, wykazuje wysoki poziom metylacji (u myszy ok. 50% [14]).

U zwierząt białka wiążące się z metylowanym DNA są wysoce specyficzne. Jedno z takich białek zostało wyizolowane i ze względu na jego powszechne występowanie może być uznane za mediatora efektów metylacji. Aby nastąpiło mocne związanie, niezbędnych jest co najmniej 15 5-mCpG na cząsteczkę substratu. Białko to uczestniczy w hamowaniu transkrypcji za pośrednictwem metylacji. Niedobór tego białka powoduje zahamowanie transkrypcji z metylowanych wzorców DNA [14].

U kręgowców rozmieszczenie 5-mC jest nierównomierne. Znacznie mniej występuje w regionach bogatych w AT, zaś zdecydowanie więcej – w obszarach bogatych w GC. Sekwencje bogate w GC znaleziono w regionach promotorowych i w 5' regionach wielu genów, które tym samym są bardziej podatne na metylację niż inne obszary DNA. W DNA adenowirusa 12 uderzające jest nagromadzenie dinukleotydów CpG w sekwencjach CCGG i GCGC w obszarze 5' końca regionu E1, który dzięki temu kontroluje ekspresję wszystkich innych regionów tego genomu [1].

Obecność metylowanych zasad w cząsteczce DNA wywiera istotny wpływ na konformację podwójnego heliksu. Wiadomo, że mC stabilizuje tę strukturę, natomiast mA wywiera efekt przeciwny. Ma to określone skutki biologiczne. Metylacja *CG box* w regionie promotorowym genów konstytutywnych może wykluczać dostęp cząsteczek polimerazy RNA do sąsiadujących z nimi *TATA box*, w wyniku czego następuje zahamowanie transkrypcji [1]. Z kolei metylacja A w obszarze sekwencji GATC skupionych wokół miejsc *ori* u *E. coli* może brać udział w rozplataniu heliksu DNA niezbędnym przy inicjacji replikacji DNA. U *Prokaryota* (m.in. u *E. coli*) charakterystycznym elementem w obszarze *ori* jest obecność wielokrotnie powtórzonej sekwencji GATC. Są to sekwencje ulegające metylacji przez tzw. Dam metylazy i replikacja jest wyraźnie ograniczona (ale nie całkowicie zahamowana) pod nieobecność tego enzymu [1] wskutek braku destabilizacji DNA w *ori*.

Innym istotnym efektem mC jest zwiększenie prawdopodobieństwa, że naprężenie DNA będzie przybierać konformację Z. Wnioski takie wyciągnięto z badań *in vitro*, ale dowody na istnienie Z DNA *in vivo* są jeszcze kontrowersyjne [1, 7].

W komórkach zwierzęcych wykazano, że w danym genie, który uległ aktywnej ekspresji w jednym narządzie lub tkance, sekwencje CCGG nie były metylowane (lub bardzo słabo), w innych narządach lub tkankach DNA tego samego genu, w których nie ulegał on ekspresji, sekwencje te były całkowicie zmetylowane [5, 7]. Tę odwrotną zależność między poziomem ekspresji genów a stopniem ich metylacji wykazano na wielu przykładach i w wielu przypadkach takie wnioski dotyczą innych niż CCGG sekwencji zawierających dinukleotyd CG. Identyczne wnioski wyciągnięto z wyników badań prowadzonych *in vitro*, m.in. na jądrach oocytów *Xenopus* i na hodowlach komórkowych ssaków.

Prace Murraya i wsp. (ref. [1]) prowadzone na ludzkim genomie γ -globiny wykazały, że wymagana jest pewna minimalna długość odcinka DNA wolnego od mC, aby zaszła transkrypcja. Geny mogą być transkrybowane, jeśli obecne w nich dinukleotydy CG są usunięte z regionów promotorowych genów przez "uszkodzenie" metylacji w ich obszarze; efekt ten może być wywołany przez zahamowanie metylaz, czyli wzmoczoną produkcję białek wiążących metylotransferazy [1].

Również u roślin poziom metylacji DNA jest modyfikowany podczas rozwoju i różnicowania. Tkanki, w których dany gen ulega ekspresji, zawierają mniej mC w porównaniu z tkankami, w których ten gen jest nieaktywny [18]. Badania z lat 1981–1989 wykazały, że synteza rRNA, specyficzna ekspresja genów kodujących białka zapasowe u kukurydzy oraz transkrypcyjna regulacja jądrowych genów dla fotosyntezy wydają się być związane z poziomem metylacji cytozyny [22].

METODY OZNACZANIA POZIOMU METYLACJI DNA

W badaniach nad poziomem metylacji DNA w zakresie metod biochemicznych dominują cztery techniki, z których każda ma określone zalety, a informacje wynikające z ich zastosowania wzajemnie się uzupełniają [4, 6, 7, 8]. Do metod tych należą: HPLC (wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa) [5, 12, 15, 20, 21], analiza najbliższego sąsiada (*nearest neighbor analysis*) oraz dwie najnowsze techniki, związane z rozwojem metod rekombinacji DNA, a mianowicie analiza restrykcyjna i sekwencjonowanie genomu. Jako

inne stosowane metody należy wymienić chromatografię dwukierunkową i immunofluorescencję [7]. Każda z wymienionych technik dostarcza innego typu informacji.

W ciągu ostatnich kilku lat opracowano również kilka nowych metod dla komórek zwierzęcych, umożliwiających badania metylacji DNA *in situ*.

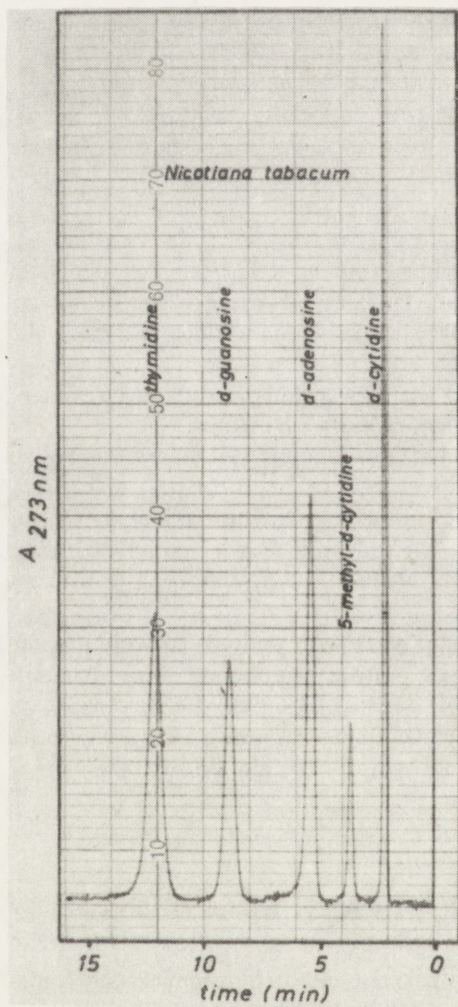
TECHNIKI BIOCHEMICZNE

HPLC

Najistotniejszymi zaletami tej metody są: bardzo mała ilość DNA niezbędna do wykonania oznaczenia (10 μg), krótki czas oznaczania (15–20 min) oraz fakt, że zawartość metylowanych zasad w badanych frakcjach może być na minimalnym poziomie. Rozdział chromatograficzny porównany z odpowiednimi standardami daje jednoznaczny obraz poszczególnych frakcji (rys. 1). Metoda HPLC jest oparta na rozdziale monofosforanów nukleotydów, nukleotydów lub wolnych zasad DNA. Rozdział chromatograficzny poprzedzony jest chemiczną lub enzymatyczną hydrolizą DNA. Hydroliza musi być całkowita. Hydroliza chemiczna jest prowadzona przy pomocy np. kwasu mrówkowego, zaś enzymatyczna – np. w układzie DNaza I – fosfodiesteraza lub nukleaza P1 – fosfataza alkaliczna. Uzyskany hydrolizat наносzony jest na kolumnę chromatograficzną, a następnie poszczególne jego frakcje są eluowane. Wykrycie zasad odbywa się przy 273 nm (rys. 1).

ANALIZA NAJBLIŻSZEGO SĄSIADA (NEAREST-NEIGHBOR ANALYSIS)

Według tej metody [20] genomowy DNA poddawany jest losowemu rozcinaniu, a następnie znakowany na końcach powstałych przerw przy pomocy DNA polimerazy I z *E. coli* z zastosowaniem jednego z czterech 2'-



Rys. 1. Rozdział nukleotydów z DNA tytoniu za pomocą HPLC; na podstawie chromatogramu wyznaczona była procentowa zawartość poszczególnych nukleotydów (w tym 5-mC; wg [21])

deoksyrybonukleotydów-5'-trifosforanów (dGTP, dCTP, dATP, dTTP) znakowanych ^{32}P w pozycji α . Wyznakowany DNA jest trawiony fosfodiesterazą i nukleazą mikrokokalną do 2'-deoksynukleozydo-3'-monofosforanów. W wyniku tej hydrolizy ^{32}P przenoszony jest w DNA z przyłączonego nukleotydu na sąsiedni. Znakowane nukleotydy są rozdzielane na celulozie poprzez dwukierunkową chromatografię cienkowarstwową, a chromatogram poddawany autoradiografii. Porównanie radioaktywności plam pochodzących z 5-m-dCMP i dCMP odbywa się poprzez pomiar densytometryczny.

ANALIZA RESTRYKCYJNA

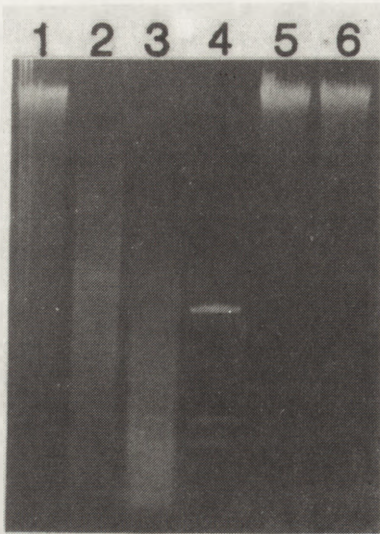
Podstawową zaletą tej metody [1, 4] jest możliwość stwierdzenia lokalizacji metylowanych zasad w obrębie określonych sekwencji nukleotydowych. Technika ta jest oparta na hydrolizie DNA enzymami restrykcyjnymi, które są wrażliwe na metylację w miejscach ich działania, tj. metylacja C lub A w obrębie rozpoznawanej sekwencji hamuje działanie enzymu (tab. 1).

TABELA 1. Efekt metylacji C i A na rozcinanie roślinnego DNA wybranymi enzymami restrykcyjnymi

Enzym restrykcyjny	Sekwencja rozcinana	Sekwencja nierozcinana
Hpa II	C/CGG	CmCGG; mCCGG
Msp I	C/CGG;C/mCGG	mCCGG
Hha I	GCG/C	GmCGC;GCGmC
Sma I	CCC/GGG	CCmCGGG
Pst I	CTGCA/G	mCTGmCAG ; mCTGCAG; CTGmCAG
Mbo I	/GATC	GmATC
Sau 3 A	/GATC	GATmC
Dpn I	GmA/TC	GATC

Trawiony DNA jest poddawany elektroforezie w żelach agarozowych, przenoszony na nitrocelulozę, hybrydyzowany ze specyficznymi sondami i poddawany autoradiografii. W tej technice podstawową sprawą jest odpowiedni dobór enzymów, tj. takich, które rozpoznają te same sekwencje, ale wykazują inny poziom wrażliwości na efekty metylacji zasad lub są hamowane przez metylację różnych nukleotydów w rozpoznawanej sekwencji; są to tzw. izoschizomery (tab. 1).

Przykładami najczęściej stosowanych zestawów enzymatycznych są Hpa II i Msp I. Pierwszy z wymienionych enzymów bez przeszkód rozcina układ sekwencji C/CGG, natomiast metylacja dowolnej z dwu cytozyn (tj. mCCGG lub CmCGG) hamuje działanie restryktazy. Drugi z pary izoschizomerów – Msp I – jest wrażliwy na metylację skrajnej 5'-cytozyny (tj. mCCGG). Rozcina zarówno sekwencje CCGG, jak i CmCGG. Porównanie wzorów restrykcyjnych powstałych po trawieniu DNA wymienionymi enzymami stanowi podstawę do wyciągania wniosków o stopniu metylacji i lokalizacji takich zasad w obrębie badanych sekwencji (rys. 2). Analogiczne testy można wykonać stosując szereg innych zestawów enzymów (m.in. Sau 3 A – Mbo I – Dpn I, a także niezależnie Sal I, Pst I, EcoRII, Pvu II). Im szerszy wachlarz restryktaz zostanie użyty do trawień DNA, tym bardziej precyzyjne analizy dotyczące metylacji mogą być dokonane (rys. 2).



Rys. 2. Elektroforeza produktów hydrolizy DNA enzymami restrykcyjnymi; w kolejnych kanałach DNA trawiony: 1 – Dpn I; 2 – Sau 3 A; 3 – Mbo I; 4 – standardy mas; 5 – Msp I; 6 – Hpa II; analiza wyników wskazuje na: wysoki poziom metylacji sekwencji CCGG (kanał 5 i 6) związanej z obecnością 5-mC zarówno w pozycji skrajnej, jak i wewnętrznej; znikomy % mA w sekwencji GATC (kanały 1 i 3); nieznaczny % mC w sekwencji GATC (kanał 2); przewagę mC nad mA w sekwencji GATC (dane własne autorów)

SEKWENCJONOWANIE GENOMOWEGO DNA

Metoda ta [1] mogła być wprowadzona dzięki opracowaniu techniki sekwencjonowania DNA opracowanych przez Gilberta i Maxama (G-M, metoda chemiczna). W metodzie G-M wśród produktów hydrolizy DNA pod wpływem działania piperydyny nie pojawia się 5-mC. Dzieje się tak, ponieważ 5-mC jest znacznie mniej podatna na działanie hydrazyny niż tymina czy cytozyna. Autoradiogram żelu sekwencyjnego w kanale odpowiadającym reakcji C wykazuje w przypadku obecności 5-mC wyraźny brak prążka C. Natomiast obecność mC w tym miejscu można stwierdzić poprzez sekwencjonowanie nici komplementarnej, na której powinien być obecny prążek G.

Opisana wyżej technika zastosowana była po raz pierwszy do analizy wzoru metylacji sekwencji nukleotydowych końca 5' genu dehydrogenazy alkoholowej kukurydzy [1, 20], stosowana jest ona w przypadku analizy sekwencji określonych genów lub ich regionów promotorowych.

METODY CYTOCHEMICZNE

Hemimetylacja DNA i demetylacja DNA są stosowane nie tylko w badaniach cytochemicznych, ale również jako zabieg doświadczalny, którego skutki są badane metodami biochemicznymi.

HEMIMETYLACJA DNA

Metoda ta (ang. *hemimethylation*) polega na syntezie *in vitro* drugiej nici DNA z zastosowaniem jako wzorca niezmetylowanej nici DNA w obecności 5-mdCTP zamiast dCTP. Kontrolę poziomu metylacji zsyntetyzowanego w ten sposób DNA przeprowadza się przez porównanie efektu enzymów restrykcyjnych (por. Analiza restrykcyjna, s. 257), rozcinających analogiczne sekwencje, lecz zawierające mC [22].

DEMETYLACJA DNA Z ZASTOSOWANIEM 5-AZA C

Jest to jedna z metod umożliwiających wykazanie, że metylacja DNA rzeczywiście hamuje ekspresję genów. Polega ona na usunięciu tej modyfikacji przez inkubację materiału biologicznego z 5-azaC. Związek ten, będący analogiem C, włącza się do DNA podczas fazy S cyklu komórkowego, działając jako niekompetencyjny inhibitor metylazy. Reszty metylowe są usuwane podczas replikacji DNA, w wyniku czego może po pewnym czasie nastąpić reaktywacja genów [4].

TRAWIENIE ENZYMAMI RESTRYKCYJNYMI IN SITU

Podstawy tej metody, mającej zastosowanie do preparatów cytologicznych, zostały opisane wcześniej [16]. Porównanie preparatów kontrolnych (nie trawionych) i trawionych przez izoschizomerowe pary enzymów restrykcyjnych (por. Analiza restrykcyjna) pozwala na wyszukanie w chromosomach miejsc wytrawionych, tj. niewybarwionych lub barwiących się słabo, a więc na wnioskowanie o chromosomowej lokalizacji DNA szczególnie bogatego w 5-mC [3]. U człowieka i moskita zwykle miejscami takimi są obszary heterochromatyny [3]. DNA chromosom B z nieaktywnym NOR jest zmetylowany, w przeciwieństwie do chromosomów standardowych [15].

METYLACJA DNA IN SITU

Metoda ta [10] polega na inkubacji preparatów cytologicznych w roztworze m-Alu I w obecności ^3H SAM jako dawcy – CH_3 . Przedmiotem analizy mikroskopowej są autoradiogramy. Rozmieszczenie ziaren srebra wzdłuż chromosomów pozwala na bezpośrednią wizualizację niemetylowanego i zmetylowanego DNA zawierającego sekwencję AGCT. W chromosomach człowieka wykazano w ten sposób [10] obszary chromosomów nie zawierające tych sekwencji docelowych dla m-Alu I.

NICK-TRANSLATION IN SITU

W technice tej [19] DNaza I w klasycznej metodzie *nick-translation* in situ (por. [16]) jest zastąpiona przez enzymy restrykcyjne rozcinające sekwencje zawierające mC (tab. 1). Po zastosowaniu do *nick-translation* Hpa II i Msp I oraz ^3H TTP, lokalizacja ziaren srebra w autoradiogramach wskazuje na miejsce w chromosomach metafazowych, w których znajdują się sekwencje docelowe dla zastosowanego enzymu restrykcyjnego, zawierające mC. U kobiet nieaktywny chromosom X wykazuje większą zawartość mC niż aktywny [19].

ROZMIESZCZENIE METYLOWANEGO DNA
W GENOMIE ROŚLIN I JEGO ROLA W EKSPRESJI GENÓW

Zamieszczone poniżej informacje pozwalają na zorientowanie się w aktualnych kierunkach badań nad rolą metylacji DNA u roślin wyższych.

LOKALIZACJA METYLOWANYCH SEKWENCJI W GENOMIE

W genomie tytoniu stwierdzono obecność rodziny powtarzalnego DNA, składającej się z tandemowo ułożonych sekwencji długości 182–184 bp. Analiza restrykcyjna (por. s. 257)

tych sekwencji wykazała wysoki poziom metylacji, która występuje w dinukleotydzie CpG, głównie w sekwencji CCGG. Po inkubacji z 5-azaC (por. Demetylacja DNA z zastosowaniem 5-aza-C, s. 259) następuje znaczne obniżenie metylacji. Hybrydyzacja in situ wymienionych sekwencji pozwoliła na stwierdzenie, że są one zlokalizowane w obszarach telomerowych chromosomów metafazowych [2]. Na podstawie struktury badanych sekwencji można przypuścić, że wchodzi one w skład heterochromatyny telomerowej.

BIĄŁKA – INDIKATORY METYLACJI DNA

U roślin, analogicznie jak u ssaków, występują białka stanowiące czynnik aktywacji transkrypcji, specyficznie wiążąca się do 5'-TGACGTCA-3'. Znalezione je w ekstraktach jądrowych nasion grochu, siewek pszenicy, liści soi oraz w kalafiorze. Metylacja cytozyny hamuje wiązanie tego białka u wszystkich wymienionych gatunków. Jest ono zatem uważane za wskaźnik metylacji DNA. Metylacja cytozyny w odpowiednich sekwencjach DNA, np. w przypadku genu kodującego białko bogate w prolinę, znacznie redukuje wiązanie białka – indykatora metylacji DNA [13].

EKSPRESJA GENÓW rRNA

Wiadomo, że aktywność transkrypcyjna w obszarze NOR jest niska w niektórych tkankach roślinnych: merystem korzeniowy charakteryzuje się intensywną syntezą rRNA w porównaniu ze strefą komórek zróżnicowanych. Badania metylacji rDNA mogą się przyczynić do wyjaśnienia tego zjawiska.

Wszystkie opisane dotąd regiony NOR roślin wyższych charakteryzują się obecnością tandemowo ułożonych genów rRNA. Stosując enzymy restrykcyjne zbadano organizację zmetylowanych sekwencji powtarzalnych rDNA w młodych liściach rzodkiewki i grochu [9]. Wykazano, że ok. 20% powtarzających się sekwencji rDNA obu gatunków jest podatne na działanie enzymów restrykcyjnych wrażliwych na metylację (por. Analiza restrykcyjna, s.257). Nie stwierdzono, aby metylacja rDNA występowała w obszarach tzw. bloków. Wykazano natomiast, że w obu gatunkach metylowane sekwencje są rozproszone w sposób przypadkowy, tj. na przemian występują sekwencje metylowane i niemetylowane. Zjawisko to zachodzi, mimo że sekwencje potencjalnie zdolne do metylacji, tj. CpG i CpXpG, są obecne zarówno w obszarach metylowanych, jak i nie metylowanych [9].

EKSPRESJA GENU *GUS* W KOMÓRKACH TRANSFORMOWANYCH

Hemimetylacja (por. HPLC, s. 256) zintegrowanego genu zawierającego promotor 35 S wirusa mozaiki kalafiora oraz region kodujący *GUS* (gen reporterowy powszechnie stosowany jako sygnał transformacji komórek roślinnych) powodowała obniżenie ekspresji *GUS* w protoplastach tytoniu; różnice były nawet przeszło stukrotne w porównaniu z materiałem kontrolnym, lecz odmienne w poszczególnych liniach transgenicznym [22]. Natomiast inkubacja z 5-azaC (por. Demetylacja DNA z zastosowaniem 5-azaC, s.259) prowadziła do tysiąckrotnego wzrostu syntezy *GUS* w niektórych liniach transformantów tytoniu. Optymalna koncentracja 5-azaC dla aktywacji tego genu w protoplastach tytoniu wynosiła 10–20 μ M, zaś okres inkubacji 4–5 dni; wyższe stężenie 5-azaC lub przedłużenie okresu jej działania powodowało uszkodzenie komórek, a także efekt letalny [22]. 5-azaC odwracała skutki hemimetylacji DNA: u roślin zregenerowanych, uzyskanych z linii zawie-

rającej zintegrowany gen *GUS* poddany hemimetylacji, a następnie demetylacji z zastosowaniem 5-azaC, synteza *GUS* była przeszło dwukrotnie wyższa niż w linii wyjściowej (tj. zawierającej zmetylowany DNA) [22]. Przytoczone wyniki jednoznacznie wskazują na hamujący ekspresję genów efekt metylacji DNA.

POZIOM METYLACJI W RÓŻNYCH TKANKACH

Nieliczne badania tego typu nie dostarczyły jednoznacznych wyników świadczących o związku między poziomem metylacji DNA a ekspresją genów.

W igłach modrzewia, zarówno z młodych jak i dojrzałych pędów, poziom metylacji DNA był taki sam i wynosił 20%, mimo większej dynamiki rozwojowej tych pierwszych [11]. W różnych tkankach i narządach marchwi [18] poziom metylacji DNA wahał się od 17,8% w korzeniu zapasowym do 25,8% w zarodkach somatycznych (tj. uzyskanych *in vitro* bez zapłodnienia). DNA liści, w miarę ich starzenia, ulega stopniowej metylacji od 18,5% w siewce do 24,0% w dojrzałej roślinie [18]. Zaskakującym wynikiem było stwierdzenie, że zarówno tworzenie kalusa z wycinków hypokotyli, co jest związane z dedyferencjacją komórek, jak i powstawaniu w zawieszinach komórkowych wysoce zorganizowanych narządów, jakimi są zarodki somatyczne, towarzyszy zwiększenie poziomu metylacji DNA [18]. Wydaje się zatem, że u marchwi brak jest (z wyjątkiem liści) bezpośredniego związku między wiekiem lub stadium różnicowania tkanek a poziomem metylacji ich DNA.

W korzeniach cebuli [8] poziom metylacji DNA był najwyższy w odcinku merystematycznym, zawierającym komórki proliferujące, zaś najniższy – w strefie korzenia, w której różnicowanie komórek można uznać za zakończone (11–17 mm od szczytu korzenia); jest to więc wynik podobny do uzyskanego na korzeniach marchwi [18]. Zdaniem autorów [8], w strefie ponadmerystematycznej zachodziła intensywna synteza RNA, co miałoby świadczyć o odwrotnej zależności między nasileniem metylacji a aktywnością transkrypcyjną. Jednakże wniosek ten jest oparty na niewłaściwie uzyskanych danych dotyczących syntezy RNA: biorąc pod uwagę dynamikę wzrostu i różnicowania korzeni, w ciągu długiej, 4–5-dniowej inkubacji z ^3H urydyną, przeprowadzonej w omawianych doświadczeniach, pod koniec inkubacji w strefach ponadmerystematycznych znalazły się komórki, które w pierwszym okresie eksperymentu były w strefie merystematycznej, tj. charakteryzowały się o wiele wyższą aktywnością transkrypcyjną niż odcinki ponadmerystematyczne.

WNIOSKI

Mimo wiarygodnych metod umożliwiających badanie poziomu metylacji DNA, stan zaawansowania takich badań w odniesieniu do materiału roślinnego jest wysoce niezadowalający, szczególnie w porównaniu z materiałem zwierzęcym. Może to być związane m.in. z mniej wyrazistymi modelami różnicowania u roślin. Wyniki uzyskane na roślinnych komórkach transformowanych [22] oraz dotyczące heterochromatyny [2] jednoznacznie wskazują na związek między poziomem metylacji DNA a ekspresją genów. W odniesieniu do tkanek o różnym stopniu zróżnicowania i różnym stopniu specjalizacji w ekspresji genów, wyniki – jak dotąd – są sprzeczne, a nawet zaskakujące. Należy sądzić, że właściwy

dobór modeli doświadczalnych pozwoli w przyszłości na ostateczne rozstrzygnięcie roli metylacji DNA w regulacji wzrostu i różnicowania u roślin.

LITERATURA

- [1] ADAMS RLP. DNA methylation. The effect of minor bases on DNA-protein interactions. *Biochem J* 1990; **265**: 309–320.
- [2] BEZDĚK M, KOUKALOVÁ B, BRZOBOHATÝ B, VYSKOT B. 5-azacytidine-induced hypomethylation of tobacco HRS60 tandem DNA repeats in tissue culture. *Planta* 1991; **184**: 487–490.
- [3] BIANCHI NO, VIDAL-RIOJA L, CLEAVER JE. Direct visualisation of the sites of DNA methylation in human, and mosquito chromosomes. *Chromosoma* 1886; **9**: 362–366.
- [4] CEDAR H, RAZIN A. DNA methylation and development. *Biochem Bioph Acta* 1990; **1049**: 1–8.
- [5] COOPER DN. Eukaryotic DNA methylation. *Human Genet* 1983; **64**: 315–333.
- [6] DHAR MS, PETHE VV, GUPTA VS, KANJEKAR PV. Predominance of tissue specificity of adenine methylation in rice. *Theor Appl Genet* 1990; **80**: 402–408.
- [7] DOEFLER W. DNA methylation and gene activity. *Ann Rev Biochem* 1983; **52**: 93–124.
- [8] DURANTE M, FREDIANI M, MARIANI L, CITTI L, GERI C, CREMONINI R. Differentiation of metaxylem cell line in the root of *Allium cepa* L. *Protoplasma* 1990; **158**: 149–154.
- [9] ELIS THN, DELSNEY M, LEE D, BURCHAM KWG. Methylated and undermethylated rDNA repeats are interspersed at random in two higher plant species. *Plant Mol Biol* 1989; **14**: 73–80.
- [10] FERNÁNDEZ-PIQUERA J, LUDENA PP, SENTIS C. In situ methylation of human chromosomes with methylase-Alu I. *Cytogenet Cell Genet* 1989; **52**: 93–94.
- [11] GREENWOOD MS, HOPPER CA, HUTCHISON KW. Maturation in larch. I Effect of age on shoot growth, foliar characteristics, and DNA methylation. *Plant Physiol* 1989; **90**: 406–412.
- [12] HOWLETT D, DALRYMPLE S, MAYS-HOPPE LL. Age-related demethylation of mouse satellite DNA is easily detectable by HPLC but not by restriction endonucleases. *Mutation Res* 1989; **219**: 101–106.
- [13] INDAMAR NM, EHRLICH KC, EHRLICH M. CpG methylation inhibits binding of several sequence-specific DNA-binding proteins from pea, wheat, soybean and cauliflower. *Plant Mol Biol* 1991; **17**: 111–123.
- [14] LEWIS J, BIRD A. DNA methylation and chromatin structure. *FEBS Lett* 1991; **285**: 155–159.
- [15] LOPEZ-LEON MD, CABRERO J, CAMACHO JMP. A nucleolus organizer region in a B chromosome inactivated by DNA methylation. *Chromosoma* 1991; **100**: 134–138.
- [16] OLSZEWSKA MJ, GERNAND D. Zastosowanie endonukleaz w badaniach cytogenetycznych. *Post Biol Kom* 1989; **16**: 213–223.
- [17] PALMGREN G, MATTSON O, OKKELS FT. Employment of hydrolytic enzymes in the study of the level of DNA methylation. *Biochem Bioph Acta* 1990; **1049**: 293–297.
- [18] PALMGREN G, MATTSON O, OKKELS FT. Specific levels of DNA methylation in various tissues, cell lines, and cell types of *Daucus carota*. *Plant Physiol* 1991; **95**: 174–178.
- [19] PRANTERA G, FERRARO M. Analysis of methylation and distribution of CpG sequences on human active and inactive chromosomes by in situ nick translation. *Chromosoma* 1990; **99**: 18–23.
- [20] RAZIN A. Assays for studying DNA methylation. *Plant Mol Biol Manual*. Dordrecht: Kluwer Acad Publ 1988: 1–28.
- [21] WAGNER I, CAPESIUS I. Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by HPLC. *Biochem Bioph Acta* 1981; **654**: 52–56.
- [22] WEBER H, ZIECHMANN C, GRAESSMANN A. In vitro DNA methylation inhibits gene expression in transgenic tobacco. *EMBO J* 1990; **9**: 4409–4415.

Otrzymało 23.09.1991r.

Przyjęto 30.09.1991 r.

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

INDUKCJA ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH PRZEZ ENZYMY RESTRYKCYJNE

INDUCTION OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS BY RESTRICTION ENZYMES

Katarzyna RZEPczyńska**, Henryk HÜBNER* & **, Ewa BRZEZIAńska**

*Zakład Biologii Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi

**Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie. Przedstawiono mechanizmy indukowania aberracji chromosomowych przez restryktazy działające na komórki *in vitro*. Indukcja aberracji struktury chromosomów związana z produkowaniem przez restryktazy tępych i lepkich końców jest niezależna od fazy S cyklu komórkowego. Punkty indukowanych złamań są w chromosomach limfocytów człowieka zlokalizowane przeważnie w kruchych miejscach genomu (wysoka zawartość par GC). Liczba aberracji chromosomowych indukowanych przez restryktazy wykazuje zależność dawka–efekt. Na częstość indukowania aberracji wpływa stężenie różnych soli w środowisku hodowlanym oraz szok cieplny. Głównym typem uszkodzeń powstających pod wpływem restryktaz są pęknięcia podwójnej nici DNA. Restryktazy *in vitro* nie wpływają na wzrost częstości SCE.

Summary. The ways of *in vitro* induction of chromosome aberrations by restriction endonucleases were presented. The induction of structural aberrations by restriction enzymes is related to production of blunt and cohesive ends and it is independent of S phase of cell cycle. The points of breaks induced in human lymphocytes are mostly localized in fragile sites (high contents of GC pairs). The number of chromosomal aberrations induced by restriction enzymes shows dependence of dose-effect. The frequency of aberrations also depends on concentrations of different salts in the medium and on the effect of heat shock. Main damages induced by restriction endonucleases are breaks of double thread of DNA. Restriction enzymes do not induce the increase of SCE frequency.

Wykaz stosowanych skrótów: BrdU – bromodezoksyrydyna; CHO – komórki jajnikowe chomika chińskiego (*chinese hamster ovary*); DSB – złamania podwójnego łańcucha (*double strand break*); RE – enzymy restrykcyjne (*restriction endonucleases*); SCE – wymiana chromatyd siostrzanych (*sister chromatid exchange*); / – punkty cięcia DNA przez enzymy restrykcyjne.

WPROWADZENIE

Endonukleazy restrykcyjne typu II są bakteryjnymi enzymami mającymi zdolność cięcia podwójnego łańcucha DNA w ściśle określonych miejscach charakterystycznych dla poszczególnych enzymów [5, 27]. Rozpoznają one miejsca o specyficznych sekwencjach nukleotydowych o długości od 4 do 8 par zasad tnąc podwójny łańcuch DNA wewnątrz miejsca rozpoznawalnego lub rzadziej w pewnej odległości od niego (aż do 13 zasady). Niektóre z nich rozpoznają miejsca z wewnętrznymi dwuznacznosciami (do 6 zasad). W wyniku ich działania powstają 2 typy pęknięcia podwójnego łańcucha DNA – z tępymi i lepkimi końcami zakończonymi grupą 3'hydroksylową lub grupą 5'fosforanową. Przykłady kilku enzymów restrykcyjnych przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1. Przykłady specyficznych sekwencji ciętych przez endonukleazy restrykcyjne typu II

Enzymy indukujące DSB w DNA zakończone			
tępo enzym	miejsce cięcia	lepko enzym	miejsce cięcia
Alu I	AG/CT	Bam HI	G/GATCC
	TC/GA		CCTAG/G
EcoR V	GAT/ATC	EcoR I	G/AATTC
	CTA/TAC		CTTAA/G
Pvu II	CAG/CTG	Pvu I	CGAT/GC
	GTC/GAC		GCTAC

Ze względu na właściwości cięcia DNA w ściśle określonym miejscu restryktazy stały się wspaniałym narzędziem badawczym w biologii molekularnej. Klasyczne metody biologii molekularnej stosowane są do materiału wyizolowanego, co uniemożliwia zwykle wyciągnięcie wniosków dotyczących poszczególnych komórek na różnym etapie ich rozwoju. Zastosowanie enzymów restrykcyjnych w badaniach cytogenetycznych *in situ* umożliwiło dokładniejsze poznanie organizacji chromatyny i chromosomów metafazowych [2, 12, 16].

Okazało się, że enzymy restrykcyjne działając na utrwalone chromosomy metafazowe powodują powstawanie specyficznych dla nich wzorów prążkowych [2, 3, 4, 12, 14, 15, 17, 18, 26]. Interesujące jest zatem pytanie, jak enzymy restrykcyjne działają na chromatynę i chromosomy w żywej komórce; czy są one również zdolne do cięcia DNA w żywej komórce i z tego powodu indukują aberracje chromosomowe? Analiza ich działania powinna stwarzać również dobrą możliwość poznawania molekularnych mechanizmów powstawania mutacji genowych i aberracji chromosomowych.

INDUKCJA ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH PRZEZ ENDONUKLEAZY RESTRYKCYJNE

POBIERANIE RE PRZEZ KOMÓRKĘ EUKARIOTYCZNĄ

Endonukleazy restrykcyjne rozpoznające różne miejsca restrykcyjne, produkujące tępe i lepkie końce, są zdolne do indukcji aberracji chromosomowych w żywych komórkach. Aby móc dokonać badań porównawczych dotyczących aktywności różnych RE, trzeba wziąć pod uwagę następujące aspekty: w jaki sposób enzym dostaje się do komórki oraz czy wniknięcie różnych enzymów do komórki ma ten sam zasięg. Oba te zagadnienia nie są do tej pory jednoznacznie wyjaśnione. W badaniach, w których komórki były wcześniej poddane działaniu zinaktywowanego wirusa Sendai pośredniczącego w lepszej penetracji enzymu, nie uzyskano wzrostu liczby aberracji indukowanych przez RE w porównaniu z komórkami, które nie były wcześniej traktowane wirusem Sendai [26]. Badania te były przeprowadzane na trypsynowanych przed zebraniem komórek CHO, co być może ma wpływ na wniknięcie enzymu do komórki, bowiem zabieg ten w zależności od wieku i liczby traktowanych komórek może prowadzić do zmiany przechodzenia enzymów przez błonę komórkową. Wykazano ponadto, że przedłużenie czasu trypsynizacji i zwiększenie stężenia trypsyny powoduje spadek liczby aberracji indukowanych przez Alu I [39]. Trypsyna może również wpływać ujemnie na aktywność RE [39]. Pozyskiwanie hodowanych komórek przez zeszkrobывanie ich z dna szalki Petriego zamiast trypsynowania jest lepszą metodą, bowiem ten zabieg mechaniczny nie zmienia liczby aberracji chromosomowych. Jest możliwe, że wpływ na przepuszczalność komórek mają związki wchodzące zwykle w skład buforów, w których enzymy są zawieszane. W ich skład wchodzi ok. 50% glicerolu, związek redukujący (2-merkaptoetanol lub ditiotreitol) oraz niewielką ilość detergentów [5, 23, 26]. Winegar i Preston [39] używali metody osmotycznej lizy pęcherzyków pinocytalnych (wg Okady i Reichsteina [29]), co umożliwiło wniknięcie enzymu do żywych komórek, zwiększało przeżywalność komórek i powtarzalność wyników.

Badania, w których komórki były traktowane enzymami restrykcyjnymi i potem przenoszone do podłoża zawierającego BrdU na 18–22 h, wykazały, że chromosomy uszkodzonych komórek wybarwiały się jednolicie (znajdowały się w pierwszym cyklu komórkowym), a chromosomy różnicowo wybarwiające się (znajdujące się w drugim cyklu komórkowym) miały liczbę aberracji równą kontroli. Te wyniki wskazują na to, że tylko te komórki, które pobrały enzym, wykazywały aberracje chromosomowe [13].

INDUKCJA ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH PRZEZ ENZYMY RESTRYKCYJNE JEST NIEZALEŻNA OD FAZY S CYKLU KOMÓRKOWEGO

Podanie RE komórkom i kończenie hodowli w różnym czasie wykazało, że indukcja aberracji chromosomowych przez te enzymy jest niezależna od fazy S cyklu komórkowego. Alu I w komórkach CHO i limfocytach ludzkich powodowało powstawanie aberracji typu chromosomowego, gdy komórki pobierające enzym znajdowały się w fazie G₁ cyklu komórkowego. W komórkach znajdujących się w fazie S w czasie pobierania enzymu następowała indukcja aberracji typu chromosomowego i chromatydowego, natomiast gdy enzym był wchłonięty w fazie G₂, w takich komórkach występowały aberracje typu chromatydowego [25, 28, 39]. Również badania z Bam HI na komórkach CHO oraz w mniejszej

rozszerzenia z Pvu II [13] potwierdzają tę obserwację. Działanie enzymów restrykcyjnych jest podobne do promieniowania jonizującego lub bleomycyny, tj. nie zależy od fazy S cyklu komórkowego [23].

PUNKTY ZŁAMAŃ INDUKOWANE PRZEZ NIEKTÓRE ENZYMY RESTRYKCYJNE SĄ ZLOKALIZOWANE PRZEWAŻNIE W POWSZECHNYCH KRUCHYCH MIEJSCACH GENOMU CZŁOWIEKA

Yunis i wsp. [40] sugerują, że większość kruchych miejsc genomu człowieka może strukturalnie odpowiadać specyficznym sekwencjom DNA, tj. regulatorowym regionom bogatym w pary CG. Sekwencje DNA z wysoką zawartością GC i licznymi dwunukleotydami CpG (tzw. wyspami CpG) są często znajdowane w promotorowych regionach genów czynników wzrostu, onkogenów i genów regulatorowych [10]. Te wyspy CpG mogą zawierać miejsca docelowe takich enzymów, jak Hpa II i Msp I (C/CGG), które są izoschizomerami. Powyższe enzymy produkują prąжки R w utrwalonych chromosomach limfocytów ludzkich, które odpowiadają obszarom wczesnie replikującym. Prąжки R oraz miejsca przejścia prązków R w G są szczególnie wrażliwe na uszkodzenia.

Badania z Msp I wykazały, że indukuje on w chromosomach ludzkich limfocytów aberracje chromosomowe, wśród których 28 punktów złamań z 33 znajdowało się w miejscach kruchych genomu człowieka oraz w miejscach, gdzie zostały zmapowane onkogeny [1, 31].

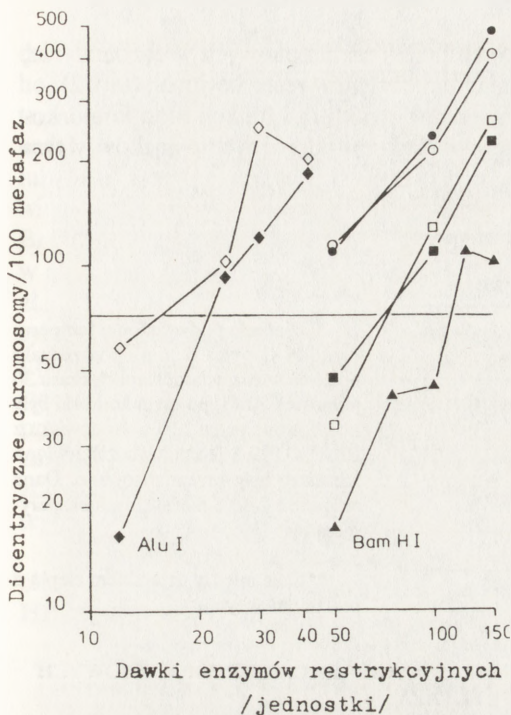
ANALIZA ILOŚCIOWA INDUKOWANIA ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH PRZEZ ENZYMY RESTRYKCYJNE

Wyniki badań nad indukcją aberracji chromosomowych przez RE charakteryzują się poważnymi różnicami ilościowymi, które są głównie wynikiem fizjologicznego stanu populacji komórek, warunków, w których były one poddawane trawieniu enzymami oraz różnic w liczbie traktowanych komórek [12]. Niezależnie od znaczenia tych czynników badania nad komórkami CHO dowiodły, że liczba chromosomowych aberracji indukowanych przez enzymy restrykcyjne wykazuje zależność dawka-efekt. Liczba policentrycznych chromosomów w komórkach znajdujących się w pierwszym cyklu komórkowym po działaniu enzymu ma w zależności od stężenia Alu I i Bam HI charakter wzrostu prawie liniowego [24] (rys. 1).

Traktowanie dużej liczby komórek (4×10^6) tą samą dawką enzymu prowadzi do mniejszej liczby aberracji w porównaniu z traktowaniem małej liczby komórek (1×10^6). Na zależność dawka-efekt ma również wpływ liczba miejsc docelowych dla danego enzymu. Wykazano, że częstotliwość aberracji nie zmienia się po zwiększeniu stężenia Pvu II powyżej 100 jednostek [5, 21].

WPLYW ENZYMÓW RESTRYKCYJNYCH NA WYMIANY CHROMATYD SIÓSTRZANYCH

Liczba SCE jest bardzo czułym testem służącym do wykrywania czynników mutagenicznych. Enzymy restrykcyjne, mimo iż są czynnikami powodującymi powstawanie aberracji chromosomowych nie wpływają jednak na wzrost liczby SCE [20, 34].



Rys. 1. Chromosomowe aberracje indukowane przez enzymy restrykcyjne; zależność dawka-efekt dla obecnych chromosomów dicentrycznych uzyskanych po działaniu Alu I lub Bam HI na komórki CHO, po podaniu enzymu hodowle kończono po 18 lub 22 h postinkubacji; do analizy brano tylko metafazy M1; ciągła linia wskazuje liczbę dicentrycznych chromosomów na 100 metafaz po naświetlaniu komórek CHO promieniami X 4 Gy, 50 kV (opracowano wg Obe i Johannes [24]):

- ◇ Działanie na 1×10^6 komórek Alu I, czas postinkubacji 22 h,
- ◆ Działanie na 4×10^6 komórek Alu I, czas postinkubacji 22 h,
- Działanie na 1×10^6 komórek Bam HI i $3,2 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, czas postinkubacji 18 h,
- Działanie na 1×10^6 komórek Bam HI i $3,2 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, czas postinkubacji 22 h,
- Działanie na 1×10^6 komórek Bam HI, czas postinkubacji 22 h,
- ▲ Działanie na 4×10^6 komórek Bam HI, czas postinkubacji 18 h,
- Działanie na 1×10^6 komórek Bam HI, czas postinkubacji 18 h

LICZBA MIEJSC DOCELOWYCH ORAZ ICH DOSTĘPNOŚĆ JEST GŁÓWNYM CZYNNIKIEM INDUKCJI ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH PRZEZ ENZYMY RESTRYKCYJNE

BADANIA PORÓWNAWCZE Z UŻYCIEM RÓŻNYCH ENZYMÓW

Badania porównawcze działania różnych enzymów na ten sam typ komórek wykazały różnice w liczbie indukowanych przez nie aberracji, co jest spowodowane obecnością miejsc docelowych dla każdego enzymu [12]. Wysoka efektywność Alu I w powodowaniu złamań chromosomów ssaków jest spowodowana dużą powtarzalnością sekwencji Alu I w ich genomie.

SZOK CIEPLNY

Dewey i wsp. [8] wykazali, że w komórkach CHO podwyższenie temperatury ich hodowli prowadzi do powstawania aberracji chromosomowych. Mechanizm powstawania aberracji pod wpływem ciepła nie jest dokładnie poznany. Podwyższenie temperatury wzmacnia mutagenną aktywność związków alkilujących; proces ten jest zależny od fazy S cyklu komórkowego [32]. Podjęto badania nad skojarzonym działaniem temperatury i RE na powstawanie aberracji chromosomowych. Gdy komórki poddawano przez 6 min działaniu temp. 46°C i następnie dodawano Alu I, efekt wywoływania aberracji przez endonukleazy był słabszy w porównaniu z hodowlami, których nie poddano działaniu podwyższonej temperatury. Efekt ten utrzymywał się przez 5 h. Działanie podwyższonej

temperatury powoduje akumulację dodatkowych białek niehistonowych w chromatynie, które ochraniają miejsca docelowe przed działaniem enzymów restrykcyjnych (tab. 2).

Szok cieplny może również mieć wpływ na zmianę struktury i funkcji błon komórkowych, przez co może mieć związek z pobieraniem przez komórkę różnych związków, w tym również mutagennych [35].

TABELA 2. Liczba dicentrycznych chromosomów indukowanych działaniem podwyższonej temperatury* oraz Alu I (tabelę zestawiono wg danych Vasudeva i Obe [38])

Ciepło	Alu I	Czas**[h]	Liczba dicentryków na 100 metafaz
-	-	0	2
-	+	0	77
+	-	0	0
+	+	0	23
+	+	1	47
+	+	5	24
+	+	22	64

*Działanie podwyższonej temperatury (46°C przez 6 min) poprzedzało podanie w różnych odstępach czasu 30 jednostek Alu I, po czym komórki były inkubowane przez 22 h w środowisku z BrdU. Tylko jednakowo zabarwione metafazy były przeanalizowane. Dane zebrane z 2 do 6 niezależnych eksperymentów.

**Czas między działaniem ciepła a podaniem enzymu

WPLYW STĘŻENIA SOLI NA CZĘSTOŚĆ INDUKOWANIA ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH PRZEZ RESTRYKTAZY

Wyróżnia się trzy główne zmiany w superstrukturze chromatyny, które mogą następować pod wpływem wysokiego stężenia różnych soli:

- po pierwsze wysokie stężenie soli powoduje częściową dehistonizację chromatyny w żywej komórce prowadząc do ujawnienia większej liczby miejsc docelowych dla enzymu;
- po wtóre pod wpływem wysokiego stężenia soli następuje przejście formy B w formę Z DNA, co może mieć wpływ na większą podatność DNA na złamania indukowane przez enzymy restrykcyjne;
- po trzecie usunięcie białek z chromatyny pod wpływem soli może uszkadzać systemy naprawy DNA;
- po czwarte wysokie stężenie soli może zmieniać wybiórczą przepuszczalność błon komórkowych, a tym samym mieć wpływ na przenikanie enzymów do wnętrza komórki [37].

Te wszystkie zmiany są odpowiedzialne za wzrost liczby aberracji chromosomowych indukowanych w ludzkich limfocytach przez Alu I w obecności 3,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [24, 37]; w komórkach CHO w obecności 3,2 M NaCl oraz 1,6 M CaCl [22, 37], MgCl_2 [37]. Dodanie soli nawet po 40 min od podania enzymu (Alu I) prowadzi również do znacznego wzrostu liczby aberracji. To dowodzi, że Alu I po dostaniu się do jądra komórkowego jest aktywny przez dłuższy czas [22].

MODYFIKACJA MIEJSC DOCELOWYCH

PODSTAWIENIE ANALOGÓW ZASAD AZOTOWYCH

Inną możliwością pogłębienia wiedzy o mechanizmie indukcji aberracji chromosomowych przez enzymy restrykcyjne jest badanie wpływu podstawienia tyminy przez bromo-

dezoksyurydynę (B) w miejscu rozpoznawalnym dla enzymu. Eksperyment, w którym hodowla komórek CHO była najpierw poddana działaniu BrdU przez 15 h i później traktowana Dra I (TTT/AAA), a plon komórkowy był zbierany po dalszych 16 h hodowania w nieobecności BrdU, wykazał, że metafazy różnicowo zabarwione (podstawienie TB-BT lub TB-TT) miały znacznie mniej aberracji w porównaniu z metafazami jednolicie wybarwionymi (TT-TT). Również w przypadku działania Alu I (AG-CT) podstawienie T przez BrdU prowadziło do obniżenia liczby aberracji, pomimo iż T jest drugą od miejsca łamania w docelowym miejscu dla tego enzymu, w przypadku Dra I znajduje się ona w miejscu złamania. Petruska i Horn [30] przebadali trawienie DNA z komórek czerniaka chomika syryjskiego (który był w 100% podstawiony przez BrdU) przez Hpa I (GTT/AAC) i Mbo I (/GATC). Wykazano, że w przypadku Hpa I podstawienie BrdU hamuje osmiokrotnie cięcie DNA przez ten enzym, a stymuluje pięciokrotnie działanie Mbo I. Tymidyna w przypadku Hpa I przylega bezpośrednio do miejsca złamania, co jest powodem tak znacznego hamowania, natomiast w przypadku Mbo I T jest na trzeciej pozycji od miejsca złamania i podstawienie jej przez BrdU powoduje prawdopodobnie słabsze wiązanie się tego enzymu z DNA.

Także podstawienie DNA grupą fosforotiodanową w pozycji alfa prowadzi do inhibicji cięcia łańcucha DNA, w którym ta grupa została podstawiona przez takie enzymy jak: Bam HI, EcoR I, Hha I, Msp I, Hpa II, Hind III, Pvu II, Sac I oraz EcoR V [33] (tab. 3).

TABELA 3. Działanie endonukleaz restrykcyjnych na DNA zawierający w łańcuchu (-) grupy fosforotiodanowe w ich rozpoznawalnych sekwencjach (miejsce cięcia oznaczono jako /; As, Cs, Gs – nukleotydy z grupą fosforotiodanową; wg Sayersa i wsp. [33])

Enzym	Miejsce docelowe	Enzym	Miejsce docelowe
Bam HI	+5'-G/G A T C C -3'-C C T AsGsGs	Hpa II	+5'-C/C G G -3'-GsGsCsCs
EcoR I	+5'-G/A A T T C -3'-C T T AsAsGs	Hind III	+5'-A/A G C T T -3'-TsTsC G AsAs
Hha I	+5'-G C G/C -3'-CsGsCsGs	Pvu II	+5'-C A G/C T G -3'-GsT CsGsA Cs
Msp I	+5'-C/C G G -3'-GsGsCsCs	Sac I	+5'-G A G C T/C -3'-CsT CsGsA Gs
EcoR V	+5'-G A T/A T C -3'-C T AsT AsG		

METYLACJA ZASAD AZOTOWYCH

Metylacja, zwłaszcza cytozyny, gra ważną rolę w ekspresji genomów. Modyfikacja ta również wpływa na aktywność enzymów restrykcyjnych. Hpa II i Msp I są izoschizomerami mającymi miejsce rozpoznawalne CC/GG. Sekwencja ta jest wysoce zmetylowana w komórkach ssaków i metylacja środkowej cytozyny hamuje działanie Hpa II [26].

Również Alu I jest wrażliwy na metylację. Alu I indukuje powstawanie wzoru prążkowego podobnego do prążków C w chromosomach metafazowych. Metylacja w miejscach rozpoznawalnych dla tego enzymu powoduje, że ten charakterystyczny wzór nie powstaje [9]. Również Dpn I i Dpn II tną DNA w miejscu GA/TC z tym, że pierwszy z nich tnie tylko te sekwencje, w których jest zmetylowana guanina [7].

WPŁYW PĘKNIĘĆ PODWÓJNYCH ŁAŃCUCHÓW DNA NA INDUKOWANIE ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH PRZEZ ENZYMY RESTRYKCYJNE

Porównawcze badania nad różnymi typami enzymów restrykcyjnych produkujących pęknięcia łańcuchów DNA z tępymi i lepkimi końcami wykazały, iż są one również efektywne w indukcji aberracji chromosomowych. Badania porównawcze nad Sau 3A (/GATC-lepkie końce) i Alu I (AG/CT-tępe końce) wykazały, że Sau 3A jest prawie tak samo efektywny jak Alu I [39]. Jednak badania Bryanta [5], Natarajana i Obe [21] oraz Bryanta i Christie [6] nie potwierdzają jednoznacznie tego stwierdzenia. Autorzy ci porównując liczbę sekwencji DNA dla Bam HI (ok. 5500 w genomie), dla EcoR I (ok. 3000 w genomie) oraz dla Pvu II (ok. 3200 w genomie) z ich efektywnością indukcji aberracji chromosomowych wykazali, iż Pvu II powodujący powstawanie tępych końców był bardziej efektywny w indukcji aberracji niż dwa pozostałe enzymy, które po działaniu pozostawiały lepkie końce.

Na różną liczbę aberracji chromosomowych otrzymanych po działaniu enzymami restrykcyjnymi indukującymi powstawanie tępych i lepkich końców mają jednak wpływ systemy naprawy DNA, które szybciej naprawiają uszkodzenia o lepkich końcach [4, 36].

PĘKNIĘCIA OBU ŁAŃCUCHÓW DNA SĄ JEDYNYMI USZKODZENIAMI DLA POWSTAWANIA ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH

Enzymy restrykcyjne wydają się być zdolne do cięcia jednołańcuchowego DNA lub jednego łańcucha w podwójnym heliksie DNA. Wykazano, że enzymy restrykcyjne są zdolne do cięcia hybryd DNA-RNA [19], co może prowadzić do powstawania pęknięć pojedynczego łańcucha DNA w obszarach, w których chromatyna jest transkrypcyjnie aktywna [27]. Niektóre z tych jednołańcuchowych pęknięć mogą być odpowiedzialne za chromatydowy typ aberracji [26].

Badania nad Alu I i endonukleazą z *Neurospora crassa*, która ma zdolność przekształcania pęknięć w pojedynczym łańcuchu DNA w podwójne, nie potwierdziły sugestii, że enzymy restrykcyjne mogą również indukować powstawanie pęknięć w pojedynczym łańcuchu DNA. Pomimo iż dodanie endonukleazy z *Neurospora crassa* do komórek uprzednio poddanych działaniu Alu I prowadziło do wzrostu liczby aberracji, to jednak okazało się, że wzrost ten był spowodowany raczej obecnością $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, który wchodził w skład buforu dla enzymu niż jego działaniem [22].

Głównym typem uszkodzeń indukowanych przez enzymy restrykcyjne są pęknięcia podwójnej spirali. Większość z tych pęknięć może być naprawiana w żywych komórkach w drodze różnych systemów naprawy uszkodzeń DNA. Badania aktywności EcoR V, Pvu II i Alu I w komórkach CHO w obecności 1-beta-D-arabinozylocytozyny (ara-C), który jest inhibitorem alfa-polimerazy i inhibuje etap ligacji, prowadzi do wzrostu aberracji chromosomowych [21, 23]. Również badania nad mutantami mającymi uszkodzony system naprawy np. XR-1, które nie mają zdolności tworzenia 3'-OH i 5'-P końców umożliwiających łączenie ich przez ligazy ssaków, charakteryzowały się wzrostem mutagenności [11].

UWAGI KOŃCOWE

Enzymy restrykcyjne są idealnym czynnikiem indukującym złamania chromosomów w różnych stadiach cyklu komórkowego. Z tego też powodu mogą one być użyte do badań nad mechanizmami powodującymi powstawanie aberracji chromosomowych oraz badań nad lokalizacją miejsc kruchych genomu człowieka. Enzymy restrykcyjne mogą również współdziałać z czynnikami mutagennymi, takimi jak np. promieniowanie X [36] czy związki alkilujące [38] powodując znaczny wzrost liczby aberracji chromosomowych.

LITERATURA

- [1] ADOLPH S, HAMEISTER H. In situ nick translation of human metaphase chromosomes with the restriction enzymes Msp I and Hpa II reveals an R-band pattern. *Cytogenet Cell Genet* 1990; 54: 132–136.
- [2] BIANCHI NO, BIANCHI MS. Analysis of the eukaryotic chromosome organization with restriction endonucleases. [w:] Obe G, Basler A (red.) *Cytogenetics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1987: 280–299.
- [3] BIANCHI NO, BIANCHI MS, CLEAVER JE. The action of ultraviolet light on the patterns of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes. *Chromosoma* 1984; 90: 133–138.
- [4] BIANCHI MS, BIANCHI NO, PANTELAS GE, WOLFF S. The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes. *Chromosoma* 1985; 91: 131–136.
- [5] BRYANT PE. Use of restriction endonucleases to study relationships between DNA double-strand breaks, chromosomal aberrations and other end-points in mammalian cells. *Int J Radiat Biol* 1988; 54: 869–890.
- [6] BRYANT PE, CHRISTIE AF. Induction of chromosomal aberrations in CHO cells by restriction endonucleases: effect of blunt- and cohesive- ended double-strand breaks in cells treated by 'pellet' methods. *Mutat Res* 1989; 213: 233–241.
- [7] CERRITELLI S, SPRINGHORN SS, LACKS SA. DpnA, a methylase for single-strand DNA in the Dnp II restriction system, and its biological function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9223–9227.
- [8] DEWEY WC, WESTRA A, MILLER HH, NAGASAWA H. Heat-induced lethality and chromosomal damage in synchronized Chinese hamster cells treated with 5-Bromodeoxyuridine. *Int J Radiat Biol* 1971; 20: 505–520.
- [9] FERNÁNDEZ-PIQUERAS J, LUDEÑA P, SENTIS C. In situ methylation of human chromosomes with methylase – Alu I. *Cytogenet Cell Genet* 1989; 52: 93–94.
- [10] GIACCIA A, MACLAREN RA, DENKO N, NICOLAOU D, STAMATO TD. Increased sensitivity to killing by restriction enzymes in the XR-1 DNA double-strand break repair-deficient mutant. *Mutat Res* 1990; 236: 67–76.
- [11] GRADINER-GARDEN M, FROMMER M. CpG island in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987; 196: 261–282.
- [12] GOSALVES J, GOYANES V. Selective digestion of mouse chromosomes with restriction endonucleases. I. Scaffold-like structures and bands by electron microscopy. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 48: 198–200.
- [13] GUSTAVINO B, JOHANNES C, OBE G. Restriction endonuclease Bam HI induces chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat Res* 1986; 175: 91–95.
- [14] KAEHLING M, MILLER DA, MILLER OJ. Restriction enzymes banding of mouse metaphase chromosomes. *Chromosoma* 1984; 90: 128–132.
- [15] LLOYD MA, THORGAARD GH. Restriction endonuclease banding of rainbow trout chromosomes. *Chromosoma* 1988; 96: 171–177.
- [16] MEZZANOTTE R, BIANCHI U, VANNI R, FERRUCCI L. Chromatin organization and restriction endonuclease activity on human metaphase chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1983; 36: 562–566.
- [17] MEZZANOTTE R, PERETTI D, ENNAS MG, VANNI R, SUMNER AT. Analysis of human metaphase chromosomes using antibodies to double-stranded and single-stranded DNA: staining are related to DNA conformation. *Cytogenet Cell Genet* 1989; 50: 54–58.
- [18] MILLER DA, GOSDEN JR, HASTIE ND, EVANS HJ. Mechanism of endonuclease banding of chromosomes. *Exp Cell Res* 1984; 155: 294–298.

- [19] MORGAN WF, CHUNG HW, PHILLIPS JW, WINEGAR RA. Restriction endonucleases do not induce sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 1989; 226: 203–209.
- [20] MOLLOY PL, SYMONS RH. Cleavage of DNA-RNA hybrids by type II restriction enzymes. *Nucl Acid Res* 1980; 8: 2939–2946.
- [21] NATARAJAN AT, OBE G. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma* 1984; 90: 120–127.
- [22] OBE G, KAMARA OP. Elevation of Alu I-induced frequencies of chromosomal aberrations in chinese hamster ovary cells by *Neurospora crassa* endonuclease and by ammonium sulfate. *Mutat Res* 1986; 174: 35–46.
- [23] OBE G, NATARAJAN AT. Chromosomal aberrations induced by the restriction endonuclease Alu I in Chinese hamster ovary cells: influence of duration of treatment and potentiation by cytosine arabinoside. *Mutat Res* 1985; 152: 205–210.
- [24] OBE G, JOHANNES C. Chromosomal aberrations induced by the restriction endonucleases Alu I and Bam HI: comparison with X-ray. *Biol Zentralbl* 1987; 106: 175–190.
- [25] OBE G, JONAS R, SCHMIDT S. The restriction endonuclease Alu I induces chromosomal aberrations in human peripheral lymphocytes in vitro. *Mutat Res* 1986; 163: 271–275.
- [26] OBE G, PALITTI F, TANZARELLA C, DEGRASSI F, DE SALVIA R. Chromosomal aberrations induced by restriction endonucleases. *Mutat Res* 1985; 150: 359–368.
- [27] OBE G, VASUDEV V, JOHANNES C. Chromosome aberrations induced by restriction endonucleases. [w] Obe G, Basler A (red.) *Cytogenetics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1987: 300–314.
- [28] OBE G, WINKEL EU. The chromosome-breaking of the restriction endonuclease Alu I in CHO cells in independent of the S-phase of the cell cycle. *Mutat Res* 1985; 152: 25–29.
- [29] OKADA CY, REICHSTEINER M. Introduction of macromolecules into cultured mammalian cells by osmotic lysis of pinocytic vesicles. *Cell* 1982; 29: 33–41.
- [30] PETRUSKA J, HORN D. Bromodeoxyuridine substitution in mammalian DNA can both stimulate and inhibit restriction cleavage. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 96: 1317–1324.
- [31] PORFIRIO B, TEDESCHI B, VERNOLE P, CAPOROSSI D, NICOLETTI B. The distribution of Msp I-induced breaks in human lymphocyte chromosomes and its relationship to common fragile sites. *Mutat Res* 1989; 213: 117–124.
- [32] RINGER R, MICHAELIS A. Heat shock protection against induction of chromatid aberrations is dependent on the time span between heat shock and clastogen treatment of *Vicia faba* root tip meristem cells. *Mutat Res* 1988; 209: 141–144.
- [33] SAYERS JR, OLSEN DB, ECKSTEIN F. Inhibition of restriction endonuclease hydrolysis by phosphorothioate-containing DNA. *Nucl Acid Res* 1989; 17: 9495.
- [34] STOILOV L, MULLENDERS LHF, NATARAJAN AT. Influence of bromodeoxyuridine substitution of thymidine on sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced by restriction endonucleases. *Mutat Res* 1986; 174: 295–301.
- [35] TANAKA S, ISHII C, INOUE H. Effects of heat shock on the induction of mutations by chemical mutagens in *Neurospora crassa*. *Mutat Res* 1989; 223: 233–242.
- [36] TANZARELLA C, DE SALVIA R, DEGRASSI F, FIORE M, PALITTI F. Interaction between X-ray and restriction endonuclease-induced lesion in the formation of chromosomal aberrations. *Mutat Res* 1990; 244: 197–200.
- [37] TUSCHY S, OBE G. Potentiation of Alu I-induced chromosome aberrations by high salt concentrations in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 1988; 207: 83–87.
- [38] VASUDEV V, OBE G. Effect of heat treatment on chromosomal aberration induced by the alkylating agent trenimon or the restriction endonuclease Alu I in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat Res* 1987; 178: 81–90.
- [39] WINEGAR RA, PRESTON RJ. The induction of chromosome aberrations by restriction endonucleases that produce blunt-end or cohesive-end double-strand breaks. *Mutat Res* 1988; 197: 141–149.
- [40] YUNIS JJ, SORENG AL, BOWE AE. Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens. *Oncogenes* 1987; 1: 59–69.

Otrzymano: 02.09.1991 r.

Przyjęto: 29.10.1991 r.

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

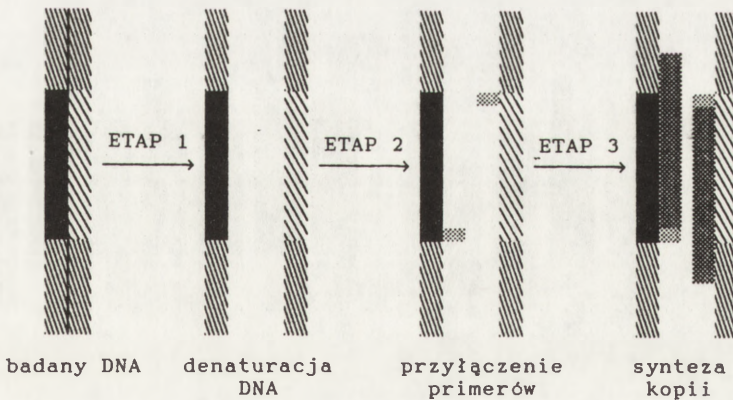
KOPIOWANIE DNA I mRNA ZE SKRAWKÓW PARAFINOWYCH PRZY POMOCY PCR

Maciej ZABEL

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii AM, Poznań

Metoda PCR (*połymerase chain reaction*) jest już dobrze poznana i służy do uzyskiwania w prosty sposób dowolnej liczby kopii z niewielkiej ilości wzorcowego DNA (także w mieszaninie z innymi DNA). Do zapoczątkowania reakcji konieczny jest komplementarny oligonukleotyd (*primer* czyli starter). Od miejsca przyłączenia się startera DNA-polimeraza syntetyzuje komplementarny DNA, zwany kopią.

Obecnie wiadomo, że DNA kopiować można także ze skrawków parafinowych np. o grubości 5 μm . Ma to duże znaczenie praktyczne, gdyż można np. wycinać ze skrawków tylko istotne pola (nawet parę komórek). Ekstrakcja DNA ze skrawków jest łatwa i wymaga jedynie kolejnych traktowań oktanem, etanolem, acetonem i proteinazą K. Dobre rezultaty (odpowiednio długie fragmenty kopii) uzyskać można po utrwaleniu w acetonie, formalinie, płynie Carnoya (lub różnych kombinacjach składników), dużo gorsze natomiast po utrwaleniu w płynie Zenkera lub Bouina. Podobnie ekstrahować można ze skrawków parafinowych mRNA, jednak przed rozpoczęciem kopiowania (PCR) należy przy pomocy odwrotnej transkryptazy uzyskać cDNA. Zasada PCR przedstawiona jest na rysunku 1. Całą reakcję przeprowadza się w jednym i tym samym naczyniu. Reakcja składa się z identycznych, następujących automatycznie po sobie cykli. Każdy cykl składa się z trzech

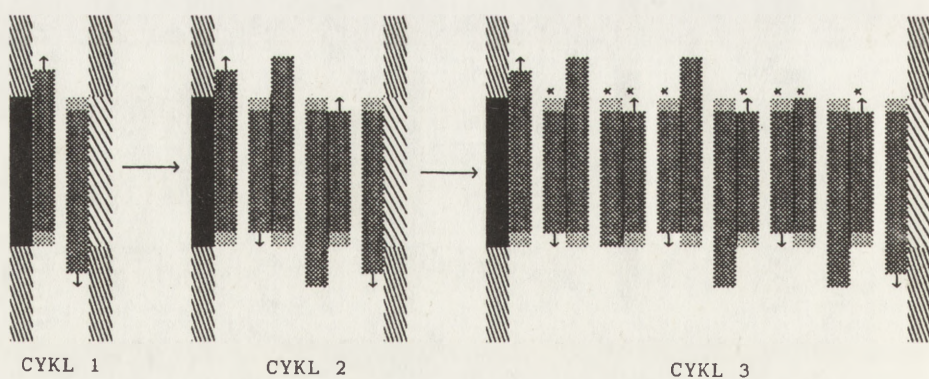


Rys. 1. Schemat pierwszego cyklu PCR, w którym podobnie jak w następnych wyróżnia się 3 etapy; w obu łańcuchach DNA wydzielono fragmenty, które będą ostatecznie kopiowane

etapów. W pierwszym etapie w temp. 95°C (15 s) dochodzi do denaturacji DNA na dwa komplementarne pojedyncze łańcuchy. W drugim etapie w temp. 55°C (30 s) dochodzi do hybrydizacji starterów do łańcuchów DNA (normalnie dodane są dwa rodzaje odpowiednio dobranych starterów). W trzecim etapie w temp. 72°C DNA (90 s) polimeraza syntezuje od końca 3' starterów nowy łańcuch DNA, czyli kopię. Zakończenie reakcji następuje przez obniżenie temperatury i/lub dodanie EDTA. Kluczowe znaczenie ma termostabilna *Tag*-DNA-polimeraza, która została wyizolowana z żyjącej w gejzerach bakterii *Thermus aquaticus*. Dzięki termostabilności polimerazy można było zautomatyzować cały proces, gdyż mimo wysokiej temperatury denaturacji DNA kolejne cykle nie wymagają dodawania następnej porcji polimerazy. Obecnie proponuje się także inne DNA-polimerazy, które mają być bardziej termostabilne i dające mniej błędów przy kopiowaniu. Są to *Vent*-DNA-polimeraza (z *Thermococcus litoralis*) i *Pfu*-DNA-polimeraza (z *Pyrococcus furiosus*).

Skład płynu reakcyjnego: badane DNA (nawet jedna cząsteczka), dezoksynukleotydy, *Tag*-DNA-polimeraza, proste dodatki oraz co najistotniejsze specyficzne startery. W handlu dostępnych jest już wiele specyficznych starterów np. dla *gag* wirusa HIV-1 (SK 38 +, 5', SK3 -, 5'), dla *pol* wirusa hepatitis B (MDO6 5', MDO3 5').

Najczęściej do celów badawczych i diagnostycznych wykonuje się ok. 30 cykli. Na rysunku 2 pokazano pierwsze trzy cykle PCR. W trzecim cyklu zaczynają dominować krótkie łańcuchy ograniczone na końcach sekwencjami starterów. Od tego momentu liczba ich wzrasta geometrycznie, a liczba łańcuchów dłuższych arytmetycznie, co powoduje, że po zakończeniu PCR zasadniczym produktem są łańcuchy krótkie. W ciągu godziny w automacie do PCR można wykonać kilkadziesiąt cykli i uzyskać wiele milionów kopii z każdego wzorcowego łańcucha DNA. Automat do PCR (DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer Cetus, USA) jest prosty i stosunkowo tani, nieco prymitywniejszy można skonstruować samemu lub ewentualnie zastąpić trzema łaźniami wodnymi.



Rys. 2. Schematyczne przedstawienie trzech pierwszych cykli PCR; w trzecim cyklu dominują krótkie kopie (oznaczone *), które ostatecznie stanowią będą zasadniczy produkt PCR

Po zakończeniu PCR należy wykazać, czy doszło do namnożenia się oczekiwanych krótkich łańcuchów, gdyż albo potwierdza to obecność poszukiwanego DNA, albo daje pewność uzyskania żądanych kopii. Najprościej obecność krótkich łańcuchów wykazuje się przez elektroforezę i barwienie DNA (porównując z innym DNA o podobnym ciężarze). *Southern blotting* lub *dot blotting* są bardziej specyficzne, ale wymagają dodatkowo hybrydizacji.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALLARD MW, ELLSWORTH, DL, HONEYCUTT RL. The production of single-stranded DNA suitable for sequencing using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1991; 10: 24–26.
- [2] GREER CE, PETERSON S, KIVIAT NB, MANOS MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. *Am J Clin Path* 1991; 95: 117–124.
- [3] WU DY, UGOZZOLI L, PAL BK, QIAN P, WALLACE PB. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* 1991; 10: 233–238.
- [4] WRIGHT PA, WYNFORD D. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J Pathol* 1990; 162: 99–117.
- [5] INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ, WHITE T. PCR protocols. Academic Press Inc. San Diego 1990.

RYBOZYMY I gRNA

Maciej ZABEL

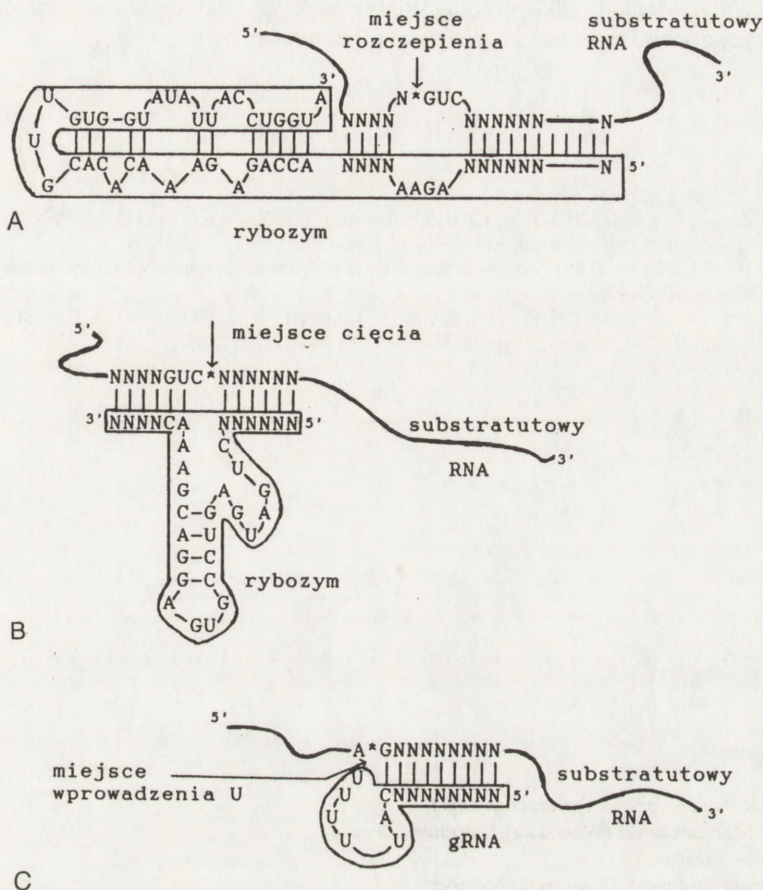
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii AM, Poznań

RNA w komórce tworzy się na podstawie DNA w wyniku transkrypcji genów. Zdecydowana większość RNA ulega dalej zmianom, w których wyniku powstaje ostateczna forma RNA. Większość tych zmian zachodzi w obecności enzymów o budowie białkowej. Jednakże dwa procesy, składanie RNA (łączenie eksonów i eliminacja intronów przy formowaniu mRNA) oraz degradacja mRNA po translacji katalizowane są przez enzymy mające budowę RNA. Ten rodzaj endonukleaz nazwano rybozymami.

Rybozomy zbudowane są z kilkudziesięciu nukleotydów. W ich budowie wyróżniono fragment rozczepiający (konserwatywny, o znanej sekwencji) oraz dwa fragmenty zmienne, specyficzne dla rozpoznania substratowego RNA, które znajdują się w najbliższym sąsiedztwie miejsca cięcia. Wśród rybozymów wyróżniono zasadniczo dwa typy, które różnią się budową i miejscem cięcia substratowego RNA. Są to *hammerhead* rybozomy i *hairpin* rybozomy. Trzecim rodzajem rybozomu jest gRNA (*guide*), który może wprowadzać lub usuwać jeden nukleotyd z substratowego RNA.

Hairpin rybozym rozczepia RNA w sekwencji 5'GC*GUC lub 5'CG*GUC (rys. 1A), *hammerhead* z kolei w sekwencji 5'GUX* (* – miejsce cięcia, X – jeden z nukleotydów C, A lub U – rys. 1B). W wyniku takiego rozczepienia powstają dwa fragmenty 5'F (z grupą 2', 3' cyklofosforanową) oraz 3'F (z grupą OH). Jeżeli cięcie w substratowym RNA zachodzi równocześnie w dwóch miejscach, to w wyniku następnej transestryfikacji dochodzi do połączenia obu końców (poprzez cyklofosforan z grupą OH). Mechanizm transestryfikacji istotny przy składaniu RNA zachodzi bez udziału enzymów białkowych, ale nie jest on tak dobrze poznany jak mechanizmy samego rozczepiania.

Nieco inaczej funkcjonuje gRNA, który bierze zasadniczo udział w tzw. redagowaniu RNA (czyli tworzeniu mRNA zdolnego do translacji) w mitochondriach. Rybozym ten może wprowadzać lub usuwać urydynę w drodze transestryfikacji (rys. 1C). Następuje to w sekwencji 5'A*G. Różnica między gRNA i pozostałymi znanymi rybozymami polega na tym, że z substratowym RNA łączy się jedynie koniec 5', a na końcu 3' znajduje się sekwencja poli U zdolna do transestryfikacji. Tutaj wspomnieć należy także, że niektóre RNA mogą mieć zdolność do samorozczepiania (*self-cleaving activity*), dzięki czemu dochodzi do samoskracania się RNA bez udziału rybozymów. Bardzo ważną zaletą wszystkich rybozymów jest fakt, że mogą one działać permanentnie, tzn. nie ulegają zmianom w czasie swojej czynności. Poza tym rybozomy zbudowane są z niewielu nukleotydów i dlatego są bardziej odporne na endonukleazy niż inne RNA. Te właściwości powodują, że rybozomy są "niezniszczalne".



Rys. 1. Schemat przedstawia sposób działania *hairpin* (A), *hammerhead* (B) rybozymów oraz gRNA (C); rybozomy obramowano, N oznacza nukleotydy specyficzne dla substratowego RNA i rybozimu, a kreski pionowe miejsca hybrydacji

Opisane wyżej cechy rybozymów spowodowały olbrzymie zainteresowanie biotechnologów, którzy widzą możliwość wykorzystania ich do celów terapeutycznych. Wiele chorób m.in. infekcyjnych i nowotworowych może być wyleczonych lub przynajmniej zahamowanych poprzez niedopuszczenie do produkcji kluczowych białek. Jedną z takich możliwości jest rozczepienie mRNA przez rybozomy. Reakcje takie przeprowadzono już dla mRNA pochodzących m.in. z genów *gag* i *tat* wirusa HIV-1, co uniemożliwia replikowanie się wirusa i tym samym hamuje rozwój AIDS. W tym celu namnożono substratowy RNA oraz odpowiadający mu rybozym i przeprowadzono reakcję rozczepiania w warunkach pozakomórkowych. Jednakże użycie rybozymów w terapii wymaga jeszcze rozwiązania wielu problemów. Zasadniczym problemem jest znalezienie sposobu wprowadzenia zsintetyzowanych rybozymów do komórek. Próbuje się jednak syntetyzować nowe rybozomy, np.

rozcinające mRNA dla P-glikoproteiny (białka odpowiedzialnego za oporność wielolekową, do której dochodzi podczas chemioterapii nowotworów).

PIŚMIENNICTWO

- [1] BASS BL. Splicing: the new edition. *Nature* 1991; 352: 283–284.
- [2] HAMPEL A, TRITZ R, HICKS M, CRUZ P. Hairpin' catalitic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 299–304.
- [3] HASELOFF J, GERLACH WL. Simple RNA enzymes with new end highly specific endonuclease activities. *Nature* 1988; 334: 585–591.
- [4] SARVER N, CANTIN EM, CHANG PS, ZAIA JA, LADNE PA, STEPHENS DA, ROSSI JJ. Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science* 1990; 247:1222–1225.

EDITORIAL BOARD

Emil Nalborczyk (Warszawa) *Editor-in-Chief*
Grzegorz Marszałkowski (Warszawa) *Executive Editor*
Secretary – vacant
Alina Kacperska-Lewak (Warszawa) *Member*

EDITORIAL COUNCIL

President: Tadeusz Baszyński (Lublin)
Members: Józef Buczek (Wrocław), Stanisław Grzesiuk (Olsztyn), Kazimierz Kleczkowski (Warszawa), Stanisław J. Knypl (Łódź), Adam Markowski (Kraków), Marian Michniewicz (Toruń), Alicja Szweykowska (Poznań), Włodzimierz Starzecki (Kraków), Stanisław Więckowski (Kraków)

TREŚĆ

No. 1

ZEMAN K., MAJEWSKA E.: Receptory granulocytów obojętnochłonnych (neutrofili) krwi obwodowej. I. Charakterystyka struktury i biologicznej funkcji receptorów	1
ZEMAN K., KANTORSKI J.: Receptory granulocytów obojętnochłonnych (neutrofili) krwi obwodowej. II. Mechanizmy przekazywania i rozprzestrzeniania się sygnału	19
JACKOWSKI G., SCHNEIDER J.: Immunochemiczne właściwości białek tylakoidowych anten energetycznych	31
ZABEL M.: Hybrydocytochemia w badaniach nad regulacją genu kalcytoninowego w komórkach parafolikularnych tarczycy	47
CZYŻYK J. K.: Podłoże zjawisk autoimmunologicznych	55
KOMENDER J.: Stanowisko środowisk naukowych w sprawie etycznych zagadnień związanych z badaniami genetycznymi	73
The declaration of Inuyama	75

No. 2

ŻMIJEWSKI M.: Onkogen jądrowy <i>jun</i> jako przykład regulatora ekspresji genów przez białka specyficznie wiążące DNA	77
TRETYN A.: Wpływ acetylocholin na wzrost i rozwój roślin	93
WIKIEŁ H., STROSZNAJDER J.: Fosforany inozytolu i ich rola w procesie transdukcji sygnałów	109
STĘPIŃSKA U.: Matczyny RNA – jego synteza i znaczenie we wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego zwierząt	117
JACKOWSKI G.: Strategie adaptacji anten energetycznych fotosyntezy do natężenia światła	139
The IXth European Anatomical Congress – IX Europejski Kongres Anatomiczny	152

No. 3

WÓJCIK C.: Współczesne poglądy na temat regulacji cyklu komórkowego	153
KOCKI J., ROŻYŃKOWA D.: Gen <i>bcl-2</i> , w patofizjologii limfocytów B	169
RUPNIEWSKA Z. M.: Syntetyczne oligonukleotydy w leczeniu nowotworów – Nadzieje i trudności	183
RYDZYŃSKI K.: Wrażenia z II Międzynarodowego Kongresu Mikroskopii Elektronowej w Seattle, USA	193

W tym zeszycie Postępów Biologii Komórki . . .	201
HETMAN M.: Geny przeciwnowotworowe – ważny element w powstawaniu nowotworów	203
KONONOWICZ H.: Somatyczna embriogeneza roślin in vitro. I. Czynniki warunkujące powstawanie somatycznych zarodków	217
KONOPKA D.: Molekularne i komórkowe podstawy uczenia u <i>Aplysia californica</i>	227
TRZOS R., TUR YNA B.: Modyfikacje genetyczne cytochromu C i ich implikacje w jego funkcji biologicznej	241
OLSZEWSKA M. J., SAKOWICZ T.: Metylacja DNA u roślin	253
RZEP CZYŃSKA K., HÜBNER H., BRZEZIAŃSKA E.: Indukcja aberracji chromosomowych przez enzymy restrykcyjne	263
ZABEL M.: Kopiowanie DNA i mRNA ze skrawków parafinowych przy pomocy PCR	273
ZABEL M.: Rybozomy i gRNA	276

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

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

2. Artykuły przeglądowe ze wskazaniem kierunków przyszłych badań o objętości do 15 stron maszynopisu i bibliografii z ostatnich 3 lat (do 35 pozycji). Każda pozycja bibliograficzna powinna zawierać dodatkowo 1 zdanie streszczenia, a szczególnie ważne pozycje powinny być oznaczone gwiazdką.

3. Doniesienia z ostatniej chwili na 3-5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji).

4. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednona stronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję i wysyłającego nadbitek, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, lecz jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na rozdziały tytułowane i numerowane (1, 2 itd.) oraz podrozdziały (1.1, 1.2 itd.). Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

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

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 nadbitek.

TREŚĆ

W tym zeszycie Postępów Biologii Komórki . . .	201
HETMAN M.: Geny przeciwnowotworowe – ważny element w powstawaniu nowotworów	203
KONONOWICZ H.: Somatyczna embriogeneza roślin in vitro. I. Czynniki warunkujące powstawanie somatycznych zarodków	217
KONOPKA D.: Molekularne i komórkowe podstawy uczenia u <i>Aplysia californica</i>	227
TRZOS R., TURZYNA B.: Modyfikacje genetyczne cytochromu C i ich implikacje w jego funkcji biologicznej	241
OLSZEWSKA M. J., SAKOWICZ T.: Metylacja DNA u roślin	253
RZEPczyńska K., HÜBNER H., BRZEZIAńska E.: Indukcja aberracji chromosomowych przez enzymy restrykcyjne	263
ZABEL M.: Kopiowanie DNA i mRNA ze skrawków parafinowych przy pomocy PCR	273
ZABEL M.: Rybozomy i gRNA	276

**Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Prenumerata na rok 1992

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1992 r na nowe konto:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 5.01132-40006576-132-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty) dla instytucji (bibliotek) wynosi 180 000 zł, a dla odbiorców indywidualnych 40 000 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 5.01132-40006576-132-1110.

Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705