

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

**TOM 20-NR 2'93**  
(133 – 244)

# Postępy Biologii Kórnórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego oraz Polskiej Sieci UNSCO wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

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

Rada Redakcyjna:

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

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

---

### **Fundacja •Rozwój SGGW-AR•**

Ark. wyd. 10,0. Ark. druk. 7,0 Oddano do składu w kwietniu 1993 r. Podpisano do druku w maju 1993 r. Druk ukończono w czerwcu 1993 r.

---

***W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •***

- Po raz pierwszy w polskiej literaturze przeglądowej przedstawiono na s. 155 dane dotyczące białek szoku termicznego u roślin. Scharakteryzowano te białka oraz wskazano ich rolę w przeżywaniu stresu, jakim jest podwyższona temperatura.
- W artykule na s. 217 opisano nowe techniki genetyki molekularnej umożliwiające wprowadzanie zmian genetycznych w ściśle określone miejsca genomu ssaków. Zastosowanie tych technik przynosi ciekawe wyniki w badaniach nad czynnością genów in vivo. Celowane zmienianie informacji genetycznej to także potencjalny "złoty środek" terapii genowej. Opisane techniki doprowadzą zapewne do stworzenia terapii genowej opartej na celowanym zmienianiu genomu.
- O strukturze i funkcji fibronektyn można przeczytać na s. 171. Różne molekularne formy fibronektyn są produktami jednego czynnego genu u ludzi.



## ERRATA

W artykule A. F. Sikorskiego pt. Szkielet błony erythrocytu zamieszczonym w zeszy-  
cie 1 tomu 20 z 1993 r. Postępów Biologii Komórki wystąpiły błędy, za które autorów  
serdecznie przepraszamy.

Strona	Wiersz	Jest	Powinno być
93	dół str.	Brak notki do tytułu	*Praca dotowana z Grantu KBN nr 4 11 43 91 01
96	góra rys. 1	brak litery A na rysunku	w prawym górnym rogu oznaczenie części rysunku – A
94	1 wiersz i 6 kol.	główny składnik budżetu...	główny składnik szkieletu
94	3 od dołu	10196 <sup>15</sup>	10 <sup>-15</sup>
97	9 od góry	~ 5 x 10196 <sup>9</sup>	~ 5 x 10 <sup>-9</sup>
103	3 od góry	~ 5,5 x 10196 <sup>7</sup>	~ 5 x 10 <sup>-7</sup>
104	20 od góry	~ 3,3 x 10196 <sup>7</sup>	~ 3,3 x 10 <sup>-7</sup>
104	9 od dołu	~ 140 x 10196 <sup>9</sup>	~ 140 x 10 <sup>-9</sup>
105	6 od góry	~ 2 x 10196 <sup>7</sup>	~ 2 x 10 <sup>-7</sup>
105	8 od góry	~ 2-4 x 10196 <sup>6</sup>	~ 2-4 x 10 <sup>-6</sup>
106	18 od góry	~ 5 x 10196 <sup>7</sup>	5 x 10 <sup>-7</sup>



## OBSZARY JĄDERKOTWÓRCZE (NOR) U SSAKÓW: WYSTĘPOWANIE I POLIMORFIZM

### NUCLEOLAR ORGANIZER REGIONS (NORs) IN MAMMALS: AN OCCURRENCE AND SIZE POLYMORPHISM

Aldona PIENKOWSKA, Marek ŚWITOŃSKI

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza Poznań

*Streszczenie.* W pracy przedstawiono przegląd badań nad występowaniem i polimorfizmem wielkości obszarów jąderkotwórczych (NOR), na przykładzie licznych gatunków zwierząt, a także człowieka. Analiza cytogenetyczna tych specyficznych regionów chromosomów może być prowadzona metodą ich wysrebrzenia (Ag-NOR) oraz stosowaną coraz częściej metodą hybrydyzacji "in situ" z sondami molekularnymi reprezentującymi fragmenty genów rRNA. Zaprezentowano też syntetyczne zestawienie liczby NOR wraz z ich położeniem na poszczególnych chromosomach dla 27 gatunków ssaków.

*Summary.* A review of the research on an occurrence and size polymorphism of Nucleolar Organizer Regions (NORs) in mammals, including human, is presented. Cytogenetic analysis of these specific chromosome regions can be carried on by applying of the silver-staining method (Ag-NOR) or by "in situ" hybridization with the use of rDNA probes representing rRNA gene fragments. List of NOR's number and their assignment to particular chromosomes in 27 mammalian species is also presented.

Obszary jąderkotwórcze (NOR) są fragmentami chromosomów, w których znajdują się geny kodujące rRNA [5, 8S, 18S i 28S]. Na bazie tych genów możliwe jest tworzenie się jąderek w okresie interfazy [36].

Metody identyfikacji obszarów NOR opierają się na specyficznym wybarwianiu kwaśnych białek chromatynowych lub na hybrydyzacji z odpowiednimi sondami molekularnymi rDNA. Najpopularniejszą metodą ujawniania obszarów jąderkotwórczych jest barwienie srebrowe przy użyciu  $\text{AgNO}_3$ . Efektem wybarwień są żółto-brązowe chromosomy z czarnymi depozytami srebrowymi (NOR) położonymi obok chromatyd [za 36].

Ponieważ efekty barwień mogą być obserwowane zarówno w mikroskopie elektronowym, jak i świetlnym, przypuszcza się, że mechanizm wybarwień opiera się na reakcji redoks. Przy takim założeniu srebro po otrzymaniu elektronu redukuje się z plus pierwszego stopnia utlenienia do zerowego i wytrąca się w postaci metalicznej jako czarny osad. Dawcą elektronu jest w tym wypadku wodór z grupy hydroksylowej. Sytuacja taka jest możliwa, jeśli w łańcuchu bocznym białka występują arginina, histydyna, tyrozyna, cysteina (lub seryna na

pierwszej pozycji) mające grupy guanidynowe [35]. Wówczas w podwyższonej kwasowości spowodowanej obecnością grupy SH z cysteiny wodór jest zdolny oddysocjować elektron stając się reduktorem [27].

Badania na różnych gatunkach udowodniły, że miejsca wybarwień Ag-NOR korespondują z miejscami rybosomalnych genów identyfikowanych przez hybrydyzację *in situ*, jednak bardzo rzadko wszystkie te miejsca są uwidaczniane barwieniem. Może to być spowodowane niewielką liczbą kopii genów rRNA będącą poniżej czułości barwienia srebrowego [za 36]. Jednocześnie stwierdzono też, że liczba wybarwień srebrowych jest skorelowana ze stopniem transkrypcji genów rybosomalnych, a obecność srebra wykazuje raczej potencjał transkrypcji niż transkrypcje aktualnie występujące [36].

Jak już wyżej wspomniano, jedyną dokładną metodą umożliwiającą precyzyjne określenie miejsca obszarów NOR na chromosomie jest hybrydyzacja *in situ*. Ze względu na duży konserwatyzm genetyczny, w metodzie tej można hybrydyzować chromosomy jednego gatunku z sondą molekularną pochodzącą z genomu innego gatunku [38]. Możliwość ta została wykorzystana do analizy obszarów jąderkotwórczych w kariotypach zwierząt domowych, poprzez zastosowanie sondy molekularnej reprezentującej fragment ludzkiego genu 28S rRNA. Gallagher i wsp. [8] przy użyciu biotynylowanej sondy pGb 28S rRNA ustalili pozycję obszarów NOR w telomerach bydlęcych chromosomów z pary nr 2, 3, 4, 11, 29. Analogiczne badania wykonane przez Solinas i wsp. [34], również przy użyciu ludzkiej sondy wykazały, że obszary te występują na chromosomach nr 2, 3, 6, 11 i 28 (lub 29).

Badania te mogą pozwolić na wyjaśnienie problematycznych miejsc występowania obszarów jąderkotwórczych na 4 lub 6 oraz 28 lub 29 parze chromosomów, które zostały ustalone wcześniej na podstawie barwienia sekwencyjnego Q-AgNOR, RBA-AgNOR oraz prążkami GTG-AgNOR [za 8].

Badania genomu świni [20] przy użyciu biotynylowanej sondy rDNA pochodzącej z ludzkiego genomu potwierdziły obecność obszarów jąderkotwórczych na 8 i 10 parze chromosomów, gdzie zlokalizowano je wcześniej barwieniem srebrowym [za 20] i metodą radioaktywnej hybrydyzacji *in situ* [22]. Dotychczas wykorzystano ludzkie sondy molekularne rDNA do zamapowania obszarów NOR u następujących gatunków zwierząt: świni, bydła, nutrie, konie i lisy polarne. We wszystkich wypadkach nastąpiło przyłączenie sondy do obszarów jąderkotwórczych [27].

Liczebność obszarów jąderkotwórczych oraz ich rozmieszczenie na chromosomach jest cechą charakterystyczną dla każdego gatunku (tab. I).

Liczba chromosomów mających obszary jąderkotwórcze mieści się w dość szerokim zakresie od 2 (nutria) do 18 (pies, orangutan). Jednocześnie z przedstawionego zestawienia wynika, że liczba obszarów jąderkotwórczych występująca w kariotypach różnych gatunków nie jest funkcją diploidalnej liczby chromosomów. U gatunków o podobnej liczbie diploidalnej chromosomów liczba chromosomów zawierających NOR może się znacznie różnić. U orangutana ( $2n=48$ ) takich chromosomów jest 18, u człowieka ( $2n=46$ ) jest 10, u królika ( $2n=44$ ) jest ich 8, a u nutrii ( $2n=42$ ) – tylko 2. Z kolei u bydła ( $2n=60$ ) występuje 10 chromosomów niosących NOR, a u konia ( $2n=64$ ) – tylko 6 chromosomów.

Badania prowadzone na różnych gatunkach ssaków wykazały, że w obrębie gatunku występować może zmienność liczby wysrebrzających się obszarów NOR. Dla przykładu u ludzi może ich być od 5 do 10, przy czym istnieją wyraźne różnice indywidualne, rasowe, a także populacyjne związane z miejscem zamieszkania [29]. Zróżnicowanie liczby wysrebrzających się NOR w zależności od rasy obserwował też Mellink [20] u świń. Najniższą liczbę



TABELA I. Zestawienie liczby i połączenia obszarów jąderkotwórczych

Gatunek	2n	Liczba NOR	Nr chromosomów	Źródło
Człowiek	46	10	13,14,15,21,22	[21]
Szimpans ( <i>Pan troglodytes</i> )	48	10	13,14,18,21,22	[29]
Goryl ( <i>Gorilla gorilla</i> )	48	6	1,21,22	[29]
Orangutan ( <i>Pongo pygmaeus</i> )	48	18	11,12,13,14,15,16,17,22,23	[29]
Gibbon ( <i>Hylobates lar</i> )	48	2	15	[29]
Koń ( <i>Equus caballus</i> )	64	6	1,28,31	[28]
Osiół ( <i>Equus asinus</i> )	62	8	20,21,24,29	[13]
Świnia ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	38	4	8,10	[2]
Bydło ( <i>Bos taurus</i> )	60	10	2,3,6,11,28,(29?)	[34, 6]
Zebu ( <i>Bos indicus</i> )	60	10	2,3,4,11,28	[19]
Bawół rzeczny ( <i>Bubalus bubalis</i> )	50	12	3,4,8,21,23,24	[5]
Bawół błotny ( <i>Bubalus arnee</i> )	48	10	4,8,20,22,23	[4]
Owca ( <i>Ovis aries</i> )	54	10	1,2,3,6,21	[8]
Koza ( <i>Capra hircus</i> )	60	10	2,3,5,6,28	[10]
Daniel ( <i>Dama dama</i> )	68	4	1,2	[32]
Kot ( <i>Felis catus</i> )	38	16	E <sub>1</sub> ,E <sub>2</sub>	[30, 29]
Pies ( <i>Canis familiaris</i> )	78	18	5,8,14,16,19,21,32,37,X,Y	[31]
Królik ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	24	8	13,16,20,21	[18]
Lis pospolity ( <i>Vulpes fulvus</i> )	34	6	8,9,13	[15]
Lis polarny ( <i>Alopex lagopus</i> )	50	10	13,17,18,20,22	[16]
Nutria ( <i>Myocastor coypus</i> )	42	2	11	[27]
Szczur norweski ( <i>Rattus norvegicus</i> )	42	6	3,11,12	[33]
Szynszyla ( <i>Chinchilla langer</i> )	64	2	2	[9]
Norka ( <i>Musella vison</i> )	30	4	2,8	[11]
Chomik chiński ( <i>Cricetulus griseus</i> )	22	10	4,5,6,9,11	[9]
Świnka morska ( <i>Cavia porcellus</i> )	64	14	1,3,4,6,7,9,17	[9]
Mysz ( <i>Mus musculus</i> )	40	10	12,15,16,18,19	[9]

obserwowano u ras: duńskiej, norweskiej i fińskiej; umiarkowaną u Yorkshire i Pietrain, a największą u Meishan. Przyjmuje się, że zróżnicowanie liczby ujawnianych NOR zależy od ich aktywności transkrypcyjnej w taki sposób, że wysrebrzają się tylko te odcinki organizatorów jąderkotwórczych, w których transkrypcja odbędzie się w następnym cyklu komórkowym, stąd nie wszystkie NOR mogą ujawniać się jednocześnie [za 29].

Badania nad aktywnością organizatorów jąderkotwórczych u ludzi wykazały, że nie jest ona jednakowa dla wszystkich akrocentryków posiadających je. Szczególnie wyróżniają się pod tym względem chromosomy pary 21, charakteryzujące się najwyższą aktywnością i chromosomy pary 15, mające najmniejszą aktywność w porównaniu z obszarami NOR z par 13, 14, 22. Różnice te są istotne statystycznie [40]. Natomiast badania nad obniżoną częstością wysrebrzania się NOR na chromosomach pary 22 u ludzi nie wykazały różnic statystycznie istotnych [21].

U królików chromosomy pary 20 są bardziej aktywne niż z pary 16, 13 oraz 21. Badania statystyczne wykazały, że w tym wypadku zależność pomiędzy aktywnością NOR na różnych chromosomach opiera się na różnicach liczby kopii genów rRNA [23]. Potwierdzają to badania Martin-DeLeon [17], w których wykazano, że u królików liczba genów rybosomalnych nie jest równomiernie rozłożona na chromosomach. Para 20 ma ich najwięcej, a para 14 i 16 zawiera więcej kopii niż para 21.

Doświadczenia przeprowadzone na psach [3] wykazały, że w płytkach metafazalnych najczęściej wysrebrzają się NOR na chromosomach pary 8, następnie pary 7 i 6 oraz 9, 12 i 10, a najrzadziej na 5 i 11.

Problem wielkości depozytów srebrowych u świń [20] skomentowany został następująco: u licznych zwierząt sygnały na 10 parze są silniejsze niż na parze 8, jednak u rasy Pietrain i Yorkshire mocniejsze są sygnały na parze 8. Wyniki te sugerują, że istnieją różnice w ilości rDNA obecnego w obu parach chromosomowych. Z drugiej strony, porównanie wyników hybrydyzacji i wysrebrzania wykazało, że pojawieniu się sygnałów hybrydyzacyjnych na chromosomach pary 10 zawsze towarzyszyła obecność depozytów srebrowych przy barwieniu Ag-NOR. Podobna zależność nie występowała w odniesieniu do pary 8. Na tej podstawie wywnioskowano, że organizatory jąderkotwórcze pary 10 były aktywne transkrypcyjnie we wszystkich komórkach, natomiast na parze 8 wykazywały znaczne zróżnicowanie aktywności lub jej całkowity brak.

Ciekawą próbą wyjaśnienia różnic w aktywności NOR są badania przeprowadzone na królikach [18]. Zakłada się w nich, że aktywność wzoru prążkowego jest oznaczona już w embriogenezie. Porównano NOR w komórkach wątroby oraz nerek i stwierdzono, że komórki parenchymatyczne, takie jak hepatocyty są bardziej aktywne fizjologicznie i ta aktywność może mieć odbicie w zwiększonej liczbie i aktywności Ag-NOR w porównaniu z komórkami nerek (pochodzenia mezodermalnego).

Liczne badania prowadzone u człowieka ujawniły występowanie tak zwanych asocjacji satelitarnych (AS). Polegają one na wzajemnym kontakcie chromosomów akrocentrycznych za pośrednictwem ramion krótkich, zawierających przewężenia wtórne, lub za pomocą satelitów. AS mogą być w postaci wspólnego ziarna srebrowego lub mostka pomiędzy obszarami NOR, zarówno pomiędzy chromosomami homologicznymi jak i pochodzącymi z różnych par. U człowieka mającego 5 par akrocentryków w skład AS może wchodzić od 2 do 10 chromosomów; najczęściej spotyka się asocjacje dwuchromosomowe, rzadziej trzy-, czterochromosomowe, a najrzadziej pięciochromosomowe [29]. Asocjacje takie obserwowano także u innych gatunków. U myszy najczęstszymi asocjacjami chromosomów mających NOR są asocjacje dwu- i trzychromosomowe [24]. Sugerowano również na podstawie badań prowadzonych u kóz, że wchodzenie chromosomów w asocjacje jest cechą osobniczą, i mimo że u kóz spotyka się asocjacje dwu-, trzy- i czterochromosomowe, najczęściej pojawiają się asocjacje dwuchromosomowe [25].

Drugim typem zróżnicowania, z którym spotykamy się badając NOR, jest polimorfizm wielkości obszarów jąderkotwórczych. Ujawnia się on w postaci depozytów srebrowych (lub sygnałów w hybrydyzacji *in situ*) o różnych rozmiarach. Wielkość tych depozytów jest zazwyczaj oceniana subiektywnie jako bardzo duży, duży, średni lub mały. Przeprowadzone badania rodzinowe wskazują, że stopień wysrebrzania NOR, odzwierciedlający wielkość tego obszaru, jest charakterystyczną, dziedziczną cechą chromosomu, która przekazywana jest zgodnie z segregacją mendlowską [29]. U tego samego osobnika chromosomy homologiczne w jednej lub kilku parach mogą wysrebrzać się różnie. Szczegółowa analiza wykazała, że w polimorficznych parach różniących się długością przewężenia wtórnego, chromosom z dłuższym przewężeniem zawsze wybarwia się silniej, podczas gdy jego homolog wybarwia się słabowo lub nie wybarwia się wcale [30].

Na zdjęciu nr 1 pokazane są chromosomy knura, u którego stwierdzono polimorfizm NOR w parze nr 8. Zarówno wysrebrzanie, jak i hybrydyzacja *in situ* ujawniły we wszystkich



plytkach stałe zróżnicowanie wielkości obszarów jąderkotwórczych [34]. Występowanie polimorfizmu obszarów NOR w parach 8 i 10 u świni były opisywane niejednokrotnie [7, 39].



RYSUNEK. Polimorfizm NOR w 8 parze chromosomów knura: a – barwienie konwencjonalne Giemsa, b – wysrebrzenie  $\text{AgNO}_3$  (Ag-NOR), c – prążki Q (QFO), d – sekwencyjne, po prążkach Q (pastrz c) wywołanie sygnału w hybrydyzacji in situ z biotynylowaną sondą ludzkiego genu 28S rRNA

Pomimo że polimorfizm NOR jest znany u wielu gatunków, niewiele jeszcze można powiedzieć na temat efektów fenotypowych. Stwierdzono, że heteromorfizm NOR w 21 parze chromosomów u ludzi może być odpowiedzialny za zwiększone ryzyko powstawania zaburzeń mejozycznych [12]. Przypuszcza się ponadto, iż może istnieć związek pomiędzy aktywnością NOR oraz rozmiarami depozytów srebrnych a powstawaniem nowotworów złośliwych [26]. Zauważono też, że w translokacjach Robertsona obejmujących chromosomy z obszarami jąderkotwórczymi nigdzie nie ujawniają się prążki srebrne. Rezultat ten uzyskano dla ludzkich translokacji Robertsona 13/13, 14/21, 15/21 oraz 21/21 [1]. Do interesujących wniosków doszli uczeni badający zależność pomiędzy liczbą aktywnych NOR a kierunkiem użytkowania królików. Ustalono, że aktywność obszarów jąderkotwórczych królików w typie mięsny różni się statystycznie istotnie od osobników typu futerkowego [14].

Formy polimorficzne obszarów jąderkotwórczych spełniają ponadto rolę markera chromosomowego, podobnie jak formy polimorficzne wielkości obszarów heterochromatyny konstytutywnej. Markery takie mogą być wykorzystywane m.in. w badaniach nad mapowaniem genów szczególnie przy zastosowaniu metody rodzinowej, która opiera się na analizie segregacji mapowanych genów i ewentualnych markerów chromosomowych [37].

## LITERATURA

- [1] BRASCH JM, SMYTH DR. Absence of silver bands in human Robertsonian translocation chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1979; **24**: 122–125.
- [2] COMMITTEE for the STANDARDIZED KARYOTYPE of the DOMESTIC PIG. Standard karyotype of the domestic pig. *Hereditas* 1988; **109**: 151–157.
- [3] DELGADO JV, MORENO MILAN M, ALONSO J, ALONSO A, RODERO A. Distribution of NOR Activity Regions in Dogs. 8th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals. 1988: 129–133.
- [4] DI BERNARDINO D, LIOI MB, IANNUZZI L. Identification of nucleous organizer chromosomes in cattle (*Bos taurus* L.) by sequential silver staining + RBA banding. *Caryologia* 1985; **38**,1: 95–102.
- [5] DI BERNARDINO D, IANNUZZI L, BETTINI TM, MATASSINO D. Ag-NORs variation and banding homologies in two species of Bovidae: *Bubalus bubalis* and *Bos taurus*. *Can J Genet Cytol* 1981; **23**: 89–99.

- [6] FORD CE, POLLOCK DL, GUSTVSSON I. Proceedings of the First International Conference for the Standardisation of Banded Karyotypes of Domestic Animals. *Hereditas* 1980; **92**: 145–162.
- [7] FRIES HR. Natürliche und induzierte Markerchromosomen beim Schwein und ihre Verwendung für die Genkartierung. Diss ETH 1982: 7160.
- [8] GALLAGHER DS, DAVIS SK, WOMACK JE. In situ hybridization of a biotinylated 28S ribosomal probe to the bovine Nucleolar Organizing Regions. 7th North American Colloquium on Domestic Animal Cytogenetics and Gene Mapping 1991: 112–116.
- [9] GRAPHODATSKY AC, RADJABLI SJ. Chromosomes of agricultural and Laboratory Mammals Atlas. *Nauka* 1988.
- [10] IANNUZZI L, DI MEO GP, FERRARA L, RUBINO R. Identification of Nucleolus Organizer Chromosomes in Goat (*Capra hircus*). 7th North American Colloquium on Domestic Animal Cytogenetics and Gene Mapping. 1991: 64.
- [11] ISAKOVA GK, POPOVA NA, FOMICHEVAI I. Virus Induced Alterations in Chromatin Structure and Nucleolus Organizing Regions (NORs) Activity in Domestic Mink. 9th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals 1990: 40.
- [12] JAKSON-COOK CK, FLANNERY DB, COREY LA, NANCE WE, BROWN JA. Nucleolar organizer region variants as a risk factor for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 1985; **37**: 1049–1061.
- [13] KOPPE E, MAYR B, SCHLEGER W. Nucleolar organizer regions in the chromosomes of the donkey. *J Heredity* 1983; **74**: 387–388.
- [14] MAITESIAN ES. Polymorphism of Nucleolus in the Cells of Different Ploidy. 9th European Colloquium on cytogenetics of Domestic Animals. 1990:32.
- [15] MAKINEN A, KUOKKANEN MT, GUSTAVSSON I, ISAKOVA GK, TAKAGI N. The standard karyotype of the silver fox (*Vulpes fulvus* Desm.). *Hereditas* 1985; **103**: 171–176.
- [16] MAKINEN A, GUSTAVSSON I, ŚWITOŃSKI M, TAKAGI N. The standard karyotype of the blue fox (*Alopex lagopus* L.). *Hereditas* 1985; **103**: 33–38.
- [17] MARTIN-DeLEON PA. Localization of the 18S and 28S rRNA cistrons in the genome of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.). *Cytogenet Cell Genet* 1980; **28**: 34–40.
- [18] MARTIN-DeLEON PA, BELLAMY LM. NOR activity in cell cultured from different organs of the rabbit. 4th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals 1980: 458-463.
- [19] MAYR B, GRUBER K. Nucleolar organizer regions and heterochromatin in the zebu (*Bos indicus*). *Theor Appl Genet* 1987; **73**: 832–835.
- [20] MELLINK CHM, BOSMA AA, DE HANN NA, WIEGANT J. Distribution of rRNA genes in breeds of domestic pig (*Sus scrofa domestica*) studied by non-radioactive in situ hybridization and selective silver staining. 9th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals 1990: 12.
- [21] MIKELSAAR AV, SCHMID M, KRONE W, SCHWARZACHER HG, SCHNEIDL W. Frequency of Ag-Stained Nucleolar Organizer Regions in the Acrocentric Chromosomes of Man. *Hum Genet* 1977; **37**: 73–75.
- [22] MIYAKE YI, O'BRIENS J, KANEDA Y. Regional Localization of rDNA Gene on Pig Chromosome 10 by in situ Hybridization. *Japan J Vet Sci* 1988; **50**: 341–345.
- [23] MONTEAGUDO LV, ARRUGA MV. NOR activity interaction among the chromosomes of common rabbit: a statistical analysis. *Caryologia* 1991; **44**(1): 85–91.
- [24] MORENO MILLAN M, VALERA CORDOBA M, OCANA QUERO J. Nucleolar Organizer Regions in the mouse Sp 2/0-Ag 14 Cell Line. 10th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals. 1992: 40.
- [25] MORENO MILLAN M, RODERO FRANGANILLO A. NOR- Association Patterns in Goat Chromosomes. 8th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals 1988: 83.
- [26] MURTY VVVS, MITRA AB, SHARMA JK, LUTHRA UK. Nucleolar organizer regions in patients with precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; **18**: 275–279.
- [27] PIENKOWSKA A, ŚWITOŃSKI M. Nie publikowane.
- [28] RICHER CL, POWER MM, KLUNDER LR, Mc FEELY AR, KENT MG. Standard karyotype of the domestic horse (*Equus caballus*). *Hereditas* 1990; **112**: 289–293.
- [29] ROKICKA A. Obszary jąderkotwórcze (NOR) w badaniach cytogenetycznych. *Post Biol Kom* 1985; **12**(2): 145–162.
- [30] RONNE M, SHIBASAKI Y, POULSEN BS. The high resolution R-banded karyotype of *Felis catus*. 8th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals. 1988: 78–82.
- [31] RONNE M, POULSEN BS, SHIBASAKI Y. R-banded karyotypes and NOR association in *Canis familiaris*. 9th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals 1990: 17.
- [32] RUBINI M, NEGRI E, FONTANA F. Standard karyotype and chromosomal evolution of the fallow deer (*Dama dama*). *Cytobios* 1990; **64**: 155–161.



- [33] SASAKI M, NISHIDA C, KODAMA Y. Characterization of silver stained nucleolus organizer regions (Ag-NOR) in 16 inbred strains of the norway rat, *Rattus norvegicus*. *Cytogenet Cell Genet* 1986; **41**: 83–88.
- [34] SOLINAS TOLDO S, PIENKOWSKA A, FRIES R, ŚWITOŃSKI M. Localization of the Nucleolar Organizer Regions in Farm Animals by in situ Hybridization Method with a Probe from a Human rRNA Gene. 10th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals. 1992: 44.
- [35] STRYER L. *Biochemia*. PWN 1992: 742.
- [36] SUMMER TA. Human genetics. MCR 1990: 187–205.
- [37] ŚWITOŃSKI M. Mapowanie genów u zwierząt domowych. *Biotechnologia* 1992: 76.
- [38] ŚWITOŃSKI M. Wykorzystanie zjawiska konserwatywności genetycznej w mapowaniu genów u zwierząt. XI Zjazd Pol. Tow. Genet., Streszczenia. 1992: 13–18.
- [39] ŚWITOŃSKI M, PIETRZAK A. Cytogenetic survey of AI boards; distribution of C-band and Ag-NOR polymorphisms. *Anim Sci Pap Rep* 1992: 9.
- [40] ZAKHAROV AF, DAVUDOV AZ, BENJUSH VA, EGOLINA NA. Polymorphism of Ag-Stained Nucleolar Organizer Region in Man. *Hum Genet* 1982; **60**: 334–339.

Otrzymano: 28.09.1992 r.

Przyjęto: 09.02.1993 r.

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





## GENOMOWY *IMPRINTING*

### GENOMIC *IMPRINTING*

Henryk HÜBNER\*, Anna MORDALSKA\*, Alina BŁASZCZYK\*\*

\*Zakład Biologii, Instytut Nauk Podstawowych, Wojskowa Akademia Medyczna, Łódź;

\*\*Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki, Łódź

*Streszczenie.* W pracy przedstawiono problemy związane z genomowym *imprintingiem* u różnych organizmów. Omówiono związane z tym procesem systemy determinowania płci u niektórych owadów. Przeanalizowano zjawisko genomowego *imprintingu* i jego wpływ na determinację płci u ssaków oraz na dziedziczenie niektórych zespołów sprzężonych z chromosomem X. Przedstawiono wpływ genomowego *imprintingu* na rozwój tkanek płodowych i pozapłodowych u ssaków. Omówiono zależności pomiędzy *imprintingiem* a ekspresją fenotypową dominujących genopatii, chorób nowotworowych i innych u człowieka.

*Słowa kluczowe:* genomowy *imprinting*, ekspresja allelu, determinacja płci

*Summary.* Problems of genomic imprinting in different organisms are presented. Different ways of sex determination associated with imprinting in insects are described. Genomic imprinting is also analyzed in mammals: its influence on sex determination and inheritance some of X-linked syndromes and influence of imprinting on development of embryonic and extraembryonic tissues. Dependences of phenotypic expression of genetic dominant disorders and familiar cancers on genomic imprinting in man are also described.

*Key words:* genomic imprinting, allele expression, sex determination

### WSTĘP

Termin *imprinting* – "piętno" jest zapożyczony przez genetykę z etologii, gdzie oznacza wysoce wyspecjalizowaną, a jednocześnie ograniczoną formę uczenia się. U wielu kręgowców *imprinting* jest zachowaniem, dzięki któremu młode zwierzęta nawiązują kontakty społeczne oraz uczą się bezbłędnie rozpoznawać matkę oraz osobniki swojego gatunku. To wrodzone piętno wywiera wpływ na całe życie zwierzęcia, mimo że może się ono zrealizować jedynie w określonym krótkim czasie po urodzeniu lub wykluciu.

Termin *imprinting* w genetycznym, a ściślej w cytogenetycznym znaczeniu został po raz pierwszy użyty przez Helenę Crouse w 1960 r. [9] dla scharakteryzowania zjawiska eliminacji

chromosomów u *Sciara* (owady, rząd *Diptera*). Pomimo upływu tylu lat od ukazania się tej pierwszej, a następnie licznych innych publikacji [2, 3, 7, 8, 15], dla wielu biologów i lekarzy ciągle jeszcze jest niespodzianką, że matczyne i ojcowskie chromosomy mogą u ssaków oraz innych gatunków funkcjonować u potomstwa odmiennie. W związku z tym różnym, zależnym od pochodzenia funkcjonowaniem materiału genetycznego genomowy *imprinting* proponuje się po polsku nazywać "genomowym piętnem rodzicielskim".

Przy tradycyjnym pojmowaniu praw Mendla nie ma większego znaczenia czy gen decydujący o czerwonej, czy białej barwie kwiatów, pochodzi od rośliny matczynej lub ojcowskiej, bowiem nie wpływa to na jego funkcję. W ostatnich latach wykazano, że u ssaków nie jest obojętne, od którego z rodziców pochodzi komplet chromosomów albo konkretny chromosom, np. heterochromosom X lub określony allel. Istnieją niepodważalne dowody na to, że chromosomy lub geny mogą "zapamiętać" swoje rodzicielskie pochodzenie. U niektórych organizmów konsekwencją *imprintingu* jest odwracalna utrata aktywności jednej z dwu homologicznych sekwencji DNA. W genetycznym ujęciu efekt *imprintingu* jest równoznaczny z hemizygotycznością w określonym locus lub w zespole loci.

Możemy zatem stwierdzić, że genomowe piętno rodzicielskie w ogólnym znaczeniu jest zróżnicowaną modyfikacją i/lub ekspresją u potomstwa homologicznych alleli, czyli regionów chromosomów dziedziczonych od każdego rodzica.

Do tej pory poznane przykłady genomowego *imprintingu* obejmują eliminację ojcowskich chromosomów u *Sciara coprophila* [23] i owadów *Coccoidea* [2], heterochromatyzację i inaktywację heterochromosomu X u ssaków [20, 21], u myszy zróżnicowaną metylację transgenu [38, 39, 44], która może obejmować przyległe sekwencje w miejscu insercji oraz różne formy allelicznego wyłączenia genów ssaków [11]. Ze względu na to, że genomowy *imprinting* jest powiązany z procesami metylacji DNA, które to zjawisko występuje również u roślin [31], należy się spodziewać, że *imprinting* u roślin także zostanie opisany.

## ROLA GENOMOWEGO *IMPRINTINGU* W DETERMINOWANIU PŁCI

Genomowy *imprinting* jest ogólnie specyficzny płciowo, bowiem konsekwencją piętna jest to, że te same funkcje genu, chromosomu lub zestawu chromosomów różnią się w zależności od rodzicielskiego pochodzenia. Wpływ *imprintingu* na determinowanie płci jest oczywiście bardzo interesujący. Do tej pory poznano metodami cytogenetycznymi 3 systemy determinowania płci, z których każdy jest bezpośrednio związany z rodzicielskim piętnem genomowym.

### SYSTEM *SCIARA COPROPHILA*

Zjawisko *imprintingu* u *Sciara* zostało przebadane przez Crouse [7, 8, 9].

U *Sciara imprinting* jest widoczny u niektórych embrionów (nie u wszystkich) jako eliminacja chromosomu i prowadzi do powstania 2 klas zarodków różniących się aktualną, czyli efektywną liczbą kopii poszczególnych chromosomów. Ta różnica w liczbie kopii jest podstawą determinacji płci. Zygoty *Sciara* mają dwa komplety autosomów (A) i 3 chromosomy X, z których dwa są pochodzenia ojcowskiego.

$A^m A^p X^m X^p X^p$



Podczas wczesnych etapów embriogenezy jeden ojcowski chromosom X jest eliminowany z komórek linii płciowej u obydwu płci oraz z komórek somatycznych samicy. Zatem w pierwotnych komórkach płciowych samicy i samca występuje zestaw chromosomów

$$A^m A^p X^m X^p$$

Samica ma zatem we wszystkich komórkach (poza gametami) zestaw chromosomów

$$A^m A^p X^p X^m$$

U samców w komórkach somatycznych eliminacji ulegają oba chromosomy X pochodzenia ojcowskiego i jego kariotyp somatyczny przedstawia się jako

$$A^m A^p X^m$$

Szczególnie interesujące jest to, że zróżnicowana eliminacja chromosomów w komórkach ciała wydaje się być oparta na matczyno kontrolowanym *imprintingu*. Wdrukowane miejsce, odpowiedzialne za eliminację ojcowskich chromosomów X, znajduje się w tych chromosomach i jest położone w pobliżu centromeru. W przypadku translokacji chromosom X/autosom, są eliminowane tylko te, które odznaczają się tą aberracją i które mają chromosom X z centromerem.

### SYSTEM *COCCOIDEA* Z ELIMINACJĄ CHROMOSOMÓW

U owadów panczerwych wszystkie ojcowskie chromosomy są eliminowane podczas podziałów rozwijającego się zarodka i powstają z nich samce. U innych zarodków nie obserwuje się takiej eliminacji i z nich powstają samice [5]. Można zatem stwierdzić, że ojcowskie chromosomy u niektórych zarodków podlegają genomowemu *imprintingowi*. W tym systemie zapłodnienie komórki jajowej jest konieczne, a następnie *imprinting* prowadzi do eliminacji ojcowskich chromosomów, co w końcowym efekcie jest równoznaczne z haplo-diploidalnym systemem determinowania płci podobnym do systemu występującego u *Hymenoptera*.

### SYSTEM *COCCOIDEA* Z INAKTYWACJĄ CHROMOSOMÓW

#### SYSTEM *LECANOIDEA*

U pewnych rozmnażających się płciowo owadów (np. *Planococcus citri*, *Lecanoidea*, *Homoptera*) ojcowski zestaw chromosomów staje się heterochromatynowy i genetycznie nieaktywny u tych zarodków, które rozwijają się w samce [3]. Proces inaktywacji zachodzi podczas wczesnych etapów embriogenezy, a chromosomy pozostają heterochromatynowe w większości tkanek podczas dalszego rozwoju. W zarodkach samic nie ma takiego zróżnicowania między matczynymi i ojcowskimi chromosomami i oba zestawy chromosomów są funkcjonalne. Proces inaktywacji chromosomów odbija się również na przebiegu mejozy: u samców nie zachodzi proces rekombinacji, a wszystkie heterochromatynowe chromosomy są eliminowane. W rezultacie wszystkie plemniki zawierają tylko matczyne chromosomy.

#### SYSTEM *PSEUDOCOCCOIDEA*

Ten system jest wariantem systemu *Lecanoidea*, od którego różni się przebiegiem stadiów premejotycznych i mejotycznych. W premejotycznych profazach występuje destrukcja jednego lub więcej ojcowskich chromosomów, a te które nie uległy rozpadowi są eliminowane w podziałach mejotycznych, zawsze przed spermiogenezą. W efekcie każdy plemnik zawiera również tylko matczyne chromosomy [15].

U pewnych *Coccoidea*, które zwykle rozmnażają się partenogenetycznie, samce mogą (choć rzadko) powstawać z niezapłodnionych komórek jajowych. Mechanizm powstawania takich samców dostarczył nieodpartego dowodu, że *imprinting* występuje w jaju. U *Pulvinaria hydrangeae* haploidalny *pronucleus* niezapłodnionego jaja ulega endomitotycznemu podziałowi i powstałe dwa haploidalne jądra zlewają się i tworzą substytut zygoty. Zazwyczaj takie "diploidalne" zarodki rozwijają się w samice, które kontynuują fakultatywną partenogenezę. W małej liczbie przypadków takich partenogenetycznych zarodków, jeden z dwóch haploidalnych zestawów chromosomów staje się heterochromatyczny we wczesnych etapach rozwoju i z takich zarodków powstają samce. U tych samców wszystkie chromosomy są pochodzenia matczynego. *Imprinting* musiał mieć miejsce w jaju, prawdopodobnie wtedy, gdy funkcjonowały dwa produkty podziału przedjądrza żeńskiego. Jest zatem możliwe, że u owadów *imprinting* ma miejsce w jaju, po wnikięciu mikrogamety i utworzeniu się obu przedjądrzy [5].

Wyżej przedstawione dowody matczynego kontrolowania *imprintingu* wskazują na to, że (przynajmniej u owadów) istnieje matczyna kontrola płci potomstwa. Tym samym *imprinting* może być mechanizmem umożliwiającym regulowanie proporcji osobników obu płci w zależności od warunków ekologicznych.

#### INAKTYWACJA CHROMOSOMU X U SSAKÓW

Nieprzypadkowa inaktywacja chromosomu X u ssaków była pierwszym dla tej gromady przykładem zróżnicowanej ekspresji zależnej od rodzicielskiego pochodzenia materiału genetycznego. Ojcowski chromosom X jest preferencyjnie inaktywowany we wszystkich komórkach samic torbaczy i w błonach płodowych rozwijających się samic gryzoni. Natura bodźca powodującego tę wybiórczą inaktywację nie jest dotychczas wyjaśniona. W komórkach właściwego zarodka myszy inaktywacja jest losowa [20].

Proces inaktywacji chromosomu X zależy od metylacji DNA, w przylegających do genów regionach bogatych w pary C-G [11]. Funkcja tych genów może być reaktywowana przez 5-azacytydynę powodującą demetylację DNA. Inaktywacja chromosomu X jest analogiczna do poniżej omówionego allelicznego wykluczenia, z tym jednak zastrzeżeniem, że w tym przypadku mechanizm kompensacyjny rozciąga się na cały chromosom X.

#### WPŁYW GENOMOWEGO *IMPRINTINGU* NA ROZWÓJ ZARODKOWY SSAKÓW

U ssaków komórki rozwijającego się zarodka nie korzystają w jednakowej mierze z obu odziedziczonych genomów i "wiedzą" prawdopodobnie doskonale, kiedy mają skorzystać z informacji zawartej w matczynym lub ojcowskim homologue. Zatem geny autosomalne, pochodzące od matki i ojca ulegają zróżnicowanej ekspresji u zarodka.

Lawler i wsp. [19] badali komórki zaśnряду groniastego i ustalili, że mają one 46 zupełnie prawidłowych chromosomów, które jednak wszystkie były pochodzenia ojcowskiego. Jest to więc przypadek partenogenezy, która mogła polegać na podwojeniu chromosomów plemnika (całkowite nierozdzielenie się chromosomów) albo na dispermii, przy czym cały matczyny materiał genetyczny został utracony. W przeciwnym przypadku, kiedy wszystkie chromoso-



my są pochodzenia matczynego powstaje potworniak jajnika [8]. Nowotwór ten pochodzi z diploidalnego, partenogenetycznego wzrostu komórek matczynego pochodzenia i dowody cytogenetyczne sugerują, że są one pochodzenia postmejozytycznego. Potworniak jajnika ma diploidalne, matczyne i partenogenetyczne pochodzenie i powstaje w wyniku nienormalnego rozwoju pierwszego ciała kierunkowego lub z fuzji drugiego ciała kierunkowego z przedjądrem komórki jajowej. Jeden z dwóch chromosomów komórek potworniaka jest genetycznie nieaktywny (tworzy ciało Barra), co sugeruje, że mechanizmy genomowego *imprintingu* i inaktywacji chromosomu X są całkowicie matczyne [5].

Rozwój androgenetycznych zygot nie jest prawidłowy, bowiem dochodzi do nadmiernego rozwoju błon płodowych oraz łożyska, natomiast rozwój zarodka jest niewielki i dochodzi do poronienia. Gynogenetyczne zygoty także nie rozwijają się prawidłowo. W przeciwieństwie do poprzednich obserwuje się intensywny rozwój zarodka, ale zahamowany jest rozwój tkanek pozazarodkowych i również dochodzi do poronienia. Przeprowadzone doświadczenia dowodzą, że u ssaków geny matki odpowiadają za wzrost zarodka, natomiast geny ojcowskie są odpowiedzialne za struktury zewnątrzembrionalne, a więc za łożysko i błony płodowe [1].

## WPŁYW GENOMOWEGO *IMPRINTINGU* NA FENOTYP

### GENOMOWY *IMPRINTING* I ALLELICZNE WYKLUCZENIE

Organizmy diploidalne zachowują zdolność do redukcji w mejozie swojego genomu do stanu haploidalnego oraz produkcji gamet męskich i żeńskich. Okazało się także, że u diplotów występują stany, w których potrzebują one tylko haploidalnych zestawów swojego genomu. U ssaków takim dobrze poznanym stanem jest mechanizm determinacji płci oparty na zjawisku haploidalności. Chromosom Y warunkujący rozwój płci męskiej jest u niej obecny w pojedynczej kopii. U płci żeńskiej ten sam efekt jest osiągnięty przez kompensacyjny mechanizm prowadzący we wczesnym stadium embriogenezy do inaktywacji jednego z dwóch chromosomów X. W wyniku tego procesu u samic ssaków geny sprzężone z chromosomem X występują także w dawce haploidalnej.

U organizmów diploidalnych alleliczne wykluczenie, w którego wyniku tylko jeden z dwóch alleli jest aktywny, doprowadza do funkcjonalnej (nie strukturalnej!) haploidalności. Zjawisko allelicznego wykluczenia znane jest w odniesieniu do genów dla immunoglobulin od 1965 r. [43]. Diploidalne komórki produkujące immunoglobuliny nie używają obydwu autosomalnych alleli; dana komórka produkuje jedynie jedną specyficzną immunoglobulinę. Mechanizm odpowiedzialny za to zjawisko został wówczas nazwany allelicznym wykluczeniem [43]. Uważano, że mechanizm tego zjawiska polega na specyficjnej regulacji funkcji genu, po powstaniu – w wyniku połączenia się różnych (V-D-J) domen DNA – funkcjonalnego genu dla immunoglobuliny. Obecnie wydaje się, że jest możliwa inna interpretacja tego zjawiska [11], a mianowicie doświadczenia na transgenicznym myszach można interpretować tak, że jeżeli istnieją już funkcjonalne geny dla immunoglobulin, to ukształtowanie następnych genów jest przez nie blokowane. Znane są również inne przykłady allelicznego wykluczenia [11]. Nowe mutacje mogą być *in vitro* łatwo indukowane w komórkach linii CHO (wyprowadzonej z jajnika chomika chińskiego) przez standardowe silne mutageny, jak np. EMS, a liczne rewersje tych mutacji zachodzą niespodziewanie pod wpływem słabego mutagenu, jakim jest

5-azacytydyna, mająca właściwości demetylujące. Wyniki te sugerują, że komórki wstępnie miały allel aktywny i allel nieaktywny (metylowany). Pierwszy allel był wystawiony na działanie mutagenu i zmutował, natomiast drugi uaktywnił się po demetylacji [11]. Powyższy mechanizm został potwierdzony podczas doświadczeń na innych genach [26, 33].

Doświadczenia *in vitro* pozwoliły na dość dobre poznanie wpływu procesów metylacji na alleliczne wykluczenie. Do tej pory bardzo niewiele jednak wiadomo o tych mechanizmach zachodzących *in vivo* u ssaków. Genomowy *imprinting*, powodujący alleliczne wykluczenie, prawdopodobnie może powodować znaczne odchylenie od statystycznie spodziewanych proporcji alleli u potomstwa. Jest przy tym mniej istotne, czy alleliczne wykluczenie jest wynikiem genomowego *imprintingu* u matki czy u ojca.

### CYTOGENETYCZNE DOWODY GENOMOWEGO *IMPRINTINGU*

Monoparentalne disomie kilku regionów chromosomów mogą powodować różnorodne fenotypy od prenatalnie letalnych do zespołów, które cechują się zaburzeniami rozwoju, żywotności i behawioru. Matczyna disomia proksymalnej części chromosomu 11 powoduje, że myszy są mniejsze niż normalne, podczas gdy myszy z ojcowską disomią tego samego fragmentu chromosomu 11 są większe niż w normie.

Chromosomowy *imprinting* dobrze obrazuje tzw. mysz Cattanacha. W chromosomie nr 7 myszy znajduje się locus dla genu barwy sierści. Inny allel w tym szczepie myszy powoduje powstanie brązowej sierści. Mysz Cattanacha ma w obu chromosomach 7 geny albinotyczne, warunkujące białą sierść, ale segment o długości 1/3 chromosomu 7 z genem brązowego zabarwienia sierści znajduje się w wyniku translokacji pośrodku jednego chromosomu X. Drugi chromosom X jest normalny. Zgodnie z hipotezą Lyon [20] chromosomy X ulegają losowej inaktywacji. Wszędzie tam, gdzie aktywny jest chromosom X mający segment chromosomu 7, myszy mają brunatną sierść. Tam, gdzie aktywny jest normalny chromosom X, myszy mają białą sierść.

Jeżeli genomowy *imprinting* może obejmować istotną część genomu ssaków, to można oczekiwać, że zmienna penetracja i zmienna ekspresja niektórych genów może być związana z rodzicielskim pochodzeniem materiału genetycznego. U myszy mamy taki rzadki dowód: mutacja *Thp* letalna. Zarodki z delecją w T kompleksie giną, jeżeli odziedziczą mutację od swojej matki, ale przeżywają, jeżeli tę mutację odziedziczą po ojcu.

Zdaniem Willisona [44], dotychczasowe wyniki doświadczeń analizujących skutki uniparentalnej disomii u myszy oraz wpływu genomowego *imprintingu* na pojedyncze geny można zebrać we wniosk, że liczba genów sprzężonych z autosomami i wykazujących efekt rodzicielskiego piętna genomowego jest niewielka, u myszy dotyczy tylko około dziesięciu genów.

## GENOMOWY *IMPRINTING* W GENETYCE CZŁOWIEKA

### ZMIENNY WIEK WYSTĘPOWANIA DOMINUJĄCYCH GENOPATII

Badania przeprowadzone na transgenicznym myszach dowodzą, że genomowy *imprinting* działa również na poziomie pojedynczego miejsca genowego. Reik i wsp. [33] oraz Sapienza i wsp. [34] wykazali, że wzór metylacyjny wokół wstawionego transgeny i jego transkrypcyj-



na aktywność mogą się w mysim płodzie różnić w zależności od płci rodzica, od którego pochodzi. Różnice te mogą być tkankowo specyficzne, dlatego też istotne jest badanie wzorów metylacji na poziomie pojedynczego locus, a nie na poziomie genomu oraz w tkance, ani na poziomie całego organizmu.

U człowieka pośród autosomalno dominujących genopatii występują takie, u których wiek występowania i/lub ciężkość objawów jest zależna od płci dotkniętego chorobą rodzica. Płasawica Huntingtona wykazuje szeroką zmienność, jeżeli chodzi o wiek występowania pierwszych objawów. Gdy patologiczny gen jest dziedziczony od ojca, objawy chorobowe występują wcześniej – średnio w 33 roku życia, jeżeli gen pochodzi od matki objawy występują później – średnio w 42 roku życia [28, 29]. Ta statystycznie istotna różnica może być tłumaczona rodzicielskim piętnem genomowym, które może poprzez metylowanie redukować aktywność normalnego allelu pochodzącego od matki, z pozostawieniem – jako allelu funkcjonującego – allelu płasawicy Huntingtona pochodzącego od ojca [6]. Powyższa teza nie jest jednak molekularnie udowodniona, tym bardziej, że potrzebny jest dowód na to, iż istotnie *imprinting* jest odwracany przy każdym przejściu chromosomu przez linię komórek płciowych. Pośredni dowód na to odwracanie dostarczyły badania Myersa i wsp. [27] wskazujące, że w płasawicy Huntingtona modyfikujący wpływ płci obciążonego rodzica występuje w pojedynczej rodzicielskiej generacji, a nie jest kumulowany przez poszczególne pokolenia.

Dystrofia miotoniczna jest przykładem choroby, w której występuje zjawisko antycypacji [12] polegającej na tym, że objawy chorobowe u potomstwa są bardziej nasilone i manifestują się wcześniej niż u rodziców. U większości nosicieli mutacji zaniki mięśniowe występują w drugiej, trzeciej lub czwartej dekadzie życia. Największą osobliwością w tym zespole jest istnienie u potomstwa obciążonych matek ciężkiej miopatii manifestującej się już podczas życia wewnątrzmacicznego. Rodzicielskie piętno genomowe mogłoby być wyjaśnieniem dla takiego wczesnego występowania objawów chorobowych, ale do tej pory brak bezpośrednich dowodów prawdziwości tej hipotezy.

Ataksja rdzeniowo-mózdkowa cechuje się pełną penetracją, ale średni wiek początku choroby i średni wiek umierających chorych jest znacząco niższy u dzieci ojców obciążonych ataksją niż u dzieci matek obciążonych ataksją.

## RODZINNE WYSTĘPOWANIE NOWOTWORÓW

Interesujące dowody na kliniczne znaczenie genomowego piętna rodzicielskiego dla funkcjonowania pojedynczego genu zostały dostarczone poprzez odkrycia onkologiczne. Dobrym przykładem są tu odkrycia dotyczące nowotworu kłębk. Dominujący gen powodujący powstanie tego rzadkiego, łagodnego nowotworu manifestuje się jedynie u tych osób, które odziedziczyły go po ojcu. Model dziedziczenia jest więc taki, że matczyny gen jest inaktywowany podczas oogenezy i może być ponownie aktywowany podczas spermatogenezy [24].

W nowotworach uwarunkowanych recesywnie obydwa allele nowotworowego, supresorowego genu są tracone; pierwszy przez mutację, a drugi często przez somatyczną rekombinację i/lub nondysjunkcję. W nowotworze Wilmsa związanym z delecją 11p, w retinoblastoma i w osteosarkoma, w których utrata następuje w 13q, chromosom matczyny jest gubiony dużo częściej niż ojcowski.

W rodzinnych przypadkach siatkówczaka muszą ulec mutacji obie homologiczne kopie genu retinoblastoma, których locus znajduje się w chromosomie 13 i dopiero wówczas możliwa jest transformacja nowotworowa. Jeden z allelicznych genów retinoblastoma (RB1) ulega często delecji w linii zarodkowej, zwykle w ojcowskim chromosomie 13. Ten ojcowski gen RB1 jest także często zmutowany w sporadycznych przypadkach osteosarkoma (ale nie w sporadycznych przypadkach retinoblastoma), co powoduje, że przeżywające osoby z rodzinnym retinoblastoma są bardzo narażone na wystąpienie u nich mięsaka. Dla wyjaśnienia preferencyjnego zatrzymywania ojcowskiego chromosomu w osteosarkoma przyjmuje się, iż *imprinting* powoduje, że chromosomy są różnie podatne na mutację, a matczyzny allel może być względnie tłumiony przez metylację. Zatem, aby rozwinął się proces nowotworowy, allel matczyzny powinien być utracony. W znacznej części recesywnych nowotworów region chromosomowy, który jest uznawany za niosący mutację, pozostaje heterozygotyczny. Zdaje się to dowodzić, że *imprinting* może czasami uczynić jeden z alleli całkowicie nieaktywnym i dlatego nie jest gubiony.

#### OPÓŹNIENIE UMYSŁOWE ZWIĄZANE Z KRUCHYM X

Zespół objawów chorobowych opisanych w 1943 r. przez Martina i Bella [22], którego cytogenetyczną cechą jest łamliwość chromosomu X w prążku Xq27.3 [40], zasługuje na szczególną uwagę ze względu na to, iż jest to najczęstsza przyczyna występowania dziedzicznego upośledzenia umysłowego sprzężonego z chromosomem X [42] oraz ze względu na odstępstwa od znanych reguł dziedziczenia. Około 30% nosicielek tego genu wykazuje upośledzenie umysłowe, podczas gdy 20% mężczyzn posiadających ten gen jest umysłowo normalnych [36].

Występują także różnice w spodziewanej częstości tego zespołu u braci obciążonych mężczyzn [35]. Liczne odmienności w dziedziczeniu tego zespołu spowodowały rozwój badań zmierzających do ich wyjaśnienia [4, 10, 14, 30, 32, 37].

Model zaproponowany przez Lairda [16, 17] jest oparty na genomowym *imprintingu*. Ujawnianie lub nieujawnianie się objawów chorobowych sprowadza się do różnic pomiędzy zmutowanym (ale nie poddanym *imprintingowi*) chromosomem fra-X i zmutowanym (i poddanym *imprintingowi*) chromosomem fra-X. Występowanie cytogenetycznego objawu, jakim jest łamliwość chromosomu X w prążku q27.3, jest zdaniem Lairda zależne od *imprintingu*. Chromosom X z mutacją fra-X poddany procesowi *imprintingu* ma być łamliwy, natomiast chromosom z tą samą mutacją, ale nie poddany procesowi *imprintingu* ma być niełamliwy [18].

Mężczyźni z pełnymi objawami zespołu Martina-Bella mają zdaniem Lairda i wsp. [16, 17] zmutowany, aktywny chromosom X nie poddany procesowi *imprintingu*. U mężczyzn, którzy odziedziczyli chromosom fra-X, a nie są chorzy, występuje miejscowy *imprinting* mutacji fra-X. Kobiety – nosicielki przejawiają niektóre cechy tego zespołu w zależności od przypadkowej inaktywacji (lyonizacji) chromosomu X. Mogą one uniknąć objawów chorobowych, jeżeli inaktywacji ulegnie więcej niż 50% komórek z mutacją kruchego chromosomu X. Powyższy model wymaga jednak doświadczonego potwierdzenia.



## POSTULOWANE MECHANIZMY GENOMOWEGO *IMPRINTINGU* W MEJOZIE

Dotychczas zebrane dane wskazują, że rodzicielskie piętno genomowe w sposób niezmienny przechodzi przez podział mitotyczny, ale może zostać wymazane podczas podziału mejotycznego. Hulten i Hall [13] sugerują istnienie poniższych etapów mechanizmu genomowego *imprintingu*:

- (a) wymazanie jakiegoś poprzedniego piętna genomowego,
- (b) naniesienie nowej modyfikacji rodzicielskiego genomu,
- (c) tkankowo specyficzna fenotypowa ekspresja rodzicielskiego *imprintingu* u potomstwa.

Inaktywowany chromosom X samicy ssaka jest całkowicie aktywny u potomstwa. W przypadku zygoty XY pozostaje aktywny we wszystkich komórkach potomnych, a w przypadku zygoty XX może znowu ulec genetycznej inaktywacji. Być może, że ten ogólnie znany proces lyonizacji chromosomu X jest szczególnym przypadkiem nałożonym na generalne mechanizmy autosomalnego *imprintingu*. Molekularne mechanizmy piętna genomowego zdają się być powiązane z metylacją CpG. Metylacja związana z rozrodczą linią komórek mogłaby mieć miejsce podczas podziałów mitotycznych poprzedzających mejozę lub podziałów mejotycznych, lub w okresie pomejotycznym. Z badań Monka [25] wynika, że u myszy zjawisko autosomalnego *imprintingu* zachodzi w mejozie wraz z metylacją DNA. Metylacja wywiera wpływ na konfigurację chromatyny i raz podczas gametogenezy wprowadzona do chromosomów mogłaby być powielana aż do chwili aktywacji danego genu.

Zdaniem Hultona i Halla [13] proces wymazania poprzedniego i naniesienia nowego *imprintingu* zachodzi w profazie I mejozy, w stadiach zygotenu i pachytenu, w których matczyne i ojcowskie homologe są ściśle sparowane. Zdaniem tych autorów jest również prawdopodobne, że po normalnie przebiegającym procesie pachytenowej koniugacji nie powinno nic pozostać z poprzedniej "chromosomowej pamięci"; zaburzenie procesu koniugacji może prowadzić do zaburzenia zapisu nowego rodzicielskiego piętna genomowego. Krytycznym momentem prawidłowości przebiegu zmiany *imprintingu* miałyby być stopień kondensacji chromatyny w pachytenie. Im mniej skondensowane są chromosomy mejotyczne, tym łatwiej może przebiegać proces demetylacji lub metylacji i na odwrót. Interesujące jest, że u człowieka występuje zależna od płci różnica w długości chromosomów pachytenowych: żeńskie są w przybliżeniu 50% dłuższe niż męskie [41]. Ta istotna różnica w długości chromosomów może być morfologicznym wykładnikiem odmienności w genomowym *imprintingu* pomiędzy płcią żeńską a męską.

## KLASY *IMPRINTINGU*

Wielorakość problemów związanych z genomowym *imprintingiem* spowodowała, że podjęto próbę jego klasyfikacji. Poniżej przedstawiona zostanie klasyfikacja opracowana przez Chandrę i Nanjudiaha [5].

***Imprinting* specyficzny dla gamety.** Dotyczy zróżnicowanej modyfikacji lub ekspresji allelu zależnie od tego, czy dziedziczony jest on przez plemnik czy przez jajo. Przykładem tej klasy *imprintingu* jest preferencyjna inaktywacja alleli ojcowskiego chromosomu X w błonach płodowych gryzoni.

**Imprinting specyficzny dla szczepu i gatunku.** W międzygatunkowych krzyżówkach myszy mogą być preferencyjnie inaktywowane chromosomy X pochodzące od jednego gatunku. Zjawiska tego nie obserwuje się w międzygatunkowych krzyżówkach u lisów.

**Imprinting specyficzny dla allelu.** W pewnej liczbie loci u człowieka może występować zróżnicowana metylacja. Wzór metylacji specyficzny dla danego allelu jest dziedziczony przez kilka pokoleń. Te allele są nieodwracalnie modyfikowane i imprintowane. Jeżeli taka modyfikacja powodowałaby wyciszenie ekspresji allelu, byłoby to równoznaczne z efektem mutacji. Taką dziedziczną modyfikację ekspresji genu Holliday [11] nazwał epimutacją.

## EWOLUCYJNY ROZWÓJ GENOMOWEGO *IMPRINTINGU*

Chandra i Nanjudiah [5] zakładają 3 możliwe drogi ewolucyjnego rozwoju genomowego *imprintingu*, a mianowicie:

**A.** *Imprinting* może być korzystny sam w sobie, gdy wdrukowane i niewdrukowane allele tego samego locus dają inne fenotypy. Jeżeli segment DNA ma rodzicielskie piętno genomowe w gametach jednej płci, a nie mają go gamety drugiej płci, to może to prowadzić do efektów skorelowanych z dymorfizmem płciowym. U pewnych organizmów determinowanie płci może być uwarunkowane *imprintingiem*; tym samym matczyzna kontrola płci potomstwa jest możliwą korzystną konsekwencją *imprintingu*.

**B.** Geny odpowiedzialne za *imprinting* mogą mieć plejotropowe efekty i mogą ulegać selekcji z różnych innych powodów. Nie ma do tej pory dowodów na taką ewolucję genomowego *imprintingu*.

**C.** Genomowy *imprinting* mógłby koewoluować wraz z innymi cechami. Takimi innymi cechami mogłyby być np. brak zdolności do rozwoju androgenetycznych i gynogenetycznych diploidów oraz wzmacnianie znaczenia anizogamii w rozmnażaniu płciowym. Spośród wszystkich kombinacji wielkości gamet prowadzących do powstania zygoty połączenie mikrogaMETA - makrogaMETA ma największą przeżywalność [32].

## ZAKOŃCZENIE

Za genomowy *imprinting* są odpowiedzialne procesy metylacji DNA, jak to udowodniono metodami biochemicznymi (cięcie enzymami restrykcyjnymi, reakcja PCR). Jest jednak szereg pytań, na które nie ma odpowiedzi, np:

- Czy metylacja poprzedza, czy następuje po inaktywacji lub reaktywacji genów sprzężonych z chromosomem X?

- Pewne transgeny są różnie metylowane w plemnikach i w komórkach jajowych. Nie wiadomo jednak, jak dalece jest ten wzór następnie dziedziczony.

Na podstawie szeregu badań wiadomo obecnie, że genom plemników jest bardziej metylowany niż genom jaja, chociaż obydwa są ogólnie niedometylowane w porównaniu z tkankami somatycznymi. Wydaje się ponadto, że po zapłodnieniu następuje proces demetylacji. W zarodku przed implantacją nie ma dla wszystkich sekwencji dużego sygnału procesu metylacji *de novo*. Wykrywalna metylacja *de novo* rozpoczyna się blisko momentu implantacji i wzrasta podczas gastrulacji.



## LITERATURA

- [1] BARTSCH O, HÜBNER H, MORDALSKA A. Formation and significance of uniparental disomy. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 311–322.
- [2] BROWN SW, BENNETT FD. On sex determination in the diaspine scale *Pseudaulacaspis pentagona* (Targ.) (*Coccoidea*). *Genetics* 1957; **42**: 510–523.
- [3] BROWN SW, NELSON-REES WA. Radiation analysis of a lecanoid genetic system. *Genetics* 1961; **46**: 983–1007.
- [4] BROWN WT, SHERMAN SL, DOBKIN CS. Hypothesis regarding the nature of the fragile X mutation. *Hum Genet* 1987; **75**: 294–295.
- [5] CHANDRA HS, NANJUDIAH V. The evolution of genomic imprinting. *Development* 1990; Suppl.: 47–53.
- [6] CLARKE A. Genetic imprinting in clinical genetics. *Development* 1990; Suppl.: 131–139.
- [7] CROUSE HV. An inducible change in state on the chromosomes of *Sciara*: Its effects on the genetics components of the X. *Chromosoma* 1966; **18**: 230–253.
- [8] CROUSE HV, BROWN A, MUNFROD BC. L-chromosome inheritance and the problem of "imprinting" in *Sciara* (*Sciaridae, Diptera*). *Chromosoma* 1971; **34**: 324–339.
- [9] CROUSE HV. The controlling element in sex chromosome behaviour in *Sciara*. *Genetics* 1960; **45**: 1425–1443.
- [10] HOEGERMAN SF, RARY JM. Speculations on the role of transposable elements in human genetic disease with particular attention to achondroplasia and the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1986; **23**: 685–699.
- [11] HOLLIDAY R. Genomic imprinting and allelic exclusion. *Development* 1990; Suppl.: 125–129.
- [12] HOWELER CJ, BUSH HFM, GERAEDTS JPM, NIERMEIJER MF, STAAL A. Anticipation in myotonic dystrophy: Fact or fiction. *Brain* 1989; **112**: 779–797.
- [13] HULTEN MA, HALL JG. Proposed meiotic mechanism of genomic imprinting. *Chromosomes Today* 1990; **10**: 157–162.
- [14] ISRAEL MH. Autosomal suppressor gene for fragile-X: An hypothesis. *Am J Med Genet* 1987; **26**: 19–31.
- [15] KITCHIN RM. A radiation analysis of a *Comstockiella* chromosome system: destruction of heterochromatic chromosomes during spermatogenesis in *Parlatoria oleae*. *Chromosoma* 1970; **31**: 165–197.
- [16] LAIRD CD. Proposed mechanism of inheritance and expression of the human fragile-X syndrome of mental retardation. *Genetics* 1987; **117**: 587–599.
- [17] LAIRD CD, LAMB MM, THORNE JL. Two progenitor cells for human oögonia inferred from pedigree data and the X-inactivation imprinting model of the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet* 1990; **46**: 696–719.
- [18] LAIRD CD, SVED J, THORNE J, LAMB M. The X-inactivation imprinting model of the fragile-X syndrome: annotated references, 1989. *Chromosome Today* 1990; **10**: 163–165.
- [19] LAWLER SD, POVEY S, FISCHER RA, PICKTHAL VJ. Genetic studies on hydatidiform moles. II. The origin of complete moles. *Ann Hum Genet* 1982; **46**: 209–222.
- [20] LYON MF. Gene action in the X chromosome of the mouse. *Nature* 1961; **190**: 372–373.
- [21] LYON MF. The quest for the X-inactivation centre. *Trends Genet* 1991; **7**: 69–70.
- [22] MARTIN JP, BELL J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Psychiatr* 1943; **6**: 154–157.
- [23] METZ CW. Chromosome behaviour, inheritance and sex determination in *Sciara*. *Am Nat* 1938; **72**: 485–520.
- [24] MEY van der AGL, MAASWINKEL-MODY PD, CORNELISSE CJ, SCHMIDT PH, KAMP van der JJP. Genomic imprinting in hereditary glomus tumours: Evidence for new genetic theory. *Lancet* 1989; **11**: 1291–1294.
- [25] MONK M. Genomic imprinting. *Genes and Development* 1988; **2**: 921–925.
- [26] MONK M, GRANT M. Preferential X-chromosome inactivation DNA methylation and imprinting. *Development* 1990; Suppl.: 55–62.
- [27] MYERS RH, CUPPLES LA, SCHOENFELD M, D'AGOSTINO RB, TERRIN NC, GOLDMAKHER N, WOLF PA. Maternal factors in onset of Huntington Disease. *Am J Hum Genet* 1985; **37**: 511–521.
- [28] MYERS RH, GOLDMAN D, BIRD ED, SAX DS, MERRIL CR, SCHOENFELD M, WOLF PA. Maternal transmission in Huntington's disease. *Lancet* 1883; **1**: 208–210.
- [29] MYERS RH, MADDEN JJ, TEAGUE JL, FALEK A. Factors related to onset age of Huntington disease. *Am J Hum Genet* 1982; **34**: 481–488.
- [30] OBERLE I, HEILING R, MOISAN JP, KLOEPFER C, MATTEI MG, MATTEI JF, BOUE J, FROSTER-ISKENIUS U, JACOBS P, LATHROP GM, LALOUEL JM, MANDEL JL. Genetic analysis of the fragile-X mental retardation syndrome with two flanking polymorphic DNA markers. *Proc Nat Acad Sci USA* 1986; **83**: 1016–1020.
- [31] OLSZEWSKA MJ, SAKOWICZ T. Metylacja DNA u roślin. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 253–262.
- [32] PEMBREY M, FENNEL SJ, BERGHE van der J, FITCHETT M, SUMMERS D, BUTLER L, CLARKE C, GRIFFITHS M, THOMPSON E, SUPER M, BARAITSER M. The association of Angelman's syndrome with deletions within 15q11-13. *J Med Genet* 1989; **26**: 73–77.



- [33] REIK W, COLLICK A, NORRIS ML, BARTON SC, SURANI MA. Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. *Nature* 1987; **328**: 248–251.
- [34] SAPIENZA C, PETERSON AC, ROSSANT J, BALLING R. Degree of methylation of transgenes is dependent on genome of origin. *Nature* 1987; **328**: 251–254.
- [35] SHERMAN SL, JACOBS PA, MORTON NE, PROSTER-ISKENIUS U, HOWARD-PEEBLES PN, NIELSEN KB, PARTINGTON MW, SUTHERLAND GR, TORNER G, WATSON M. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985; **69**: 289–299.
- [36] SHERMAN SL, MORTON NE, JACOBS PA, TURNER G. The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet* 1984; **48**: 21–37.
- [37] STEINBACH P. Mental impairment in Martin-Bell syndrome is probably determined by interaction of several genes: simple explanation of phenotypic differences between unaffected and affected males with the same X chromosomes. *Hum Genet* 1986; **72**: 248–252.
- [38] SURANI MA, KOTHARY R, ALLEN ND, SINGH PB, FUNDELE RF, FERGUSON-SMITH AC, BARTON SC. Genome imprinting and development in the mouse. *Development* 1990; Suppl: 89–98.
- [39] SURANI MA, REIK W, ALLEN ND. Transgenes as molecular probes for genomic imprinting. *Trends Genet* 1988; **4**: 59–62.
- [40] SUTHERLAND GR, ASHFORTH PLC. X-linked mental retardation with macroorchidism and the fragile site at Xq26 or 27. *Hum Genet* 1979; **48**: 117–120.
- [41] WALLACE BMN, HULTEN MA. Meiotic chromosome pairing in the normal human female. *Ann Hum Genet* 1985; **49**: 215–226.
- [42] WEBB TP, BUNDEY S, THAKE A, TODD J. The frequency of the fragile X chromosome among schoolchildren in Coventry. *J Med Genet* 1986; **23**: 396–399.
- [43] WEILER E. Differential activity of allelic  $\gamma$ -globulin genes in antibody-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965; **54**: 1765–1772.
- [44] WILLISON K. Opposite imprinting of the mouse *Igf2* and *Igf2r* genes. *Trends Genet* 1991; **7**: 107–109.

Otrzymano: 27.01.1993 r.

Przyjęto: 09.02.1993 r.

Adresy autorów: 90-647 Łódź, Pl. Hallera 1 i 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16.

## BIAŁKA SZOKU TERMICZNEGO I ICH ROLA W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

### HEAT SHOCK PROTEINS AND THEIR ROLE IN PLANT CELLS

Joanna PORANKIEWICZ, Edward Antoni GWÓŹDŹ

Zakład Ekofizjologii Roślin, Poznań

*Streszczenie.* W artykule przedstawiono wyniki badań nad białkami szoku termicznego (HSPs) w zakresie regulacji ich biosyntezy oraz pełnionych funkcji. Przeprowadzono charakterystykę poszczególnych klas HSP, ich lokalizację w odpowiednich przedziałach komórkowych oraz rolę w metabolizmie komórek roślinnych. Pod względem molekularnym reakcja roślin i zwierząt na bodziec termiczny jest bardzo podobna, jednakże cechą charakterystyczną dla roślin jest ekspresja białek szoku termicznego o niskich masach cząsteczkowych, tj. w zakresie 16–28 kDa. Przedstawiono dane wskazujące na pełnienie przez białka szoku termicznego funkcji ochrony ważnych struktur i białek komórkowych przed szkodliwym oddziaływaniem wysokiej temperatury. Omówiono również te badania, które wskazują na ważną rolę, jaką białka te bądź ich homologi odgrywają w komórkach w warunkach normalnej temperatury polegającą na usprawnieniu, a nawet umożliwieniu tak ważnych procesów, jak łączenie się podjednostek enzymatycznych czy przyjęcie przez dane białko właściwej konformacji przestrzennej. Omówiono zjawisko termotolerancji, którą nabywają rośliny poddane preinkubacji w podwyższonej temperaturze, w której syntetyzowane są HSP, mające decydujące znaczenie dla przeżywania stresu temperaturowego. Przedstawiono także przyszłe kierunki badań zmierzających z jednej strony do lepszego poznania mechanizmów indukcji ekspresji genów HSP oraz te badania, w których uzyskano już obiecujące wyniki co do możliwości indukowania pewnych procesów rozwojowych za pomocą wysokiej temperatury u roślin z włączonym do genomu promotorem HS.

*Słowa kluczowe:* białka szoku termicznego, stres, termotolerancja

*Summary.* We present current achievements in investigations on heat shock proteins (HSPs) in respect to their biosynthesis and functions. A detailed characteristic of particular families of HSPs is given as well as their compartmentation and role in cell metabolism. The response of both plant and animal cells to elevated temperature is essentially similar, however, a characteristic feature of plant response is the expression of low molecular weight HSPs in range of 16–28 kDa. The mechanism of transcriptional and translational control of expression of HS genes coded for HSPs is also described. Data are presented, which seem to indicate that HSPs often function as molecular chaperones and in this way protect important cellular structures and proteins against detrimental effect of thermal stress. There are evidences indicating on the crucial role of both HSPs and their homologues in normal non-stressed cells in catalyzing the assembly of enzyme subunits as well as facilitating folding of some proteins into their biologically active forms. Acquisition of tolerance to lethal heat treatment of plant in most cases is dependent on and correlated to the synthesis of HSPs in plant cells pretreated with nonlethal heat shock. Future topics and perspectives of studies in heat shock proteins are mostly concentrated on the mechanism of heat induced gene expression and application of HS promoters in thermal induction of some foreign genes in transgenic plants and in this way to control developmental and metabolic processes in plants.



**Key words:** stress, heat shock proteins, thermotolerance

**Wykaz skrótów:** ER (*Endoplasmatic Reticulum*) – siateczka śródplazmatyczna, HS (*Heat Shock*) – szok termiczny, HSP (*Heat Shock Proteins*) – białka szoku termicznego, HSC (*Heat Shock Cognate Proteins*) – białka pokrewne białkom szoku termicznego, HSG (*Heat Shock Granules*) – ziarnistości cytoplazmatyczne, HSF (*Heat Shock Factor*) – czynnik transkrypcji genów szoku termicznego, HSE (*Heat Shock Element*) – sekwencja regulatorowa nukleotydowa regionu promotorowego HSgenów przylączająca HSF, RuBP (*Ribulose Bisphosphate*) – rybulozo-1,5-bisfosforan.

## WSTĘP

W swoim naturalnym środowisku rośliny poddawane są oddziaływaniu wielu czynników stresowych, często o takim stopniu nasilenia, który stwarza warunki stresowe, to jest znacznie odbiegające od optymalnych. Jednym z takich czynników stresowych, niekorzystnie wpływających na wzrost i metabolizm komórek jest szok temperaturowy, a reakcja roślin na ten rodzaj stresu jest dotąd najlepiej scharakteryzowana pod względem molekularnym [64, 80].

Odpowiedź komórek na stres termiczny polega na ograniczeniu wytwarzania normalnych białek i indukcji syntezy nowych, specyficznych białek szoku termicznego (*Heat Shock Proteins* – HSP). Taki mechanizm odpowiedzi na wysoką temperaturę jest wysoce konserwatywny i występuje zarówno u organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych.

Białka szoku termicznego oraz mechanizmy regulujące ich syntezę mają już dzisiaj bogatą literaturę, nie tylko w postaci oryginalnych prac, ale także w formie artykułów przeglądowych i książek [10, 11, 56, 58, 64, 67, 80, 88]. W polskim piśmiennictwie naukowym białka te zostały już omówione u bakterii i w komórkach zwierzęcych [51, 52, 58, 82], stąd w tym artykule skoncentrowano się głównie na doniesieniach dotyczących komórek roślinnych.

W 1962 r. F. M. Ritossa [74] zwrócił uwagę na aktywację genów u *Drosophila melanogaster* przez szok termiczny, a w roku 1974 Tissieres i wsp. [84] opisali po raz pierwszy syntezę białek szoku termicznego pod wpływem wysokiej temperatury. Warto jednak zaznaczyć, że już w 1864 r. niemiecki fizjolog roślin Julius Sachs interesował się określeniem górnych zakresów temperaturowych dla życia roślin i opisał zmiany w strukturze komórki pod wpływem wysokiej temperatury [67].

U roślin temperatura wywołująca odpowiedź na szok termiczny w postaci syntezy specyficznych białek jest zróżnicowana w zależności od gatunku i na ogół wynosi ona od 10–15°C powyżej wyznaczonej doświadczalnie optymalnej temperatury wzrostu [11]. Podobnie jak u zwierząt, również u roślin można wyróżnić trzy fazy odpowiedzi na wysoką temperaturę: indukcję syntezy (kilka minut), syntezę HSP (1–3 godzin) i rozpad białek szoku termicznego (12–50 godzin) [67].

Białka stresu temperaturowego (HSP) należą do kilku rodzin i zostały sklasyfikowane w zależności od ich relatywnej masy cząsteczkowej wyrażonej w kilodaltonach (kDa), którą z kolei wyznaczono na podstawie ruchliwości tych polipeptydów w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Nie są to więc białka natywne, ale komponenty większych cząsteczek, co należy uwzględnić przy ich charakterystyce funkcjonalnej. Białka szoku termicznego zgrupowano w następujące rodziny: HSP90 i HSP110, HSP70, HSP60, niskocząsteczkowe HSP (30–16 kDa) i HSP 8.5.



Pewne geny szoku termicznego mają swoje odpowiedniki (*Heat Shock Cognate Genes*), które ulegają ekspresji w komórkach nie poddanych działaniu stresu termicznego, a translacja tych matryc daje pokrewne białkom szoku termicznego – HSC (*Heat Shock Cognate Proteins*) [88].

Zwiększony poziom białek szoku termicznego w komórkach roślinnych nie jest związany wyłącznie z oddziaływaniem wysokiej temperatury, ale występuje również pod wpływem wielu innych czynników stresowych i toksycznych, takich jak: metale ciężkie [24], arsen [24], deficyt wodny [37], hormony steroidowe, błękit metylenowy, glukozamina, analogi aminokwasów [11]. Jednak warto podkreślić, że synteza pełnego kompletu białek szoku termicznego ma miejsce tylko w warunkach stresu powodowanego przez wysoką temperaturę.

## KLASYFIKACJA BIAŁEK SZOKU TERMICZNEGO

### RODZINA HSP90 I HSP110

Do klasy HSP90 należą białka o masie cząsteczkowej 80–94 kDa, które są obecne w większości komórek eukariotycznych, gdzie mogą stanowić od 1–2% białek całkowitych [36].

Cytoplazmatyczne formy HSP90 (nazywane także GRP94) u kręgowców są zlokalizowane w siateczce śródplazmatycznej, gdzie ulegają syntezie w warunkach głodu glukozowego [57]. Tworzą też kompleksy z nieaktywnymi hormonami steroidowymi, aktywną i produktami pewnych onkogenów [67]. Białka z rodziny HSP90 występują również w cytoplazmie komórek nie poddanych działaniu czynników stresowych [88].

Geny kodujące białka homologiczne do HSP90 zostały dopiero ostatnio wyizolowane z organizmów roślinnych [88]. U *Arabidopsis* stwierdzono, że dwa geny HSP90 wykazują 80% identyczność, a także uderzające podobieństwo z rodziną HSP90 z drożdży i komórek zwierzęcych [83].

Pewne białka z tej rodziny funkcjonują jako białka osłaniające (*molecular chaperones*). Ostatnie doniesienia wskazują, że HSP90 może wpływać na proces zwijania (*folding*) białek w warunkach *in vitro*, hamując powstawanie białkowych agregatów przez niespecyficzne wiązanie się z białkiem docelowym i umożliwienie nabycia przez nie właściwej konformacji przestrzennej [90].

Większość organizmów eukariotycznych, w tym także rośliny, syntetyzuje wysokocząsteczkowe białka szoku termicznego o masie cz. ok. 110 kDa, które związane są z frakcją cytozolową [18, 56]. U roślin synteza HSP110 trwa najkrócej w porównaniu z innymi białkami szoku termicznego i ograniczona jest do pierwszej godziny szoku [88]. Ekspresja drożdżowego genu HSP104 nie jest niezbędna dla wzrostu komórek w normalnej i podwyższonej temperaturze, jednak delecyjne mutanty drożdżowe pozbawione HSP104 są niezdolne do rozwinięcia termotolerancji, jakkolwiek nie jest to element wyłączny, gdyż o nabyciu termotolerancji decydują prawdopodobnie również inne czynniki [77].

Stosunkowo niewielka ilość danych dotyczących roślinnych wysokocząsteczkowych białek szoku termicznego związana jest z małą liczbą przeprowadzonych dotychczas pod tym kątem badań.

## RODZINA HSP70

Analiza sekwencji DNA wykazała, że w porównaniu z innymi genami dla HSP, w grupie genów HSP70 występuje najwyższy stopień zachowawczości [67]. Identyczność sekwencji całkowitych pomiędzy genami HSP70 soi i muszki owocowej wynosi 65%, podczas gdy pomiędzy odpowiednimi genami soi a kukurydzy aż 84% [75]. HSC70 obecne są w komórkach w warunkach fizjologicznych [94] jako białka cytoplazmatyczne wszystkich tkanek, natomiast HSP70 syntetyzowane są wyłącznie w czasie stresu pod wpływem wysokiej temperatury [88]. Stwierdzono większe podobieństwo pomiędzy eukariotycznymi cytoplazmatycznymi homologami HSP70 z różnych gatunków roślin niż pomiędzy homologami HSP70 w różnych przedziałach komórkowych tego samego gatunku, co sugeruje dość wczesne ewolucyjne rozdzielanie różnych form HSP70 [88].

W komórkach eukariotycznych homologi HSP70 są związane z takimi przedziałami komórkowymi, jak: cytozol i cysterny siateczki śródplazmatycznej [63, 66], chloroplasty [3, 61], matryks mitochondrium [3, 19, 45]. Obecność białek z rodziny HSP70 w tak różnych przedziałach komórkowych przypisuje się ich fundamentalnej roli w metabolizmie i funkcjonowaniu komórki.

Stwierdzono, że białka te w warunkach szoku termicznego wiążą się odwracalnie z jądrem i jąderkiem, co jest charakterystyczne dla różnych typów organizmów, w tym także roślin. Wysoka temperatura powoduje koncentrację konstytutywnych białek z rodziny HSP70 w jądrach stresowanych komórek. Co związane jest prawdopodobnie z ochroną przez nie zarówno procesu transkrypcji, jak i syntezy rybosomów [67]. Ekspresja pewnych genów dla HSP70 charakteryzuje się specyficznością tkankową w określonych fazach rozwoju roślin. I tak, za pomocą sondy cDNA dla HSC70 grochu można wykryć wysoki poziom mRNA w nie poddanych działaniu stresu organach, takich jak np. liście, korzenie i dojrzewające nasiona [21]. Inny homolog HSP70, początkowo scharakteryzowany jako białko wiążące ciężkie łańcuchy immunoglobuliny (*binding protein* – BiP) [60], zlokalizowany został w przestrzeni siateczki śródplazmatycznej u ssaków i drożdży [63, 66], a także w komórkach tkanek pomidora [88]. Okazało się ponadto, że będące również homologiem HSP70 białko, charakteryzuje się zwiększoną syntezą w warunkach głodu glukozowego (*Glucose Regulated Protein* – GRP). Istnieje hipoteza, wg której, podobnie jak HSP70, białka z grupy BiP i GRP stabilizują nowo syntetyzowane w retikulum endoplazmatycznym polipeptydy, dopóki nie przyjmą one właściwej konformacji [33, 69].

Badania nad lokalizacją wewnątrzkomórkową białek szoku termicznego przysporzyły także argumentów przemawiających za hipotezą endosymbiotycznego pochodzenia chloroplastów. I tak: w stromie chloroplastów kilku gatunków roślin [3, 61] stwierdzono obecność homologów bakteryjnego białka DnaK (należącego do rodziny HSP70) także w warunkach bezstresowych [61]. Białka te wykazywały silniejszą reakcję z przeciwciałami dla DnaK niż z przeciwciałami dla eukariotycznych HSP70. Dotychczasowe doniesienia wskazywały, że wszystkie białka szoku termicznego są kodowane przez genom jądrowy także w przypadku, gdy były one lokalizowane w chloroplastach lub mitochondriach. Niedawno jednak zlokalizowano w chloroplastach glonu *Pavlova lutherii* białko HSP70, które jest kodowane w genomie chloroplastowym i wykazuje większą homologię sekwencyjną z bakteryjnym białkiem DnaK niż z eukariotycznym HSP70 [78].

Duża ilość homologów genów dla HSP70 mocno komplikuje badania nad regulacją ich ekspresji, a dodatkowym utrudnieniem jest także znaczny poziom mRNA i białek pokrewnych



HSP (*Heat Shock Cognate Proteins* – HSC) w większości komórek nie poddanych działaniu stresu.

### RODZINA HSP60

HSP60 było pierwszym białkiem szoku termicznego, któremu nadano nazwę białka osłaniającego (*molecular chaperone*) [26], co dosłownie tłumacząc oznacza "białko towarzyszące" lub "molekularna przyzwoitka". Białka osłaniające definiuje się obecnie jako rodzinę nie związanych z sobą klas białek, które pośredniczą w nabywaniu prawidłowej konformacji przez inne białka, same jednak nie wchodzi w skład końcowej struktury białka, jak również nie przenoszą informacji niezbędnej do jego fałdowania i oligomeryzacji. Zwijanie białek odbywa się na ogół w warunkach ekstremalnie wysokiej ich koncentracji [32], a w procesie tym białka osłaniające ograniczają się raczej do asystowania i zapobiegania powstawaniu niewłaściwych oddziaływań międzybiałkowych, co mogłoby prowadzić do struktur o upośledzonej funkcji [26].

Kodowany przez genom jądrowy homolog HSP60, zwany także chloroplastową chaperoniną 60, funkcjonuje jako "białko wiążące" dużą podjednostkę RuBP-karboksylazy, co prowadzi do powstania kompleksu stabilizującego duże podjednostki oraz umożliwia ich połączenie z małymi podjednostkami i powstanie ostatecznej funkcjonalnej struktury holoenzymu [25, 26, 31].

Inne białko osłaniające HSP60 – obecne w matryks mitochondrium wspomaga proces zwijania się białek, które wnikają przez błonę mitochondrialną w formie rozwiniętej. Po przejściu przez błonę mitochondrialną importowane białko wchodzi w interakcję z kompleksem HSP60, a do jego zwinięcia i przyjęcia właściwej konformacji na powierzchni HSP60, a także uwolnienia z kompleksu wymagana jest hydroliza ATP [26, 31]. Sposób, w jaki HSP60 rozpoznaje te białka i przyłącza się do nich, pozostaje ciągle niewyjaśniony.

### NISKOCZĄSTECZKOWE BIAŁKA SZOKU TERMICZNEGO (LMW HSP)

Jest to grupa białek o masie cząsteczkowej 16–28 kDa, które są intensywnie syntetyzowane w warunkach szoku termicznego w komórkach roślinnych [22, 47, 67]. Białka te są uważane za specyficzne dla roślin z uwagi na to, że tylko nieliczne z nich zostały zidentyfikowane u innych przedstawicieli *Eukariota*, np. HSP26 u drożdży [70], HSP24 w fibroblastach zarodków kurzych [16], HSP22,23,26,27 u muszki owocowej [4].

Większość roślinnych niskocząsteczkowych HSP syntetyzowana jest w czasie szoku termicznego, a tylko niektóre można wykryć na bardzo niskim poziomie w tkankach nie poddanych działaniu wysokiej temperatury [59]. Białka tej klasy odznaczają się dużą trwałością i można je wykryć jeszcze długo po ustąpieniu stresu, a czas ich połowicznego rozpadu dochodzi do 52 godzin [12]. Tak znaczna stabilność tych białek pozwala na ich akumulację i wykrycie w żelu, mimo że poziom ekspresji ich genów oraz syntezy jest bardzo niski [59]. Niskocząsteczkowe HSP związane są głównie z cytoplazmą podstawową [87] i chloroplastami u różnych, często odległych od siebie gatunków [12].

Sugeruje się, że agregacja niskocząsteczkowych HSP z błoną tylakoidową ma związek z ochroną i naprawą fotosystemu II w warunkach stresowych [34, 48, 81], jakkolwiek taką interakcję obserwowano jedynie w temperaturze powyżej 38°C i to przy bardzo intensywnym oświetleniu [34].

Niskocząsteczkowe HSP zostały także zlokalizowane w znacznej ilości w komórkach korzeni, co wskazuje, że mogą one funkcjonować we wszystkich typach plastydów, nie tylko w organellach fotosyntetycznych [12].

Niektórzy autorzy sądzą, że niskocząsteczkowe HSP, jak np. HSP21 u *Arabidopsis* mogą funkcjonować jako białka osłaniające, co do tej pory uważane było za cechę specyficzną dla innych białek szoku termicznego (HSP90, HSP70, HSP60) [13].

W badaniach z użyciem mikroskopu elektronowego stwierdzono, że niektóre niskocząsteczkowe HSP tworzą elektronowo gęste, cytoplazmatyczne kompleksy o strukturze ziarnistej (*Heat Shock Granules* – HSG) [67]. Istnienie tych struktur zostało po raz pierwszy wykazane w wierzchołkowych merystemach korzeni zbóż [29] i cebuli [73] oraz w komórkach różnych organów pomidora [67]. Skupiska ziarnistości cytoplazmatycznych (HSG) są łatwo wykrywalne z powodu ich gęstości i wielkości i np. u pomidora mają one średnicę ponad 1  $\mu\text{m}$  przy wielkości poszczególnych cząstek wynoszącej od 40 do 80 nm [67]. W skład ziarnistości cytoplazmatycznych wchodzi głównie niskocząsteczkowe HSP (50–80%), a także HSP70 (5–10%) [65]. Wykazano również, że ziarnistości te zawierają RNA, którego synteza miała miejsce w okresie poprzedzającym szok termiczny [67], w związku z czym przypuszcza się, że mogą one uczestniczyć w ochronie i przechowywaniu normalnego, komórkowego mRNA w czasie stresu termicznego [67].

#### HSP 8.5 (UBIKWITYNA)

W warunkach szoku termicznego, podobnie jak przy działaniu innych czynników stresowych, powstaje duża liczba białek o niewłaściwej konformacji, które ulegają szybkiej degradacji poprzez system ubikwityny [28, 71]. Jest to wysoce konserwatywne, 76-aminokwasowe białko (8,5 kDa), które łączy się kowalencyjnie z innymi białkami, znacząc je w ten sposób dla degradacji proteolitycznej [88]. Jednakże nie jest do końca wyjaśnione, w jaki sposób uszkodzone przez stres białka są rozpoznawane i wybierane przez ubikwitynę do degradacji. Ostatnie doniesienia wskazują na niezależną regulację różnych genów z rodziny ubikwityny w odpowiedzi na działanie takich czynników stresowych, jak wysoka temperatura, zranienie czy traktowanie etylenem [30].

### REGULACJA SYNTEZY HSP

Regulacja syntezy białek szoku termicznego może zachodzić na kilku poziomach, z których najważniejszymi są poziomy transkrypcji i translacji.

Ekspresja genów dla białek szoku termicznego następuje szybko, bowiem już po 7,5 min. W hypokotylach soi w temp. 40°C wykrywalny jest metodą hybrydyzacji HS mRNA, aby po 2 godzinach dojść do 20 000 kopii na komórkę [79].

Chociaż mechanizm percepcji bodźca termicznego nadal pozostaje nieznanym, to jednak wiadomo już, że inicjacja ekspresji genów białek szoku termicznego zachodzi poprzez przyłączenie się zaktywowanego białkowego czynnika transkrypcyjnego (*Heat Shock Factor* – HSF) do ok. 10-nukleotydowej sekwencji regulatorowej (*Heat Shock Element* – HSE) obecnej w wielu kopiach w regionie promotorowym HS genów [64]. Okazało się, że ta wysoce konserwatywna sekwencja obecna jest w promotorach HS genów odległych od siebie organi-



zmów, w tym również roślin, i odgrywa kluczową rolę w indukcji transkrypcji w warunkach stresu termicznego, jakkolwiek nie wyklucza się udziału w tym procesie innych sekwencji regulatorowych [64]. W związku z tym, że w indukcji ekspresji genów HS decydującą rolę odgrywa białkowy czynnik transkrypcyjny (HSF), stał się on przedmiotem intensywnych badań zmierzających do poznania jego właściwości, warunków aktywacji oraz kodujących go genów [64, 67].

Warunki, w jakich następuje aktywacja transkrypcji, są dość zróżnicowane i obejmują m.in. zmiany w środowisku oksydo-redukcyjnym i poziomie jonów w komórce. Szok termiczny powoduje przesunięcie równowagi oksydo-redukcyjnej w kierunku procesów utlenienia, a tym samym aktywację czynnika transkrypcji szoku termicznego, który łączy się z promotorem dla białek szoku termicznego. W korzeniach kukurydzy w czasie szoku termicznego obserwowano wzrost stężenia glutationu, co może być związane z przywróceniem komórce stanu mniej utlenionego [10].

Burke i Orzech (1988) wysunęli hipotezę, że wzrost poziomu glutationu (którego liniowe polimery – fitochelatyny wychwytyują jony metali) jest związany z mechanizmem usuwania nadmiaru jonów, wnikających do cytoplazmy na skutek zaburzeń wywołanych przez wysoką temperaturę [11]. Do czynników, które mogą aktywować geny HSP, należą jony metali ciężkich, np. kadmu [93]. W genie dla HSP 17,5 kDa u soi znaleziono sekwencje podobne do MRE (*Metal Regulatory Element*) [20].

Błony komórkowe są najbardziej wrażliwe na zmiany temperatury [85], a zakłócenia w ich funkcjonowaniu są jednymi z pierwszych efektów szoku termicznego [10]. Na przykład w korzeniach kukurydzy 5 minut po zadziałaniu szoku termicznego następują zmiany w przepływie jonów  $K^+$  i  $H^+$  poprzez błony, co powoduje zachwianie równowagi jonowej w komórce, a to z kolei aktywuje czynnik transkrypcyjny (HSF) (prawdopodobnie poprzez jony  $Ca^{+2}$  i aktywowane kalmoduliną kinazy) [10].

W warunkach stresowych w komórkach pojawia się duża ilość zdenaturowanych białek, których poziom wg Munro i Pelhama (1985) jest odpowiedzialny za percepcję bodźca termicznego [62]. Badania Ananthan i wsp. (1986) zdają się potwierdzać przypuszczenie, że białka o niewłaściwej konformacji mogą być sygnałem aktywującym transkrypcję genów dla HSP u organizmów eukariotycznych [2].

Synteza wielu HSP ma miejsce w czasie normalnego przebiegu ontogenezy przy braku bodźca termicznego, np. podczas sporulacji u drożdży czy oogenezy u *Drosophila* [10]. U roślin transkrypcja genów HSP i synteza białek szoku termicznego zachodzi we wszystkich wegetatywnych tkankach [6, 17] oraz w rozwijających się i kiełkujących nasionach [1, 38]. Stadia rozwojowe, w których nie stwierdzono pełnej odpowiedzi na szok termiczny, ograniczają się do wczesnego stadium zarodka (pre-torpeda) u marchwi [96] i kiełkujących ziaren pyłku [39, 40, 95]. Sugeruje się, że synteza niskocząsteczkowych HSP w dojrzewających nasionach związana jest raczej z zabezpieczeniem rośliny przed działaniem czynnika stresowego niż pełnieniem przez nie jakichś funkcji w embriogenezie [88].

Większość genów dla HSP nie ma intronów, ale istnieją wyjątki, w tym także u roślin, np. w genach kodujących HSP70 kukurydzy [76], HSP70 petunii [92] czy HSC80 pomidora [50]. Przypuszcza się, że przyczyną, dla której większość genów dla HSP pozbawiona jest intronów, może być konieczność ich szybkiej ekspresji w postaci dojrziałych, funkcjonalnych transkryptów [56].

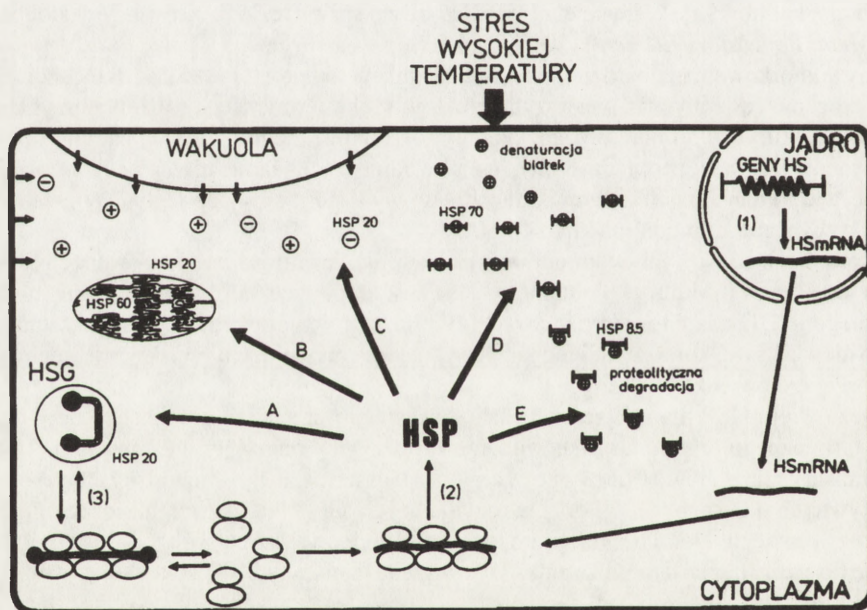
W warunkach stresu wysokiej temperatury zmniejsza się intensywność syntezy większości białek komórkowych z wyjątkiem białek szoku termicznego (HSP), których synteza ulega

znaczному zwiększeniu, do tego stopnia, że w ekstremalnych dla danego gatunku temperaturach (45–52°C) białka szoku termicznego są jedynymi, jakie są wytwarzane w komórce. Ta duża wybiórczość syntezy białek szoku termicznego związana jest ze zmianami w procesie translacji, polegającymi na znacznej dyskryminacji normalnego, komórkowego mRNA, podczas gdy HS mRNA odznacza się większą stabilnością i jest preferencyjnie tłumaczony [10, 46].

Wyniki dotychczasowych badań [67] pozwalają na wyróżnienie czterech klas mRNA występujących w warunkach szoku temperaturowego:

1) matrycowe RNA kodujące białka szoku termicznego, szybko syntetyzowane w trakcie stresu, które tworzą polisomy syntetyzujące białka szoku; w większości komórek HS mRNA jest stosunkowo stabilny w okresie stresu, jednakże po przeniesieniu siewek soi do temperatury 28°C jego okres półtrwania jest mniejszy niż 3 godziny [47];

2) normalne mRNA, syntetyzowane w materiale nie poddanym działaniu stresu, które kodują białka strukturalne i metaboliczne komórki, nie ulegają translacji, a chronione są przed degradacją w ziarnistościach cytoplazmatycznych, reaktywowane po ustaniu stresu [67];



RYSUNEK. Model biosyntezy i funkcji białek szoku termicznego w komórce: (1) transkrypcja genów dla białek szoku termicznego; (2) translacja HS mRNA prowadząca do syntezy białek pełniących w komórce następujące funkcje: A – ochrona normalnego, komórkowego mRNA w czasie trwania szoku termicznego; B – wspomaganie łączenia dużych podjednostek RuBP-karboksylazy z małymi; ochrona fotosystemu II przez HSP20 agregujące z błoną tylakoidową; C – chelatowanie jonów metali napływających do cytoplazmy z wakuoli i otoczenia komórki w wyniku uszkodzenia termicznego błon; D – łączenie się z częściowo zdenaturowanymi białkami, co zapobiega tworzeniu się agregatów; E – znaczenie przez ubikwitynę zdenaturowanych białek, które ulegają następnie proteolitycznej degradacji; (3) tworzenie z udziałem HSP20 ziarnistości cytoplazmatycznych (HSG), w których przechowywany jest komórkowy mRNA



3) pewna pula normalnych mRNA, które z nieznanymi przyczynami podlegają jednak translacji w warunkach szoku termicznego, np. te, które kodują białka rybosomalne i zapasowe soi [1];

4) niektóre mRNA ulegające degradacji, kodujące wysoce wyspecjalizowane białka, np.  $\alpha$ -amylazę [7].

Ciekawym przykładem zróżnicowanej stabilności matrycowych RNA w warunkach szoku termicznego mogą być mRNA dla RuBP-karboksylazy, kiedy to mRNA dla małej podjednostki enzymu ulega degradacji w temperaturze 38–49°C, natomiast mRNA dla dużej podjednostki kodowanej w chloroplastach pozostaje w tych warunkach stabilny [87].

Na podstawie dostępnych danych doświadczalnych zaproponowano hipotetyczną sekwencję zdarzeń zachodzących w komórce poddanej działaniu wysokiej temperatury [64, 67].

W pierwszym etapie szoku termicznego następuje zniszczenie polirybosomów uczestniczących w biosyntezie normalnych białek komórkowych; ten proces obejmuje degradację kodującego je normalnego mRNA, zahamowanie inicjacji translacji oraz destrukcję cytoszkieletu (0–5 min). W następnej kolejności zachodzi formowanie się polirybosomów zdolnych do syntezy białek szoku termicznego, w który to proces włączone są nowo syntetyzowane HS mRNA oraz zmienione czynniki inicjacji i ufosforylowane rybosomy (10–30 min). Nie podlegające translacji normalne mRNA związane z cytoszkieletem są chronione przed degradacją przez zwiększony poziom HSP, a po 15 min szoku termicznego rozpoczyna się tworzenie ziarnistości cytoplazmatycznych (HSG), z których po powrocie do normalnych warunków temperaturowych aktywowany jest mRNA. Gromadzone w poddanej stresowi komórce białka szoku termicznego podlegają selektywnej wewnątrzkomórkowej lokalizacji, która jest procesem odwracalnym po ustąpieniu szoku. Przedłużone działanie temperatury stresowej powoduje stopniowe obniżenie syntezy HSP i przywrócenie syntezy normalnych białek komórkowych [17, 64].

## ROLA BIAŁEK SZOKU TERMICZNEGO

Dotychczasowe wyniki badań oraz wciąż pojawiające się nowe dane zdają się wskazywać, że rola białek szoku termicznego związana jest z przeżyciem przez organizm warunków stresowych i przywróceniem normalnego funkcjonowania komórek po ustąpieniu stresu.

W następstwie szoku termicznego obserwuje się głębokie zmiany w ultrastrukturze komórek [23]. Polegają one m.in. na zaniku polirybosomów oraz siateczki śródplazmatycznej szorstkiej, co dotyczy głównie struktur zaangażowanych w syntezę roślinnych białek sekretorycznych, takich jak  $\alpha$ -amylaza [7], ekstensyna lub witelogenina w hepatocytach *Xenopus laevis* [10].

Trzeba jednak podkreślić, że szok termiczny nie uszkadza błon siateczki śródplazmatycznej szorstkiej, uczestniczących w syntezie lektyn lub białek zapasowych [10]. Dezintegracja błon siateczki śródplazmatycznej szorstkiej pociągała za sobą nie tylko upośledzenie syntezy odpowiednich białek, ale wiązała się również z żywotnością komórek, gdyż jak w przypadku spęczniałych ziaren pyłku tytoniu nie kiełkowały te, które po ustaniu stresu nie były zdolne do odtworzenia struktur ER [15]. Rozmiar uszkodzeń struktur komórkowych jest uzależniony od natężenia stresu, na ogół w temperaturze 38°C były one mniejsze niż w 45°C, która dla wielu komórek była temperaturą letalną [15].

Stwierdzono, że białka z rodziny HSP70 odgrywają bardzo ważną rolę w przywróceniu stanu wyjściowego cytoszkieletu w komórkach zwierzęcych [67], jednakże brak dotychczas danych dotyczących reorganizacji układu cytoszkieletowego w czasie HS i po ustąpieniu stresu u roślin.

Rola białek szoku termicznego związana jest ściśle z ich komórkową lokalizacją określaną najczęściej za pomocą metody różnicowego wirowania, sprzężonej z zastosowaniem specyficznych poli- i monoklonalnych przeciwciał [5, 42, 72, 91]. Metodą tą we frakcji jądrowej zlokalizowano HSP68, HSP70, a także HSP22–28 [10]; białka te odznaczają się wysoką odpornością na ekstrakcję solami i traktowanie nukleazami. Sugeruje to, że mogą one odgrywać pewną rolę jako białka strukturalne w jądrze lub poza nim jako jądrowe elementy cytoszkieletu [10]. Obecność HSP70 i niskocząsteczkowych HSP stwierdzono także w jądrach komórek soi [55] i kukurydzy [18].

Badania immunofluorescencyjne z zastosowaniem monoklonalnych przeciwciał wykazały, że u muszki owocowej HSP70 po ustąpieniu szoku ulega przemieszczeniu z jądra do cytoplazmy, a powtórne zadziałanie wysokiej temperatury powoduje ponowną, gwałtowną relokalizację HSP70 do jądra [86]. Na tej podstawie sądzi się, że HSP70 stabilizuje chromatynę w czasie HS, a jego translokacja po ustąpieniu szoku do cytoplazmy związana jest z reaktywacją normalnego mRNA i przywróceniem biosyntezy białek po szoku termicznym [86].

Z frakcją chloroplastową związane są głównie białka z rodziny HSP20 [12, 34, 48]. Postuluje się, że funkcja niskocząsteczkowych chloroplastowych HSP polega na ochronie aparatu fotosyntetycznego przed uszkodzeniem [81]. Z kolei chloroplastowe białko z rodziny HSP60 (zaliczane do białek osłaniających) wspomaga przyjęcie właściwej struktury przez enzym RuBP-karboksylazę.

Jednakże dokładna rola chloroplastowych HSP jest ciągle jeszcze niejasna i może być związana zarówno z aktywacją genów, fotosyntezą, jak i innymi procesami zachodzącymi w obrębie chloroplastów [88].

Wysoko- i niskocząsteczkowe białka szoku termicznego zostały zlokalizowane w mitochondriach, w tym także pochodzenia roślinnego, np. z siewek soi poddanych działaniu wysokiej temperatury [14, 55]. Najlepiej dotychczas udokumentowana została rola HSP60 jako "białka towarzyszącego", wspomagającego tworzenie właściwej struktury innych białek, które są transportowane w stanie rozwiniętym do mitochondriów [26, 41]. Również białka z rodziny HSP70 mogą funkcjonować w procesie przemieszczania innych białek w ich potranslacyjnym ATP-zależnym transporcie do mitochondriów i wnętrza retikulum endoplazmatycznego [58].

Według hipotezy Pelhama (1986) ulegające częściowej denaturacji w czasie szoku termicznego białka odśaniają swoje regiony hydrofobowe, które oddziałując ze sobą prowadzą do powstania nierozpuszczalnych białkowych agregatów. HSP70 wiążąc się z regionami hydrofobowymi białek komórkowych ograniczają te niekorzystne interakcje i sprzyjają częściowemu rozpuszczeniu tych agregatów [68]. Ostatnio stwierdzono jednak, że nie jest to jedyny mechanizm rozpoznawania nienatycznych białek w komórce [43].

Rolę białek szoku termicznego w warunkach stresowych można tłumaczyć tym, że uczestniczą one w procesach naprawczych i osłaniających inne białka i są do tej funkcji dobrze przystosowane, ponieważ same są w większości odporne na wysokie temperatury i nie ulegają denaturacji w temperaturze 100°C. Na przykład białka szoku termicznego w korzeniach łubinu odznaczają się tą właściwością i można je przez to zaliczyć do grupy tzw. *heat-stable proteins* [44] (Porankiewicz, Gwóźdź, dane nie publikowane).



### HSPs A TERMOTOLERANCJA

Termotolerancja oznacza zdolność organizmu do tolerowania normalnie letalnych, wysokich temperatur po początkowej preinkubacji w podwyższonej, ale nie letalnej temperaturze, w której następuje synteza HSP [88]. Przykładowo, u soi proces ten obejmuje 2-godzinna preinkubację siewek w temp. 40°C [55]. Zjawisko to określa się mianem nabytej termotolerancji, z którą od dawna wiązano obecność białek szoku termicznego [67].

Zjawisko nabytej termotolerancji oraz rola HSPs w tym procesie wiąże się nie tylko ze zwiększoną odpornością na wysoką, normalnie letalną temperaturę. Okazało się, że preinkubacja w podwyższonej temperaturze znacznie zmniejsza szkodliwe skutki niskiej temperatury w liścieniach ogórka, poprzez zmniejszenie wycieku jonów z komórek (stabilizację błon) [54] oraz zwiększa przeżywalność komórek drożdży poddanych zamrożeniu w ciekłym azocie [49]. W obu przypadkach tolerancja na stres powodowany niską temperaturą i zamrożeniem była związana, a nawet zależna, od syntezy białek szoku termicznego.

Niestety, wiedza na temat molekularnych aspektów termotolerancji i wrażliwości komórek na wysoką temperaturę jest ciągle jeszcze fragmentaryczna, istnieje jednak wiele przykładów wskazujących na pozytywną korelację pomiędzy syntezą niskocząsteczkowych HSP, a także HSP70, a nabywaniem termotolerancji przez komórki roślinne [53, 60, 88].

Okazało się, że w etiolowych siewkach soi z rozwojem termotolerancji jest związany nie tylko poziom syntezy niskocząsteczkowych HSP, ale także ich akumulacja [55, 88]. Na tym samym materiale stwierdzono, że wraz ze wzrostem temperatury z 35°C do 40°C wzrasta zawartość niskocząsteczkowych HSP (15–18 kDa) w stosunku do białek całkowitych z 0,76% do 0,98%, co może być skorelowane z nabyciem przez tkankę termotolerancji [42]. Jednakże z drugiej strony są też przykłady rozwoju termotolerancji, mimo braku syntezy HSP, np. w kiełkujących ziarnach pyłku u *Tradescantia*, czy w komórkach drożdży potraktowanych cykloheksimidem [10]. Również analizy na poziomie genetycznym nie wykazały tak ścisłej korelacji. Na przykład po skrzyżowaniu wstecznym wrażliwej na wysoką temperaturę linii bawełny geny dla unikalnych HSP nie segregowały z fenotypem wykazującym termotolerancję [27]. Wskazuje to na konieczność weryfikacji obserwacji na poziomie fizjologicznym i biochemicznym poprzez przeprowadzenie badań genetycznych. Wydaje się, że mechanizmy związane z rozwijaniem termotolerancji nie sprowadzają się tylko do zwiększonej akumulacji niskocząsteczkowych HSP i pełnieniu przez nie funkcji ochronnych. Zwiększona odporność na niekorzystne warunki może się także wiązać z oddziaływaniem i współdziałaniem innych czynników. Na przykład wiadomo, że niektóre niebiałkowe metabolity, takie jak: prolina, poliole i fitohormony (np. kwas abscysynowy), mogą w sposób bezpośredni lub pośredni wpływać na funkcjonowanie komórek w warunkach stresowych osłaniająco lub jako modulatory odpowiedzi na stres [8, 67].

### SZOK TERMICZNY A INNE CZYNNIKI STRESOWE

Ogólnie wiadomo, że nie tylko wysoka temperatura indukuje syntezę specyficznych białek szoku termicznego. Za pomocą sondy cDNA dla HSP70 muszki owocowej wykazano akumulację HSP70 mRNA w mezokotyłach kukurydzy pod wpływem tak różnych czynników stresowych, jak: wysoka temperatura, kwas abscysynowy, stres wodny, zranienie [37].

Również w siewkach soi traktowanych arsenem i kadmem stwierdzono akumulację specyficznych dla szoku termicznego mRNA i białek [24]. W badaniach nad składem polipeptydowym białek w korzeniach łubinu w odpowiedzi na różne czynniki stresowe, takie jak np. wysoka i niska temperatura, jony  $Pb^{+2}$ , NaCl obserwowano stymulację syntezy tych samych polipeptydów (Porankiewicz, Gwóźdź dane nie publikowane).

Ostatnio wykazano, że stres wodny podwyższa odporność fotosystemu II na działanie innych czynników stresowych, takich jak wysoka temperatura czy silne światło. Liście poddane stresowi wodnemu, a następnie działaniu temp. 42°C (w ciemności) charakteryzowały się większą stabilnością fotosystemu II przejawiającą się małą i całkowicie odwracalną redukcją wydajności procesu fotosyntezy [35].

Nasuwa się więc przypuszczenie, że mechanizmy obronne u organizmów żywych są silnie ze sobą powiązane, co jest prawdopodobnie wynikiem kompleksowego działania czynników stresowych w warunkach naturalnych. Jednakże z drugiej strony cechą odróżniającą rośliny od innych organizmów jest to, że na ogół nie syntetyzują one białek szoku termicznego pod wpływem działania różnych czynników stresowych. Jedynie w wyniku działania arsenu i w mniejszym stopniu kadmu w warunkach fizjologicznych rośliny reagują podobnie jak w odpowiedzi na szok termiczny [24]. U roślin pojawiają się raczej klasy pewnych białek charakterystycznych dla działania określonego czynnika stresowego, np. pod wpływem niskiej temperatury, zranienia czy stresu wodnego [9, 67].

## UWAGI KOŃCOWE

Ewolucyjnie wykształcona, uniwersalna dla wszystkich organizmów żywych odpowiedź komórek na szok termiczny w znacznym stopniu przyczyniła się do lepszego poznania i zrozumienia mechanizmów kontroli zależnej od stresu ekspresji genów.

Łatwość, z jaką można indukować ekspresję genów szoku termicznego, przy jednoczesnej represji innych genów, specyficzność czynnika indukującego, duży stopień homologii HS genów u odległych ewolucyjnie organizmów sprawiają, że badania nad tym zagadnieniem znajdują się w centrum zainteresowania współczesnej fizjologii i biologii molekularnej.

Wprawdzie dużo już wiadomo na temat molekularnych mechanizmów ekspresji genów HS, to jednak wiele zagadnień pozostaje niewyjaśnionych. Do nich należy ustalenie dodatkowych sekwencji promotorowych genów HS odpowiedzialnych za poziom ekspresji oraz tych sekwencji, które decydują o rozwojowej i tkankowej specyficzności ich ekspresji. Wyjaśnienia wymaga także sprawa indukcyjności genów HS przez inne czynniki stresowe w warunkach fizjologicznych. Stosunkowo słabo poznany jest także podstawowy mechanizm przekazywania sygnału termicznego i aktywacji białkowego czynnika transkrypcyjnego.

Obok walorów poznawczych badań nad regulacją ekspresji genów stresu termicznego, szczególnie ważne wydaje się zagadnienie przejściowego nabycia termotolerancji przez organizm w następstwie subletalnego szoku temperaturowego. Ma to szczególnie istotne znaczenie dla roślin, które w przeciwnieństwie do zwierząt nie mają zdolności szybkiej zmiany niekorzystnych warunków środowiska.

Praktyczne zastosowanie wyników badań nad regulacją ekspresji genów przez wysoką temperaturę jest jeszcze niewielkie, tym niemniej pojawiły się już pewne koncepcje aplikacyjne, a uzyskane wyniki są obiecujące. Rośliny uprawne w ciągu dnia narażone są wielokrot-



nie na działanie stresu termicznego, w wyniku czego następuje całkowite zablokowanie ekspresji wszystkich genów poza genami HS. Dla roślin oznacza to, że przez długi nieraz czas są one bezbronne wobec innych czynników stresowych, takich jak: anoksja, desykcja czy patogeny. Rozważana jest strategia eksperymentalna polegająca na wprowadzeniu do roślin metodami inżynierii genetycznej dodatkowych kopii genów kierujących odpornością na patogeny lub suszę, które byłyby pod kontrolą promotora HS [89]. Okazało się możliwe wykorzystanie promotora dla genów HS do badania aktywności wprowadzonych do roślin genów [80] oraz do indukowania wysoką temperaturą ekspresji dowolnej sekwencji kodującej w roślinach transgenicznym [80].

W tym zakresie interesująca wydaje się możliwość wykorzystania promotorów genów HS do indukowania w roślinach syntezy określonych fitohormonów i w ten sposób pośrednio kierowanie procesami wzrostowymi i rozwojowymi. Na przykład udało się już uzyskać indukowane wysoką temperaturą różnicowanie pędów w transgenicznym tytoniu w wyniku wklonowania genu biosyntezy cytokininy do kasety promotorowej HS [64].

Ciągły postęp w rozwoju technologii badawczej biologii molekularnej stworzy zapewne nowe możliwości zastosowania termoindukcji genów HS w uprawie roślin i nieodległy wydaje się czas, gdy w warunkach kontrolowanych, np. w szklarniach, możliwe będzie za pomocą podwyższonej temperatury kierowanie niektórymi procesami rozwojowymi i metabolicznymi roślin.

## LITERATURA

- [1] ALTSCHULER M, MASCARENHAS JP. Transcription and translation of heat shock and normal proteins in seedlings and developing seeds of soybean exposed to gradual temperature increase. *Plant Molec Biol* 1985; **5**: 291–297.
- [2] ANANTHAN J, GOLDBERG AL, VOLLEMY R. Abnormal proteins serve as eucaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 1986; **232**: 522–524.
- [3] AMIR-SHAPIRA D, LEUSTEK T, DALIE B, WEISSBACH H, BROTH N. HSP70 proteins, similar to *Escherichia coli* DnaK, in chloroplasts and mitochondria of *Euglena gracilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1749–1752.
- [4] ARRIGO AP, FAKAN S, TISSERES A. Localization of the heat shock-induced proteins in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells. *Dev Biol* 1980; **78**: 86–103.
- [5] BASZCZYNSKI CHL. Immunochemical analysis of heat shock protein synthesis in maize (*Zea mays* L.). *Can J Genet Cytol* 1986; **28**: 1076–1087.
- [6] BASZCZYNSKI CHL. Gene expression in *Brassica* tissues and species following heat shock. *Bioch Cell Biol* 1988; **66**: 1303–1311.
- [7] BELANGER FC, BRODL MR, HO THD. Heat shock cause destabilization of specific mRNA and destruction of endoplasmic reticulum in barley aleurone cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 1354–1358.
- [8] BONHAM-SMITH PC, KAPOOR M, BEWLEY JD. Exogenous application of abscisic acid or triadimefon affects the recovery of *Zea mays* seedlings from heat shock. *Physiol Plant* 1988; **73**: 27–30.
- [9] BONHAM-SMITH PC, KAPOOR MA. Comparison of the stress responses of *Zea mays* seedlings as shown by qualitative changes in protein synthesis. *Can J Bot* 1988; **66**: 1883–1890.
- [10] BRODL MR. Biochemistry of heat shock responses in plants. [w:] Katterman F. Environmental injury to plants. Academic Press 1991; 113–135.
- [11] BURKE JJ, ORZECZ KA. The heat shock response in higher plants: a biochemical model. *Plant Cell Environ* 1988; **11**: 441–444.
- [12] CHEN Q, LAUZON LM, DEROCHER AE, VIERLING E. Accumulation, stability, and localization of a major chloroplast heat-shock protein. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1873–1883.

- [13] CHEN Q, OSTERYOUNG K, VIERLING E. Molecular and functional analysis of a chloroplast-localized heat shock protein. *Photosynth Res* 1992; **34**: 1.
- [14] CHOU M, CHEN YM, LIN Ch-Y. Thermotolerance of isolated mitochondria associated with heat shock proteins. *Plant Physiol* 1989; **89**: 617–621.
- [15] CIAMPOLINI F, SHIVANNA KR, CRESTI M. High humidity and heat stress causes dissociation of endoplasmic reticulum in Tobacco pollen. *Bot. Acta* 1991; **104**: 110–116.
- [16] COLLIER NC, SCHLESINGER MJ. The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts. *J Cell Biol* 1986; **103**: 1495–1507.
- [17] COOPER P, HO T-HD, HAUPTMANN RM. Tissue specificity of heat shock response in maize. *Plant Physiol* 1984; **75**: 431–441.
- [18] COOPER P, HO TH. Intracellular localization of heat shock proteins in maize. *Plant Physiol* 1987; **84**: 1197–1203.
- [19] CRAIG EA, KRAMER J, SHILLING J, WERNER-WASHBRUNE M, HOLMES S et al. SSC1 an essential member of the yeast HSP70 multigene family encodes a mitochondrial protein. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 3000–3008.
- [20] CZARNECKA E, GURLEY WB, NAGAO RT, MOSQUERA LA, KEY JL. DNA sequence and transcript mapping of soybean gene encoding a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 3726–3730.
- [21] DeROCHER A, LAUZON L, VIERLING E. HSP90 expression during seed development. *J Cell Biochem* 1990; **14E**: 298 (Abstr.).
- [22] DARWISH K, WANG L, HWANG ChH, APUYA N, ZIMMERMAN JL. Cloning and characterization of genes encoding low molecular weight heat shock proteins from carrot. *Plant Mol Biol* 1991; **16**: 729–731.
- [23] DYLEWSKI DP, SINGH NK, CHERRY JH. Effects of heat shock and thermoadaptation on the ultrastructure of cowpea (*Vigna unguiculata*) cells. *Protopl* 1991; **163**: 125–135.
- [24] EDELMAN L, CZARNECKA E, KEY JL. Induction and accumulation of heat shock-specific Poly (A<sup>+</sup>) RNAs and proteins in soybean seedlings during arsenite and cadmium treatments. *Plant Physiol* 1988; **86**: 1048–1056.
- [25] ELLIS J. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 1987; **328**: 378–379.
- [26] ELLIS RJ, VEN DER VIES SM. Molecular chaperones. *Ann Rev Biochem* 1991; **60**: 321–347.
- [27] FENDER SE, O'CONNELL MA. Heat shock protein expression in thermotolerant and thermosensitive lines of cotton. *Plant Cell Rep* 1989; **8**: 37–40.
- [28] FERGUSON DL, GUIKEMA JA, PAULSEN GM. Ubiquitin pool modulation and protein degradation in wheat roots during high temperature stress. *Plant Physiol* 1990; **92**: 740–746.
- [29] FRANSOLET S, DELTOUR R, BRONCHART R, VAN DE WALLE C. Changes in ultrastructure and transcription by elevated temperature in *Zea mays* embryonic root cells. *Planta* 1979; **146**: 7–18.
- [30] GARBARINO JE, ROCKHOLD DR, BELKNAP WR. Expression of stress-responsive ubiquitin genes in potato tubers. *Plant Mol Biol* 1992; **20**: 235–244.
- [31] GATENBY AA, VIITANEN PV, LORIMER GH. Chaperonin assisted polypeptides folding and assembly: implications for the production of functional proteins in bacteria. *Tibtech* 1990; **8**: 354–358.
- [32] GATENBY AA. Protein folding and chaperonins. *Plant Mol Biol* 1992; **1**: 677–687.
- [33] GETHING M, SAMBROOK J. Transport and assembly process in the endoplasmic reticulum. *Sem Cell Biol* 1990; **1**: 65–72.
- [34] GLACZINSKI H, KLOPPSTECH K. Temperature-dependent binding to the thylakoid membranes of nuclear-coded chloroplast heat-shock proteins. *Eur J Biochem* 1988; **173**: 579–583.
- [35] HAVAUX M. Stress tolerance of photosystem-II in vivo-antagonistic effect of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant Physiol* 1992; **100**: 424–432.
- [36] HARDESTY B, KRAMER G. The 90 000 dalton heat shock protein, a lot of smoke but no function as yet. *Biochem Cell Biol* 1989; **67**: 749–750.
- [37] HEIKKILA JJ, PAPP JET, SCHULTZ GA, BEWLEY D. Induction of heat shock protein messenger RNA in maize mesocotyls by water stress, abscisic acid and wounding. *Plant Physiol* 1984; **76**: 270–274.
- [38] HELM KW, PETERSEN NS, ABERNETHY RH. Heat shock response of germinating embryos of wheat. *Plant Physiol* 1989; **90**: 598–605.
- [39] HERPEN MMA, REIJNEN WH, SCHRAUWEN JAM, DE GROOT PFM, JAGGER JWH, WULLEMS GJ. Heat shock proteins and survival of germinating pollen of *Lilium longiflorum* and *Nicotiana tabacum*. *J Plant Physiol* 1989; **134**: 345–351.
- [40] HOPF N, PLESOFKYVIG N, BRAMBL R. The heat shock response of pollen and other tissues of maize. *Plant Mol Biol* 1992; **19**: 623–630.
- [41] HORWICH AL, NEUPERT W, HARTL F-U. Protein-catalysed protein folding. *Tibtech* 1990; **8**: 126–130.
- [42] HSIEH MH, CHEN JT, JINN TL, CHEN YM, LIN CY. A class of soybean low molecular weight heat shock proteins-immunological study and quantitation. *Plant Physiol* 1992; **99**: 1279–1284.



- [43] HUBBARD TJP, SANDER C. The role of heat-shock and chaperone proteins in protein folding: possible molecular mechanisms. *Prot Engin* 1991; **4**: 711–717.
- [44] JACOBSEN JV, SHAW DC. Heat-stable proteins and abscisic acid action in barley aleurone cells. *Plant Physiol* 1989; **91**: 1520–1526.
- [45] KANG P-J, OSTERMANN J, SHILLING J, NEUPERT W, CRAIG EA, PFANNER N. Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 1990; **348**: 137–140.
- [46] KEY JL, LIN CY, CHEN YM. Heat shock proteins of higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 3526–3530.
- [47] KIMPEL JA, NAGAO RT, GOEKJIAN V, KEY JL. Regulation of the heat shock response in soybean seedlings. *Plant Physiol* 1990; **94**: 988–995.
- [48] KLOPPSTECH K, MEYER K, SCHUSTER G, CHAD I. Synthesis, transport and localization of nuclear coded 22 kDa heat shock protein in the chloroplast membranes of peas and *Chlamydomonas reinhardi*. *EMBO J* 1985; **4**: 1902–1909.
- [49] KOMATSU Y, SUNIL CK, IWAHASHI H, OBUCHI K. Do heat shock proteins provide protection against freezing? *FEMS Microbial Lett* 1990; **72**: 159–162.
- [50] KONING AJ, ROSE R, COMAI L. Developmental expression of tomato heat-shock cognate protein-80. *Plant Physiol* 1992; **100**: 801–811.
- [51] KRAWCZYK Z. Struktura i ekspresja genów należących do rodziny genów szoku termicznego hsp 70. *Post Bioch* 1991; **37**: 62–69.
- [52] KRAWCZYK Z. Struktura, regulacja ekspresji i funkcja białek siateczki śródplazmatycznej GRP78 i GRP95. *Post Bioch* 1991; **37**: 70–75.
- [53] KRISHNAN M, NGUYEN HT, BURKE JJ. Heat shock protein synthesis and thermal tolerance in wheat. *Plant Physiol* 1989; **90**: 140–145.
- [54] LAFUENTE MT, BELVER A, GUYE MG, SALTVEIT ME, jr. Effect of temperature conditioning on chilling injury of cucumber cotyledons. *Plant Physiol* 1991; **95**: 443–449.
- [55] LIN C-Y, ROBERTS JK, KEY JL. Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings: synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. *Plant Physiol* 1984; **74**: 152–160.
- [56] LINDQUIST S. The heat-shock response. *Ann Rev Biochem* 1986; **55**: 1151–1191.
- [57] LINDQUIST S, CRAIG EA. The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; **22**: 637–677.
- [58] LIPIŃSKA B. Rola białek szoku termicznego. *Post Bioch* 1990; **1–2**: 32–42.
- [59] MANSFIELD MA, KEY JL. Synthesis of the low molecular weight heat shock proteins in plants. *Plant Physiol* 1987; **84**: 1007–1017.
- [60] MARMIROLI N, DICOLA G, KOMJANC M, TERZI V. Molecular and physiological parameters as aids in selection for temperature tolerance in barley. XII Eucarpia Congress 1989; 23–13.
- [61] MARSHALL JS, DeROCHER AE, KEEGSTRA K, VIERLING E. Identification of heat shock protein hsp70 homologues in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 374–378.
- [62] MUNRO S, PELHAM HRB. What turns on heat shock genes? *Nature* 1985; **317**: 477–478.
- [63] MUNRO S, PELHAM HRB. An HSP70-like protein in the ER: identity with the 78kd glucose regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 1986; **46**: 291–300.
- [64] NAGAO RT, KIMPEL JA, KEY JL. Molecular and cellular biology of the heat-shock response. [w] Scandalios JG, Genomic responses to environmental stress w: *Adv in Gen Academic Press* 1990; **28**: 235–274.
- [65] NEUMANN D, SCHARF K-D, NOVER L. Heat shock induced changes of plant cell ultrastructure and autoradiographic localization of heat shock proteins. *Eur J Cell Biol* 1984; **34**: 254–264.
- [66] NORMINGTON K, KOHONO K, KOZUTSUMI Y, GETHING MJ, SAMBROOK J. *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell* 1989; **57**: 1223–1236.
- [67] NOVER L, NEUMANN D, SCHARF K-D. [w]. Heat shock and other stress response systems of plants. Results and problems in cell differentiation 1989; 16.
- [68] PELHAM HRB. Speculations on the functions of major heat shock and glucose - regulated proteins. *Cell* 1986; **46**: 959–961.
- [69] PELHAM HRB. Control of protein exit from endoplasmic reticulum. *Ann Rev Cell Biol* 1989; **5**: 1–23.
- [70] PETKO L, LINDQUIST S. HSP26 is not required for growth at higher temperatures, nor for thermotolerance, spore development, or germination. *Cell* 1986; **45**: 885–894.
- [71] RABOY B, SHARON G, PARAG HA, SHOCHAT Y, KULKA RG. Effect of stress on protein degradation-role of the ubiquitin system. *Acta Biol Hung* 1991; **42**: 3–20.
- [72] RESS CAB. Identification of mRNA encoding low molecular mass heat-shock proteins in maize (*Zea mays* L.). *Can J Genet Cytol* 1986; **28**: 1106–1114.

- [73] RISUENO MC, STOCKERT JC, GIMENEZ-MARTIN B, DIEZ JL. Effect of supraoptimal temperatures on meristematic cell nuclei. *J Microscopie* 1973; **16**: 87–94.
- [74] RITOSSA F. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; **18**: 571–573.
- [75] ROBERTS JK, KEY JL. Isolation and characterization of a soybean hsp70 gene. *Plant Mol Biol* 1991; **16**: 671–683.
- [76] ROCHESTER DE, WINTER JA, SHAN DM. The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein hsp70. *EMBO J* 1986; **5**: 451–458.
- [77] SANCHEZ Y, LINDQUIST SL. HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 1990; **248**: 1112–1115.
- [78] SCARAMUZZI CD, STOKES HW, HILLER RG. Heat shock HSP70 protein is chloroplast-encoded in the chromophytic alga *Pavlova lutherii*. *Plant Mol Biol* 1992; **18**: 467–476.
- [79] SCHÖFFL F, KEY JL. An analysis of mRNAs for a group of heat shock proteins of soybean using cloned cDNAs. *J Mol Applied Genet* 1982; **1**: 301–314.
- [80] SCHÖFFL F, DEDRING V, KILEM M, RIEPING M, SCHÖDER G, SEVERIN K. The heat shock in transgenic plants: the use of chimaeric heat shock genes. [w] Wray JL. Inducible plant proteins. *Society for experimental biology seminar series* Cambridge University Press 1992; **49**: 247–266.
- [81] SCHUSTER G, EVEN D, KLOPPSTECH K, OHAD I. Evidence for protection by heat shock proteins against photoinhibition during heat-shock. *EMBO J* 1988; **7**: 1–6.
- [82] SKOWYRA D, ZYLICZ M. Białka szoku termicznego. *Post Bioch* 1987; **33**: 259–276.
- [83] TAKAHASHI T, NAITO S, KOMEDA. Isolation and analysis of 2 genes for the 81-kilodalton heat shock proteins from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 1992; **99**: 383–390.
- [84] TISSIERES A, MITCHELL HK, TRACY UM. Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 1974; **84**: 389–398.
- [85] THEBUD R, SANTARIUS KA. Effects of high-temperature stress on various biomembranes of leaf cells in situ and in vitro. *Plant Physiol* 1982; **70**: 200–205.
- [86] VELAZQUEZ JM, LINQUIST S. HSP70 Nuclear concentration during developmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell* 1984; **36**: 655–662.
- [87] VIERLING E, KEY JL. Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase synthesis during heat shock. *Plant Physiol* 1985; **78**: 155–162.
- [88] VIERLING E. The roles of heat shock proteins in plants. *Ann Rev Plant Physiology Plant Mol Biol* 1991; **42**: 579–620.
- [89] WALTER MH. The induction of phenylpropanoid biosynthetic enzymes by ultraviolet light or fungal elicitor in cultured parsley cells is overridden by a heat-shock treatment. *Planta* 1989; **177**: 1–8.
- [90] WIECH H, BUCHNER J, ZIMMERMANN R, JAKOB U. HSP90 chaperones protein folding in vitro. *Nature* 1992; **358**: 169–170.
- [91] WILKINSON MC, WHEATLEY PA, SMITH CJ, LAIDMAN DL. Higher plant heat-shock protein 70: purification and immunochemical analysis. *Phytochemistry* 1990; **29**: 3073–3080.
- [92] WINTER JA, WRIGHT R, DUCK N, GASSER C, FRALEY R, SHAH D. The inhibition of petunia hsp70 mRNA processing during CdCl stress. *Mol Gen Genet* 1988; **211**: 315–319.
- [93] WOŹNY A, STROIŃSKI A, GWÓZDŹ EA. Plant cell responses to cadmium. Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, seria biologia 1992; 44.
- [94] WU CH, CASPAR T, BROWSE J, LINDQUIST S, SOMERVILLE CH. Characterization of an hsp70 cognate gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 1988; **88**: 731–740.
- [95] XIAO C-M, MASCARENHAS JP. High temperature-induced thermotolerance in pollen tubes of *Tradescantia* and heat shock proteins. *Plant Physiol* 1985; **78**: 887–890.
- [96] ZIMMERMANN JL, APUYA N, DARWISH K, O'CARROLL C. Novel regulation of heat shock genes during carrot somatic embryo development. *Plant Cell* 1989; **1**: 1137–1146.

Otrzymano: 29.01.1993 r.

Przyjęto: 09.03.1993 r.

Adres autorów: Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań.



## STRUKTURA I FUNKCJA FIBRONEKTyny\*

### FIBRONECTIN- STRUCTURE AND FUNCTION

Barbara Iwona WÓJCICKA-BARTŁOMIEJCZYK\*, Jacek WOJCIEROWSKI \*\*

\*Klinika Ginekologii AM, \*\*Zakład Genetyki AM w Lublinie

*Streszczenie.* Fibronektyny są glikoproteidami ważnymi dla przebiegu wielu fizjologicznych i patologicznych procesów. Jest interesujące, że różne molekularne formy fibronektyn są produktami jednego czynnego genu u ludzi. W artykule omówiono fizykochemiczne własności, strukturę białka, budowę genu i mechanizmy jego regulacji, typy receptorów, specyfikę tkankową i obecność w tkankach prawidłowych i patologicznie zmienionych. Szczegółowiej przedstawiono mechanizmy prowadzące do zmian w syntezie fibronektyn obserwowanych w procesach różnicowania i onkogenezy.

*Słowa kluczowe:* fibronektyna – właściwości, gen, receptor, struktura, funkcja, nowotwory.

*Summary.* The glycoproteins termed "fibronectins" appeared to be very important for many physiological as well as pathological processes. It is interesting that different fibronectins are produced from only one functional human gene. In presented paper the physico-chemical properties of different types of fibronectins, gene structure and alternative splicing mechanism, types of fibronectin receptors are described as well as their tissue specificity and expression in physiological and pathological conditions. The mechanisms of changes of fibronectin synthesis observed in developmental and transformed cells are more detailly described.

*Key words:* fibronectin – properties, gene structure, receptor, structure, function, carcinoma.

Fibronektyny są glikoproteidami substancji międzykomórkowej i błon komórkowych oraz płynów ustrojowych. Biorą udział w takich zjawiskach fizjologicznych, jak: przyleganie komórek, migracja i organizacja cytoszkieletu, rozwój zarodkowy, hemostaza, gojenie ran i transformacja nowotworowa [4, 6, 7, 15, 25, 34, 49, 60, 62]. W ostatnich latach poznano dokładnie strukturę fibronektyny [8, 22, 36, 51, 58, 59]. Stwierdzono, że jeden gen poprzez różne mRNA stwarza możliwość powstawania różnych form fibronektyn [34].

W 1948 r. Morrison i wsp. jako pierwsi stwierdzili obecność fibronektyny w osoczu krwi. W 1957 r. Smith i wsp. opisali u pacjentów z koagulopatią i kriofibrinogenią precypitującą frakcję osocza krwi złożoną z fibrynogenu i zimnej nierozpuszczalnej globuliny (tzw. osoczo-

\*Praca realizowana w ramach PW 72/91 AM Lublin.

wej fibronektyny). Mosesson i wsp. zaobserwowali, że osocze krwi osób zarówno zdrowych, jak i chorych zawiera frakcję precypitująca z heparyną i mukopolisacharydami.

Druga grupa badań dotyczyła występowania fibronektyny i kolagenu w substancji międzykomórkowej i przylegania komórek [47]. Fibronektyna jako składnik substancji międzykomórkowej bierze udział w tworzeniu środowiska, w którym następuje różnicowanie komórek [3, 65].

Trzecia dziedzina poszukiwań to badania funkcji układu siateczkowo-śródbłonkowego [9, 27, 55, 64]. Najważniejszym impulsem do badań nad fibronektynami stało się odkrycie, że powierzchnia prawidłowej komórki traci duże białko w procesie transformacji nowotworowej (Hynes 1973) [34]. Intensywnie włóknista substancja międzykomórkowa zawierająca fibronektynę z reguły zanikała po nowotworowej transformacji komórki [46].

## WŁAŚCIWOŚCI

Fizyko-chemiczne właściwości fibronektyny określiły badania Alexandra i Mosessona. Surowicza forma fibronektyny, produkowana przez hepatocyty, składa się z dwóch podjednostek o masie ok. 450 kDa, połączonych mostkami dwusiarczkowymi i łańcuchów o masie ok. 220 kDa. Ze względu na różnice w szybkości migracji łańcuchów określono je jako alfa i beta [61]. Przypuszcza się, że cząsteczka fibronektyny surowicznej ma kształt globularny. Zaczyna ona ulegać denaturacji w temperaturze 50–56°C, a całkowita denaturacja następuje w temperaturze 70°C [8, 22, 36, 51, 58, 59].

Forma tkankowa jest nierozpuszczalnym dimerem [61]. Zbudowana jest z dwóch łańcuchów polipeptydowych o zmiennym składzie aminokwasowym obejmującym trzy regiony ED-A, ED-B i III CS [58, 61]. Forma tkankowa fibronektyny zawierająca ED1 fragment typu III może w niewielkich ilościach występować w osoczu krwi. Fibronektyna łożyskowa zbudowana jest z co najmniej 5 podjednostek, z których dwie mniejsze wykazują podobieństwo do fibronektyny osoczowej, zaś pozostałe do fibronektyny tkankowej [58, 63].

Fuecht i Chueng wykazali znaczenie podwyższonej glikozylacji fibronektyny w rozwoju zmian mikroangiopatycznych w cukrzycy. W 1990 r. Roy i wsp. [56] stwierdzili, że hiperglikemia indukuje zmiany w ekspresji genów fibronektyny i ta zmiana ma konsekwencje metaboliczne [18, 19, 40, 50]. W hodowli ludzkich komórek nabłonkowych indukowanych wysokimi poziomami glukozy stwierdzono nadmierną ekspresję fibronektyny, która utrzymywała się przez różnie długi okres po przywróceniu prawidłowego poziomu cukru.

Cukrowce stanowią ok. 5% masy cząsteczki fibronektyny. Fibronektyny z różnych płynów tkankowych różnią się stopniem glikozylacji [41, 66, 67], szczególnie fibronektyny płynu owodniowego zawierają znacząco więcej cukrowców 7–9,5% [26]. Obecność fibronektyny w płynie owodniowym stwierdził po raz pierwszy Chen w 1976 r., a następnie Ruoslahti wykazał jej podobieństwo do formy tkankowej oraz fibronektyny występującej w teratokarcinoma i uznał, że może ona spełniać funkcję markera karcinoembrionalnego.

Wielkość włókien fibronektyny w substancji pozakomórkowej zależy od obecności kwasu askorbinowego. W jego obecności tworzone są włókna o średnicy 40 nm. Lokalizują się one co 70 nm na włóknach kolagenowych. Odległość ta jest istotna dla zabezpieczenia przed działaniem kolagenaz. Włókna kolagenu i fibronektyny produkowane w obecności kwasu askorbinowego są odporne na degradację przez trypsynę i inne proteazy. In vitro obserwuje się



cienkie, nieperiodyczne włókna 6–10 nm w tkankach embrionalnych, w tkance ziarnistej i podczas migracji komórek do rany.

Wyróżnia się dwie formy fibronektyny [30, 34, 46]: surowiczą-normalną i tkankową-onkofetalną. Uzyskano przeciwciała FDC-6 reagujące pozytywnie z fibronektyną tkankową a nie reagujące z formą osoczną [45, 46].

Domena reagująca z FDC-6 znajduje się między wcześniej poznanymi domenami Hip-2 i Fib-2. Stwierdzono dwie klasy ludzkich tkankowych fibronektyn. Jedna z nich reagowała z przeciwciałami FDC-6 (podjednostki 310 i 335 kDa) i występowała w komórkach raka wątroby i innych nowotworów, tkankach płodowych, płynie owodniowym. W związku z powyższym nazwano ją "fibronektyną onkofetalną".

Druga klasa tkankowych fibronektyn charakteryzuje się mniejszą masą cząsteczkową i brakiem reakcji z monoklonalnymi przeciwciałami FDC-6. Fibronektyny te pochodzą z normalnych ludzkich tkanek i ze względu na ich podobieństwo do poznanej wcześniej osoczowej fibronektyny określono je jako "normalna tkankowa fibronektyna". Składają się one z alfa i beta podjednostek o masie cząsteczkowej 285–295 kDa.

Poznano struktury pierwszorzędowe dla fibronektyn trzech różnych gatunków: człowieka, szczura i krowy. Dwie pierwsze poznano na poziomie DNA [57], podczas gdy bydłącą poznano na poziomie białka. Wiele zaskakujących rezultatów uzyskano w tych badaniach:

1) Istnieje bardzo duże podobieństwo wśród gatunków ssaków obejmujące ponad 90% cząsteczki.

2) Sekwencja składa się z powtarzających się domen (typ I–III), dwie z nich, połączone mostkami dwusiarczkowymi mają długość ok. 55 aminokwasów, podczas gdy typ III ma długość 90–95 aminokwasów i nie ma cysteiny. W każdej domenie fibronektyny jest 12 powtórzeń typu I, 2 typu II i 15–17 typu III, stanowi to 20–60% sekwencji. Obecna struktura fibronektyny powstała poprzez endoduplikację i mutacje punktowe genu w toku różnicowania gatunków.

Wcześniej stwierdzono występowanie dwóch lub trzech typów mRNA fibronektyny istniejących w ludzkich komórkach Hs 578 T lub w prawidłowych komórkach szczurzej wątroby. Zmienność poprzez alternatywne wycinanie intronu daje różnorodność form fibronektyny kodowanych jednym tylko genem [46]. Określenie funkcji domeny onkofetalnej dla normalnych komórek byłoby bardzo interesujące i wymaga dalszych badań [46].

## STRUKTURA GENU

W chromosomie 11 zlokalizowano gen strukturalny dla fibronektyny, a geny regulujące jego ekspresję w chromosomie 3. Gen jest duży i składa się z ok. 50 eksonów [33]. Organizacja genu jest bardzo interesująca [57]. Transkrypcja pojedynczego dużego genu i kompleksu genów fibronektyny poprzez alternatywne wycinanie intronów prowadzi do różnych mRNA, które kodują różnorodne podjednostki fibronektyn [11, 12, 24].

Jeśli z jednego genu może powstać wiele różnych mRNA poprzez alternatywne wycinanie intronu, staje się to inspiracją do badań nad strukturą genu. Gen jest duży (50 000 zasad u kury, 70 000 zasad u szczura) i składa się z ok. 50 eksonów [33].

Struktura cząsteczki fibronektyny rodzi pytanie, czy struktura białka odzwierciedla organizację jego genu. Analiza sekwencji genu fibronektyny szczura potwierdza to przypuszcze-

nie. Domeny typu I i II są kodowane przez pojedyncze eksony. Jest to interesujące, ponieważ takie powtórzenia występują w kilku innych białkach. Pojedyncze domeny typu I występują na przykład w tkankowym aktywatorze plazminogenu i w czynniku XIII a.

Domeny typu II stwierdzono w czynniku XII a i także w głównym białku bydlęcego płynu nasiennego [34]. Białka te nie wykazują innych podobieństw do fibronektyny, sugerując jedynie związki ewolucyjne.

Gilbert [34] sugerował, że w toku ewolucji eksony kodujące sekwencje strukturalne i funkcjonalne mogą ulegać mieszanii. Dokładne poznanie genu fibronektyny wydaje się potwierdzać tę hipotezę. Bardzo interesująca jest organizacja domen typu III genu fibronektyny. Każda taka domena jest oddzielona intronem. Większość jest kodowana przez pary eksonów. Wyjątek stanowią trzy domeny typu III (ED-A, ED-B, III CS). W niektórych przypadkach eksony kodujące sekwencje ED-A, ED-B i III CS mogą być wycięte [11, 12]. Sekwencja ED-B występuje tylko w niektórych prawidłowych tkankach osobników dorosłych (zrąb jajnika, myometrium, tkanka chrzęstna). Stwierdzono znacznie silniejszą jej ekspresję w tkankach płodowych i nowotworowych [12, 20]. Sekwencja ta może nadawać cząsteczce fibronektyny specyficzne właściwości niezbędne w procesie organogenezy i transformacji nowotworowej. Stwierdzono silniejszą ekspresję domeny III CS w tkankach nowotworowych niż prawidłowych [32].

Dwa różne sposoby alternatywnego wycinania intronu, *exon skipping* i *exon subdivision*, odpowiadają za powstanie różnorodnych mRNA w trakcie transkrypcji genu fibronektyny [11, 12].

Podsumowując, transkrypcja pojedynczego dużego genu fibronektyn poprzez alternatywne wycinanie intronów prowadzi do powstania różnych mRNA, które kodują różnorodne formy fibronektyn. Występuje to w różnych typach komórek, tak więc różne komórki produkują różne populacje podjednostek fibronektyny [5, 17, 43, 53]. Jakkolwiek analiza DNA dostarcza wyjaśnienia istnienia tych form, to mechanizm alternatywnego wycinania intronu i jego regulacja pozostaje zagadką, mimo że poznano strukturę promotora genu [24]. W procesach nowotworowych dochodzi do zaburzenia regulacji mechanizmu alternatywnego wycinania intronu [21, 52].

Stwierdzono, że tkankowe czynniki wzrostu i glikokortykoidy [13, 21, 23, 24, 35] mogą stymulować syntezę fibronektyny. cAMP reguluje ekspresję HCG i fibronektyny w ludzkich cytotrofoblastach [14], podwyższając zawartość mRNA dla HCG, a zapobiegając wzrostowi mRNA dla fibronektyny.

## RECEPTORY DLA FIBRONEKTYNY

Odkąd wiadomo, że fibronektyna oddziałuje z komórkami, a szczególnie gdy stwierdzono połączenia przezbłonowe między fibronektyną a aktyną, obiektem zainteresowania stała się powierzchnia komórki [34]. W ostatnich latach zidentyfikowano białka błonowe, które okazały się być miejscem wiążącym fibronektynę [3].

Substancja pozakomórkowa i cytoszkielet komórek są ściśle powiązane. Włókna substancji pozakomórkowej zawierające fibronektynę przylegają do wewnątrzkomórkowych włókien aktyny [65]. Komórki zmienione nowotworowo, które tracą zarówno fibronektynę, jak i zorganizowane mikrofilamenty aktyny, są w stanie odtworzyć te mikrofilamenty we włókna,



jeśli do ich hodowli doda się fibronektynę. Traktowanie komórek cytochalazynami, które niszczą włókna aktyny, prowadzi do utraty fibronektyny na powierzchni komórki. Te wyniki doprowadziły do wniosku, że musi istnieć fizyczne połączenie między pozakomórkową fibronektyną a wewnątrzkomórkową aktyną. To przezbłonowe połączenie odgrywa istotną rolę w przyleganiu komórkowym, morfologii i migracji komórek i jest niszczone w procesie transformacji nowotworowej. Wiele białek cytoszkieletu, jak winkulina i talina bierze udział w tym połączeniu [65].

Najbardziej obiecującym kandydatem dla połączeń przezbłonowych są glikoproteidy, tworzące kompleks o masie 140 kDa (składający się z 3 niekowalencyjnie połączonych glikoproteidów u kury i z 2 u ssaków). Analiza immunofluorescencyjna i immunoelektronowa sugerują, że kompleks ten jest częścią przezbłonowego połączenia cytoszkieletu z substancją pozakomórkową.

Poznano dokładnie strukturę pierwszorzędową tego glikoproteidu i stwierdzono jego podobieństwo do receptora fibronektyny opisanego przez Pytela w 1985 r. Zaproponowano wspólną nazwę "integryna" [3]. Receptor ten składa się z kilku podjednostek zlokalizowanych wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo. Poznano dwa podstawowe typy receptorów z rodziny integryn wiążące fibronektynę. Są to receptory alfa5 beta1 i alfa4 beta1 [10, 31, 42]. Znana jest budowa centrum aktywnego receptora alfa4 beta 1 [48] z asparaginą w centralnej pozycji. Stwierdzono, że domena CS1 i CS5 segmentu przylegania typu III (III CS) jest wiązana przez ten receptor [48]. Glikozylacja odgrywa istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu receptora [2].

Heterodynamiczne, przezbłonowe receptory przylegania z rodziny integryn regulują przyleganie monocytów i makrofagów [16, 39] do fibronektyny, lamininy i kolagenu. Te oddziaływania są istotne w procesach odpornościowych. Wydaje się, że ekspresja receptorów przylegania podlega ścisłej regulacji [39]. Mogłoby to wyjaśniać zjawisko odłączania monocytów od białek substancji pozakomórkowej i odkładania ich w ogniskach zapalnych.

Limfocyty B mają głównie receptor alfa4 beta1 [38], limfocyty T mają obydwa typy receptorów [37]. Obecność dwóch typów receptorów daje możliwość interakcji komórka-komórka i komórka- substancja pozakomórkowa, które są istotne w procesach odpornościowych i reakcjach zapalnych. Czynniki aktywujące limfocyty T mogą zmieniać ekspresję obydwu receptorów, umożliwiając selektywną regulację [37].

Komórki oddziałują z fibronektyną pozakomórkową poprzez receptory przylegania z rodziny integryn. Receptory te są wysoko zorganizowane i rozmieszczone podobnie do włókien fibronektyny. Procesy embriogenezy i transformacji nowotworowej prowadzą do dezorganizacji rozmieszczenia receptorów i utraty fibronektyny [1, 29, 44, 54]. Stwierdzono, że receptor fibronektyny powstaje na powierzchni komórki w odpowiedzi na obecność fibronektyny w substancji pozakomórkowej [54].

Receptor dla fibronektyny stwierdzono na płytkach krwi [34]. Jest to kompleks glikoproteidowy II b/ III a. Miejsce wiążące cząsteczkę fibronektyny z komórką może zostać przyłączone do domeny III a tego kompleksu. Zarówno wiązanie, jak i tworzenie kompleksu jest hamowane przez peptydy adhezji. Stwierdzono, że schorzenie genetyczne, jakim jest trombastenia Glanzmana, jest spowodowane utratą kompleksu II b/III a i zdolności wiązania fibronektyny przez płytki.

Kompleks II b/III a różni się od 140 kDa kompleksu integryny dla fibroblastów inną lokalizacją komórkową i odmiennym powinowactwem do białek substancji pozakomórkowej.

## FUNKCJE

Impulsem do badań nad fibronektynami stało się odkrycie, że powierzchnia prawidłowej komórki traci duży glikoproteid w procesie transformacji nowotworowej. Utratę tą stwierdzono metodami immunoflorescencyjnymi. Intensywnie włóknista substancja międzykomórkowa, zawierająca fibronektynę, obserwowana w prawidłowych komórkach z reguły stawała się nieobecna po ich transformacji nowotworowej [46].

Te spostrzeżenia poprzedziły podjęcie badań nad funkcją fibronektyn. Yamada i wsp. stwierdzili, że dodanie fibronektyny do hodowli komórek guza, który jej nie syntetyzuje, przywraca włóknisty charakter substancji międzykomórkowej i morfologię komórki prawidłowej [54, 65]. Fibronektyna odgrywa istotną rolę w procesie przylegania komórek i ich morfologii. Stwierdzono, że może promować migrację komórek. Badania nad migracją komórek w czasie rozwoju embrionalnego ujawniły istnienie powiązań fibronektyny ze szlakami migracji komórek, reakcję migrujących komórek na fibronektynę oraz możliwość blokowania migracji komórek substancjami reagującymi z fibronektyną [6]. Fibronektyna bierze udział w migracji i przyleganiu komórek w rozwoju zarodkowym [25]. Komórki zarodka przylaczają się do włókien fibronektyny poprzez receptory z rodziny integryn. Proces ten podlega regulacji hormonalnej, czynników wzrostu. Stwierdzono, że tego typu oddziaływania są istotne w procesach gastrulacji, hematopoezy, rozwoju zarodkowym, gojeniu ran, procesach transformacji nowotworowej [1, 25, 29, 44, 54].

Stężenie fibronektyny w surowicy krwi wynosi 300  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Ułatwia ona przyleganie komórek w hodowli tkankowej i uczestniczy w procesie krzepnięcia krwi. Przylacza się do fibryny [7] oraz promuje adhezję płytek krwi [28]. Wbudowanie fibronektyny do skrzepu krwi ma również późniejsze konsekwencje. Jedną z nich jest migracja komórek podczas gojenia rany, gdzie fibronektyna promuje przyleganie i migrację komórek biorących udział w procesie gojenia, podobnie jak podczas embriogenezy. Kolejna funkcja fibronektyny to współdziałanie w lizie skrzepu. Fibronektyna przylacza zarówno plazminogen, jak i jego aktywator, co nasila fibrylizację [7, 34]. Fibronektyna promuje fagocytozę fibryny i innych substancji przez makrofagi. Wydaje się prawdopodobne, że obecność fibronektyny w skrzepie jest istotna zarówno dla jego formowania, jak i rozpuszczenia [34].

Fibronektyna wraz z innymi cząsteczkami substancji międzykomórkowej bierze udział w tworzeniu środowiska, w którym następuje różnicowanie komórek [65].

W procesie transformacji nowotworowej możemy mieć do czynienia z różnymi zmianami w produkcji fibronektyny:

- 1) blokada produkcji obu form tkankowych,
- 2) przestawienie produkcji normalnej fibronektyny na produkcję fibronektyny onkofetalnej,
- 3) dalsza produkcja normalnej fibronektyny jakkolwiek w mniejszych ilościach.

Produkcja fibronektyny onkofetalnej może być także związana z selekcją fibroblastów w ciągłej hodowli – tylko komórki zdolne do syntezy onkofetalnej fibronektyny mogą przeżyć w hodowlach komórkowych. Z drugiej strony synteza fibronektyny onkofetalnej może być też wynikiem reaktywacji "onkofetalnych" genów kodujących tę domenę (rozpoznawaną przez przeciwciała FDC-6).



## DALSZE PERSPEKTYWY BADAŃ FIBRONEKTYNY

Pomimo że fibronektyna została opisana po raz pierwszy przed 18 laty, nie jest w pełni poznana jej funkcja i struktura. Obecnie znamy dokładnie strukturę genu fibronektyny, sekwencje różnych odmian białka, receptory komórkowe. Poznano pewne biologiczne funkcje fibronektyny i ustalono ich molekularne podłoże. Nadal konieczne jest połączenie szczegółowych informacji molekularnych z biologiczną złożonością. Badania struktury fibronektyny są nadal prowadzone i dotyczą:

- trójwymiarowej struktury cząsteczki białka fibronektyny,
- struktury trzeciorzędowej receptorów białkowych,
- mechanizmu regulacji alternatywnego wycinania intronu,
- natury połączeń przezbłonowych.

Jak wspomniano, impulsem do badań nad fibronektyną było odkrycie jej utraty w procesie transformacji nowotworowej. Zjawisko to nadal nie jest wyjaśnione. Być może każda zmiana struktury pierwszorzędowej białek tworzących połączenia przezbłonowe prowadząca do rozproszenia kompleksu (fibronektyna, integryna, wikulina, talina i aktyna) może prowadzić do transformacji nowotworowej. W przypadku fibronektyny zmiana biosyntezy obejmuje możliwe znane modele wycinania intronu. Efekty potranslacyjne na białkach kompleksu są również możliwe. Transformacja często wzbudza aktywację kinazy tyrozynowej, a białka kompleksu są potencjalnymi receptorami dla kinazy [34]. Podobnie transformacja prowadzi do wzrostu wydzielania proteaz, szczególnie aktywatora plazminogenu. W związku z powyższym dokładne kompleksowe badania nad efektami transformacji na te kompleksy przezbłonowe wymagają zwrócenia uwagi na każdy z możliwych efektów.

## LITERATURA

- [1] AKIYAMA SK, LARJAVA H, YAMADA KM. Differences in the biosynthesis and localization of the fibronectin receptor in normal and transformed cultured human cells. *Cancer Res* 1990; **1**, **50(5)**: 1601–1607.
- [2] AKIYAMA SK, YAMADA SS, YAMADA KM. Analysis of the role of glycosylation of the human fibronectin receptor. *J Biol Chem* 1989; **264(30)**: 18011–18018.
- [3] ARGRAVES WS, DICKERSON K, BURGESS WH, RUOSLAHTI E. Fibulin, a novel protein that interacts with the fibronectin receptor beta subunit cytoplasmic domain. *Cell* 1989; **58(4)**: 623–629.
- [4] AUERSPERG N, KRUK PA, MACLAREN IA, WATT F, MYRDAL SE. Heterogenous expression of keratin, involucrin, and extracellular matrix among subpopulations of a poorly differentiated human cervical carcinoma: possible relationships to patterns of invasion. *Cancer Res* 1989; **49**: 3007–3014.
- [5] BARONE MV, HENCHCLIFFE C, BARALLE FE, PAOLELLA G. Cell type specific trans-acting factors are involved in alternative splicing of human fibronectin pre-mRNA. *EMBO-J* 1989; **8(4)**: 1079–1085.
- [6] BATES RC, RANKIN LM, LUCAS CM, SCOTT JL, KRISANSSEN GW, BURNS GF. Individual embryonic fibroblasts express multiple beta chains in association with the alpha v integrin subunit. Loss of beta 3 expression with cell confluence. *J Biol Chem* 1991; **266(28)**: 18593–18599.
- [7] BECKMANN R, GEIGER M, DE VRIES C, PANNEKOEK H, BINDER BR. Fibronectin decreases the stimulatory effect of fibrin and fibrinogen fragment FCB-2 on plasmin formation by tissue plasminogen activator. *J Biol Chem* 1991; **266(4)**: 2227–2232.
- [8] BENECKY MJ, WINE RW, KOLVENBACH CG, MOSESSON MW. Ionic-strength- and pH-dependent conformational states of human plasma fibronectin. *Biochemistry* 1991; **30(17)**: 4298–4306.
- [9] BERGSTROM SE, HAUZENBERGER D, SUNDQVIST KG. T lymphocytes degrade fibronectin. *Scand J Immunol* 1991; **33(4)**: 453–459.

- [10] BIRKENMEIER TM, MCQUILLAN JJ, BOEDEKER ED, ARGRAVES WS, RUOSLAHTI E, DEAN DC. The alpha 5 beta 1 fibronectin receptor. Characterization of the alpha 5 gene promoter. *J Biol Chem* 1991; **266**(30): 20544–20549.
- [11] BORSI L, BALZA E, ALLEMANNI G, ZARDI L. Differential expression of the fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain in normal human fibroblast cell lines originating from different tissues. *Exp Cell Res* 1992; **119**(1): 98–105.
- [12] BORSI L, BALZA E, LEPRINI A, PONASSI M, ZARDI L. Procedure for the purification of the fibronectin proteolytic fragments containing the ED-B oncofetal domain. *Anal Biochem* 1991; **192**(2): 372–379.
- [13] BORSI L, CASTELLANI P, RISSO AM, LEPRINI A, ZARDI L. Transforming growth factor-beta regulates the splicing pattern of fibronectin messenger RNA precursor. *FEBS Lett* 1990; **261**(1): 175–178.
- [14] BOWLUS CL, MCQUILLAN JJ, DEAN DC. Characterization of three different elements in the 5'-flanking region of the fibronectin gene which mediate a transcriptional response to cAMP. *J Biol Chem* 1991; **266**(2): 1122–1127.
- [15] BROTHIE H, WAKEFIELD D. Fibronectin: structure, function and significance in wound healing. *Australas J Dermatol* 1990; **31**(1): 47–56.
- [16] BROWN DL, PHILLIPS DR, DAMSKY CH, CHARO IF. Synthesis and expression of the fibroblast fibronectin receptor in human monocytes. *J Clin Invest* 1989; **84**(1): 366–370.
- [17] BURKE EM, DANNER DB. Changes in fibronectin mRNA splicing with in vitro passage. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **178**(2): 620–624.
- [18] CAGLIERO E, ROTH T, ROY S, LORENZI M. Characteristics and mechanisms of high-glucose-induced overexpression of basement membrane components in cultured human endothelial cells. *Diabetes* 1991; **40**(1): 102–110.
- [19] CAGLIERO E, ROTH T, ROY S, MAIELLO M, LORENZI M. Expression of genes related to the extracellular matrix in human endothelial cells. Differential modulation by elevated glucose concentrations, phorbol esters, and cAMP. *J Biol Chem* 1991; **266**(22): 14244–14250.
- [20] CARNEMOLLA B, BALZA E, SIRI A, ZARDI L, NICOTRA MR, BIGOTTI A, NATALI PG. A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. *J Cell Biol* 1989; **108**(3): 1139–1148.
- [21] CHANDLER LA, BOURGEOIS S. Posttranscriptional down-regulation of fibronectin in N-ras-transformed cells. *Cell Growth Differ* 1991; **2**(8): 379–384.
- [22] CHERNOUSOV MA, FOGERTY FJ, KOTELIANSKY VE, MOSHER DF. Role of the I-9 and III-1 modules of fibronectin in formation of an extracellular fibronectin matrix. *J Biol Chem* 1991; **266**(17): 10851–10858.
- [23] DELAPP NW, DIECKMAN DK. Effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) and insulin-like growth factors type I (IGF-I) and type II (IGF-II) on adult human keratinocyte growth and fibronectin secretion. *J Invest Dermatol* 1990; **94**(6): 777–780.
- [24] DEAN D, BOWLUS C, BOURGEOIS S. Cloning and analysis of the promoter region of the human fibronectin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 1876–1880.
- [25] DEAN DC, BIRKENMEIER TM, ROSEN GD, WEINTRAUB SJ. Glycoprotein synthesis and secretion. Expression of fibronectin and its cell surface receptors. *Am Rev Respir Dis* 1991; **144**(3): S25–28.
- [26] EARL U, ESTLIN C, BULMER J. Fibronectin and laminin in the early human placenta. *Placenta* 1990; **11**(3): 223–231.
- [27] GARCIA-PARDO A, FERREIRA OC. Adhesion of human T-lymphoid cells to fibronectin is mediated by two different fibronectin domains. *Immunology* 1990; **69**(1): 121–126.
- [28] GINSBERG M, PAINTER R, FORSUTH J. Thrombin increases expression of fibronectin antigen on the platelet surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **77**: 1049–1053.
- [29] GOULD VE, KOUKOULIS GK, VIRTANEN I. Extracellular matrix proteins and their receptors in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. *Cell Differ Dev* 1990; **32**(3): 409–416.
- [30] HANSEN CK. Fibronectin type III-like sequence and a new domain type in prokaryotic depolymerases with insoluble substrates. *FEBS-Lett* 1992; **305**(2): 91–96.
- [31] HAUTANEN A, GAILIT J, MANN DM, RUOSLAHTI E. Effects of modifications of the RGD sequence and its context on recognition by the fibronectin receptor. *J Biol Chem* 1989; **264**(3): 1437–1442.
- [32] HERSHBERGER RP, CULP LA. Cell-type-specific expression of alternatively spliced human fibronectin III CS mRNAs. *Mol Cell Biol* 1990; **10**(2): 662–671.
- [33] HIRANO H, YAMADA Y, SULLIVAN M, DE CROMBUGHE B, PASTAN I, YAMADA K. Isolation of genomic DNA clones spanning the entire fibronectin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 46–50.
- [34] HYNES R. Fibronectins: A family of complex and versatile adhesive glycoproteins derived from a single gene. *The Harvey Lectures* 1987; series 81: 133–152.



- [35] IRWIN JC, KIRK D, KING RJ, QUIGLEY MM, GWATKIN RB. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. *Fertil Steril* 1989; **52(5)**: 761–768.
- [36] KHAN MY, MEDOW MS, NEWMAN SA. Unfolding transitions of fibronectin and its domains. Stabilization and structural alteration of the N-terminal domain by heparin. *Biochem J* 1990; **270(1)**: 33–38.
- [37] KOHN FR, GRIGG ME, KLINGEMANN HG. Differential regulation of fibronectin receptor subunit gene and cell surface expression in human peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol* 1991; **146(5)**: 1484–1489.
- [38] KOHN FR, GRIGG ME, KLINGEMANN HG. Fibronectin receptor subunit (alpha 5, alpha 4 and beta 1) mRNA and cell surface expression in human peripheral blood B lymphocytes. *Immunol Lett* 1991; **28(1)**: 27–30.
- [39] KOHN FR, KLINGEMANN HG. Regulation of fibronectin receptor (alpha 5 beta 1) mRNA expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages by activation/differentiation signals. *Exp Hematol* 1991; **19(7)**: 653–658.
- [40] KOLBE M, KAUFMAN JL, FRIEDMAN J, DINERSTEIN C, MACKENZIE J, BOYD C. Changes in steady-state levels of mRNAs coding for type IV collagen, laminin and fibronectin following capillary basement membrane thickening in human adult onset diabetes. *Connect Tissue Res* 1990; **25(1)**: 77–85.
- [41] KOTTGEN E, HELL B, MULLER C, KAINER F, TAUBER R. Developmental changes in the glycosylation and binding properties of human fibronectins. Characterization of the glycan structures and ligand binding of human fibronectins from adult plasma, cord blood and amniotic. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1989; **370(12)**: 1285–1294.
- [42] LAFLAMME SE, AKIYAMA SK, YAMADA KM. Regulation of fibronectin receptor distribution. *J Cell Biol* 1992; **117(2)**: 437–447.
- [43] LAMBERT CA, SOUDANT EP, NUSGENS B, LAPIERE CM. Pretranslational regulation of extracellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces. *Lab Invest* 1992; **66(4)**: 444–451.
- [44] LANE TF, IRUELA-ARISPE ML, SAGE EH. Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis in vitro. Changes in fibronectin, thrombospondin-1, and plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 1992; **267(23)**: 16736–16745.
- [45] LORIDON-ROSA B, VIELH P, MATSUURA H, CLAUSEN H, CUADRADO C, BURTIN P. Distribution of oncofetal fibronectin in human mammary tumors: immunofluorescence study on histological sections. *Cancer Res* 1990; **50(5)**: 1608–1612.
- [46] MATSUURA H, HAKOMORI S. The oncofetal domain of the fibronectin defined by monoclonal antibody FDC-6: its presence in fibronectins from fetal and tumor tissues and its absence in those from normal adult tissues and plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82(19)**: 6517–6521.
- [47] MORLA A, RUOSLAHTI E. A fibronectin self-assembly site involved in fibronectin matrix assembly: reconstruction in a synthetic peptide. *J Cell Biol* 1992; **118(2)**: 421–429.
- [48] MOULD AP, KOMORIYA A, YAMADA KM, HUMPHRIES MJ. The CS5 peptide is a second site in the III CS region of fibronectin recognized by the integrin alpha 4 beta 1. Inhibition of alpha 4 beta 1 function by RGD peptide homologues. *J Biol Chem* 1991; **266(6)**: 3579–3585.
- [49] NAGAI T, YAMAKAWA N, AOTA S, YAMADA SS, AKIYAMA SK, OLDEN K, YAMADA KM. Monoclonal antibody characterization of two distant sites required for function of the central cell-binding domain of fibronectin in cell adhesion, cell migration, and matrix assembly. *J Cell Biol* 1991; **114(6)**: 1295–1305.
- [50] NAHMAN NS jr, LEONHART KL, COSIO FG, HEBERT CL. Effects of high glucose on cellular proliferation and fibronectin production by cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 1992; **41(2)**: 396–402.
- [51] NAKAMURA K, KASHIWAGI S, TAKEO K. Characterization of the interaction between human plasma fibronectin and collagen by means of affinity electrophoresis. *J Chromatogr* 1992; **597(1-2)**: 351–356.
- [52] OYAMA F, HIROHASHI S, SHIMOSATO Y, TITANI K, SEKIGUCHI K. Deregulation of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in malignant human liver tumors. *J Biol Chem* 1989; **264(18)**: 10331–10334.
- [53] OYAMA F, MURATA Y, SUGANUMA N, KIMURA T, TITANI K, SEKIGUCHI K. Patterns of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in human adult and fetal tissues. *Biochemistry* 1989; **28(3)**: 1428–1434.
- [54] ROMAN J, LACHANCE RM, BROEKELMANN TJ, KENNEDY CJ, WAYNER EA, CARTER WG, MCDONALD JA. The fibronectin receptor is organized by extracellular matrix fibronectin: implications for oncogenic transformation and for cell recognition of fibronectin matrices. *J Cell Biol* 1989; **108(6)**: 2529–2543.
- [55] ROSTAGNO AA, FRANGIONE B, GOLD LI. Biochemical characterization of the fibronectin binding sites for IgG. *J Immunol* 1989; **143(10)**: 3277–3282.
- [56] ROY S, SALA R, CAGLIERO E, LORENZI M. Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87(1)**: 404–408.
- [57] SCHWARZBAUER J, PAUL J, HYNES R. On the origin of species of fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 1424–1428.

- [58] SEKIGUCHI K, TITANI K. Probing molecular polymorphism of fibronectins with antibodies directed to the alternatively spliced peptide segments. *Biochemistry* 1989; **28**(8): 3293–3298.
- [59] SMILENOV L, FORSBERG E, ZELIGMAN I, SPARRMAN M, JOHANSSON S. Separation of fibronectin from a plasma gelatinase using immobilized metal affinity chromatography. *FEBS Lett* 1992; **302**(3): 227–230.
- [60] TIENARI J, LEHTONEN E, VARTIO T, VIRTANEN I. Embryonal carcinoma cells adhere preferentially to fibronectin and laminin but their endodermal differentiation leads to a reduced adherence to laminin. *Exp Cell Res* 1989; **182**(1): 26–32.
- [61] TRESSEL T, MCCARTHY JB, CLAYCAY J, LEE TD, LEGESSE K, SHIVELY JE, PANDE H. Human plasma fibronectin. Demonstration of structural differences between the A- and B-chains in the III CS region. *Biochem J* 1991; **274**: 731–738.
- [62] TURPEENNIEMI-HUJANEN T, RONNBERG L, KAUPPILA A, PUISTOLA U. Laminin in the human embryo implantation: analogy to the invasion by malignant cells. *Fertil Steril* 1992; **58**(1): 105–113.
- [63] VARTIO T, VON KOSKULL H, VIRTANEN I. ED-A sequence containing fibronectin in human amniotic fluid and amnion epithelial cells. *Int J Biochem* 1989; **21**(3): 307–311.
- [64] VIRTANEN I, YLANNE J, VARTIO T, SAKSELA E. Human natural killer cells express different integrins and spread on fibronectin. *Scand J Immunol* 1991; **33**(4): 421–428.
- [65] WATT F. The extracellular matrix and cell shape. *TIBS* 1986; **1**: 482–485.
- [66] ZHU B, LAINE R. Novel hyperglycosylated weak gelatin-binding fibronectin from human fetal placenta. Fractionation of a high poly (N-acetylglucosamine) fragment by tomato lectin affinity chromatography. *Eur J Biochem* 1990; **188**(1): 67–71.
- [67] ZHU BC, LAINE RA, BARKLEY MD. Intrinsic tryptophan fluorescence measurements suggest that polyactosaminyl glycosylation affects the protein conformation of the gelatin-binding domain from human placental fibronectin. *Eur J Biochem* 1990; **189**(3): 509–516.

Otrzymano: 30.03.1993 r.

Przyjęto: 05.05.1993 r.

Adres autora: Lublin, ul. Jaczewskiego 8



# MITOCHONDRIA AMEBY (*ACANTHAMOEBA CASTELLANII*) ŁĄCZĄ ENERGETYCZNE CECHY MITOCHONDRIOW ROŚLIN I ZWIERZĄT

MITOCHONDRIA OF AMOEBIA (*A. CASTELLANII*) SHARE  
ENERGETIC FEATURES OF PLANT AND ANIMAL MITOCHONDRIA

Lilla HRYNIEWIECKA

Zakład Bioenergetyki Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, Poznań

*Streszczenie.* Mitochondria ameby *A. castellanii* i roślin wyższych wykazują wiele wspólnych cech, nie spotykanych w mitochondriach ssaków. Do najważniejszych z tych cech należą: (i) współistnienie dwóch konstytutywnych dróg transportu elektronów – fosforylującej drogi przebiegającej przez łańcuch cytochromowy oraz niefosforylującej i niewrażliwej na KCN drogi alternatywnej; (ii) istnienie nieelektrogennej obejścia dla elektronów z matriksowego NADH do ubichinonu; (iii) zdolność do utleniania egzogenego (cytoplazmatycznego) NADH. W artykule przedstawiono charakterystyczne cechy rozgałęzionego łańcucha oddechowego ameby i omówiono ich znaczenie dla ogólnego metabolizmu mitochondriów.

*Summary.* Mitochondria of amoeba *A. castellanii* were found to share many features with mitochondria of higher plants, absent from the mammalian mitochondria. The main features are: (i) coexistence of two constitutive pathway of electron transport – the phosphorylating one passing through the cytochrome chain, and the alternative one, nonphosphorylating and insensitive to KCN; (ii) the presence of a non-electrogenic bypass for the electrons from the matrix pool of NADH to ubiquinone; (iii) the ability to oxidize exogenous (cytosolic) NADH. The properties of the branched respiratory chain of amoeba mitochondria and its significance for the general metabolism of mitochondria are discussed in this article.

## WSTĘP

*Acanthamoeba castellanii* należy do rodzaju małych, wolnożyjących ameb zasiedlających głębię i naturalne zbiorniki wodne [5]. Badania nad energetyką mitochondriów tego prostego organizmu zwierzęcego ujawniły uderzające podobieństwo łańcucha oddechowego ameby do rozgałęzionego łańcucha oddechowego roślin wyższych [30]. Podobieństwo to staje się jeszcze bardziej interesujące w zestawieniu z hipotezą opartą na filogenetycznej analizie rybosomalnego RNA, a zakładającą ewolucyjne wyprowadzenie roślin wyższych z *Acanthamoeba castellanii* [13, 60].

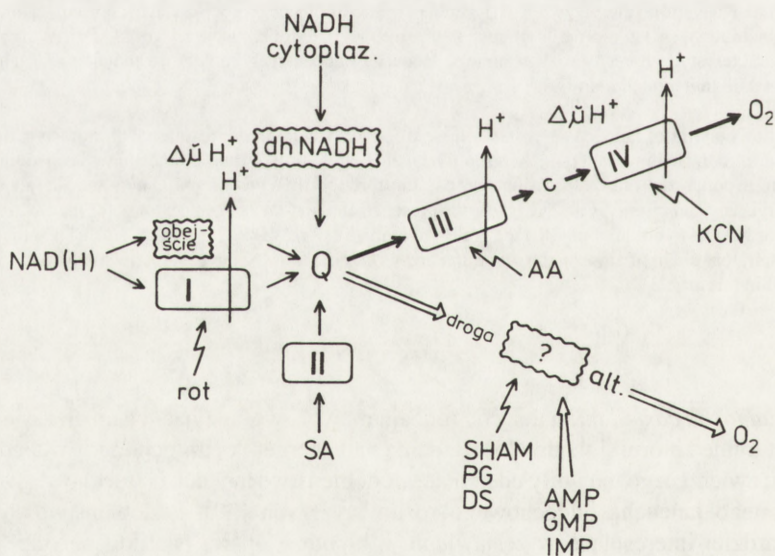
W łańcuchu oddechowym ameby (rys. 1) i roślin [12, 39, 40, 45] obok czterech podstawowych kompleksów oddechowych, z których I, III i IV generują elektrochemiczny gradient protonowy w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej (analogicznie do odpowiednich kompleksów w mitochondriach ssaków), występują dodatkowe przenośniki elektronów. Są to:

1) alternatywna oksydaza niewrażliwa na KCN, katalizująca przeniesienie elektronów na tlen z pominięciem łańcucha cytochromowego;

2) dehydrogenaza zewnętrznego NADH niewrażliwa na rotenon, zlokalizowana po zewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej i utleniająca bezpośrednio cytoplazmatyczny NADH oraz

3) dehydrogenaza wewnętrznego NADH niewrażliwa na rotenon, umiejscowiona w wewnętrznej błonie mitochondrialnej od strony matriks i utleniająca matriksowy NADH.

Dwie oksydazy terminalne, dwie dehydrogenazy utleniające matriksowy NADH i dehydrogenaza NADH, mogąca przenosić ekwiwalenty redukcyjne bezpośrednio z cytoplazmy na łańcuch oddechowy, tworzą w wewnętrznej błonie mitochondrialnej ameby rozgałęziony system dróg transportu elektronów, wiążących się ze sobą na poziomie ubichinonu (rys. 1). System taki wymaga bardzo precyzyjnych mechanizmów regulacji, tym bardziej że poszczególne drogi transportu elektronów nie są w jednakowym stopniu zaangażowane w syntezę ATP [30].



Rys. 1. Schemat rozgałęzionego łańcucha oddechowego w mitochondriach ameby: I-IV – kompleksy głównego łańcucha oddechowego, ? – białko (białka?) drogi alternatywnej, "obejście" – dehydrogenaza matriksowego NADH niewrażliwa na rotenon, SA – bursztynian, SHAM – kwas salicylohydroksamowy, GP – galusan propylu, DS – disulfiram, rot – rotenon, AA – antymycyna A; strzałki łamane – inhibitory, strzałka pusta – aktywatory



## ALTERNATYWNA DROGA ODDECHOWA NIEWRAŻLIWA NA KCN

Jedną z najważniejszych funkcji mitochondriów wszystkich organizmów jest synteza ATP, głównego źródła energii swobodnej wykorzystywanego przez komórkę. Ponieważ podstawą mechanizmu syntezy ATP jest jej energetyczne sprzężenie z transportem elektronów, zainteresowanie wzbudza niezwiązana z fosforylacją oksydacyjną droga transportu elektronów do tlenu wykryta w mitochondriach roślin wyższych [12, 40, 45, 46, 56] i wielu eukariotycznych mikroorganizmów [16, 25, 41], a także w komórkach bakteryjnych [36]. Droga ta – nazwana alternatywną drogą oddechową – odgałęzia się od "klasycznego" łańcucha oddechowego na poziomie ubichinonu (rys. 1), stąd niewrażliwa jest na inhibitory cytochromowych przenośników elektronów – KCN i antymycynę A.

Dotychczas nie udało się poznać molekularnego składu drogi alternatywnej, pomimo prób izolacji przenośników mogących brać udział w alternatywnym transporcie elektronów do tlenu. Także nie określono jednoznacznie samej alternatywnej oksydazy jako jednostki molekularnej. Jednak wiele danych eksperymentalnych wskazuje, że jest to białko 35–37 kDa [55, 57, 68] usytuowane prawdopodobnie przy matriksowej powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej [55].

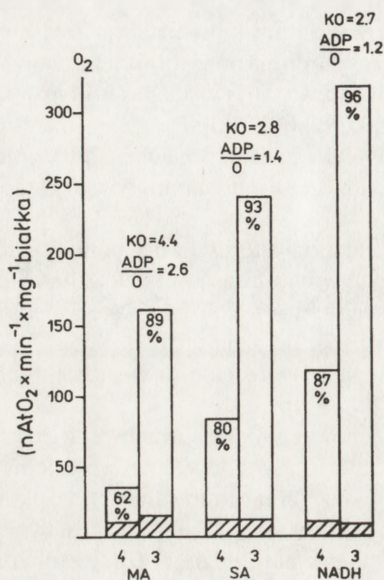
Współistnienie w mitochondriach dwóch dróg oddechowych – cytochromowej i alternatywnej – nie oznacza, że obie drogi równocześnie biorą udział w oddychaniu przy pełnym wykorzystaniu możliwości każdej z nich. Na przykład u wielu organizmów transport elektronów w nieobecności KCN przebiega wyłącznie drogą cytochromową. Dlatego też maksymalny przepływ elektronów przez każdą z dróg, jak i potencjalny udział każdej z nich w całkowitym oddychaniu można określić tylko w obecności odpowiednich inhibitorów.

U ameby *A. castellanii* wrażliwość oddychania na inhibitory drogi cytochromowej jest odmienna w przypadku całych komórek (trofozoitów) i izolowanych mitochondriów. W komórkach ameby KCN i antymycyna A stymulują zużycie tlenu [19, 31], natomiast w izolowanych mitochondriach, przeciwnie, częściowo je hamują [20, 21, 31]. W obu układach oddychanie odporne na inhibitory drogi cytochromowej jest całkowicie hamowane przez inhibitory drogi alternatywnej: SHAM (kwas salicylohydroksamowy), galusan n-propylu i disulfiram (dwusiarczek tetraetylotiokarbamylu) [30].

Stosowanie substratów oddechowych różniących się pod względem drogi wprowadzania elektronów na ubichinon – miejsce odgałęzienia drogi alternatywnej od drogi cytochromowej – pozwala na uzyskanie pełniejszej informacji zarówno o charakterze każdej z dróg oddechowych, jak i ich wzajemnych powiązaniach. Substraty zależne od  $\text{NAD}^+$ , np. jabłczan czy izocytrynian, oddają elektrony na ubichinon przez I miejsce sprzężenia lub jego niewrażliwe na rotenon obejście. Elektrony z bursztynianu i egzogenego NADH wprowadzane są na łańcuch oddechowy od razu na oksydoredukcyjnym poziomie ubichinonu, przy czym elektrony z bursztynianu dochodzą od strony matriks, a z NADH od zewnętrznej strony wewnętrznej błony mitochondrialnej (rys. 1).

W mitochondriach ameby utlenianie jabłczanu, bursztynianu i egzogenego NADH wykazuje silne sprzężenie. Odpowiednie wartości stosunku ADP/O zgodne są z ilością miejsc sprzężenia, wynikającą ze sposobu wprowadzania elektronów na główny łańcuch oddechowy (rys. 2). Natomiast w obecności KCN obserwuje się charakterystyczny dla drogi alternatywnej brak sprzężenia transportu elektronów z syntezą ATP; wartości ADP/O są zerowe podczas utleniania bursztynianu i NADH, a więc substratów wprowadzających elektrony z pominię-

ciem I kompleksu oddechowego. Jednakże podczas utleniania jabłczanu, które przebiega z udziałem I miejsca sprzężenia, stosunek ADP/O wynosi około 1.



Rys. 2. Zużycie tlenu przez mitochondria ameby z różnymi substratami, w obecności i w nieobecności KCN: MA – jabłczan, SA – bursztynian, 4 – stan oddechowy 4, 3 – stan oddechowy 3 (fosforylujący), % – hamowanie oddychania przez KCN wyrażone w procentach; pola zakreskowane – oddychanie odporne na KCN w wartościach absolutnych

Stosując kryterium fosforylacji oksydacyjnej, drogę alternatywną określa się często jako niefosforylującą. Jednakże z punktu widzenia teorii chemiosmotycznej, należałoby ją raczej określić jako drogę transportu elektronów nie generującą  $\Delta\mu_{H^+}$  (siła protonomotoryczna) [42]. W mitochondriach ameby pomiary  $\Delta\Psi$  (głównego z dwóch komponentów  $\Delta\mu_{H^+}$  w mitochondriach) prowadzone w obecności KCN wykazały, że podczas utleniania bursztynianu i egzogenego NADH mitochondria nie generują  $\Delta\Psi$ , natomiast gdy substratem jest jabłczan,  $\Delta\Psi$  powstaje przy udziale I miejsca sprzężenia (patrz dalej i rys. 4A i 5B). Tak więc zarówno wartości stosunku ADP/O, jak i poziom  $\Delta\Psi$  wskazują, że odcinek łańcucha oddechowego od matriksowego NADH do ubichinonu jest wspólny dla obu dróg oddechowych i pomimo wykluczenia drogi cytochromowej może dostarczyć komórce energii użytecznej pośrednio również drogą alternatywną.

Interesującym przykładem dostarczania komórce energii wystarczającej do podtrzymania funkcji fizjologicznej przez samą drogę alternatywną jest oscylacja kurczliwości w kanałach endoplazmatycznych śluzowca *Physarum* zachodząca w obecności KCN, a możliwa dzięki współpracy drogi alternatywnej z I miejscem sprzężenia [3].

Potencjał błonowy generowany przez drogę alternatywną współpracującą z I miejscem sprzężenia umożliwia też aktywną akumulację jonów  $Ca^{2+}$  w mitochondriach ameby, u których transport  $Ca^{2+}$  jest również aktywny, jak w mitochondriach ssaków [11]. Niestety brak jest danych na ten temat dotyczących mitochondriów roślinnych, ponieważ do niedawna sądzono, że nie są one zdolne do elektrogennego transportu  $Ca^{2+}$  [10]. Ostatnio stwierdzono jednak, że mitochondria roślin akumulują  $Ca^{2+}$  na koszt  $\Delta\Psi$  [59], można więc przypuszczać, że w procesie tym będzie brała udział także droga alternatywna sprzężona z I miejscem.

Jako kryterium udziału drogi alternatywnej w całkowitym oddychaniu, tj. w nieobecności KCN, przyjmuje się stopień hamowania zużycia tlenu przez SHAM [45]. W mitochondriach tych roślin, w których obie drogi oddechowe – alternatywna i cytochromowa – działają równocześnie, często obserwuje się rozprzęgający wpływ drogi alternatywnej na fosforylację oksydacyjną [40]. W takim wypadku dodanie SHAM, poza przyhamowaniem zużycia tlenu, podwyższa wartości KO i stosunek ADP/O [40].

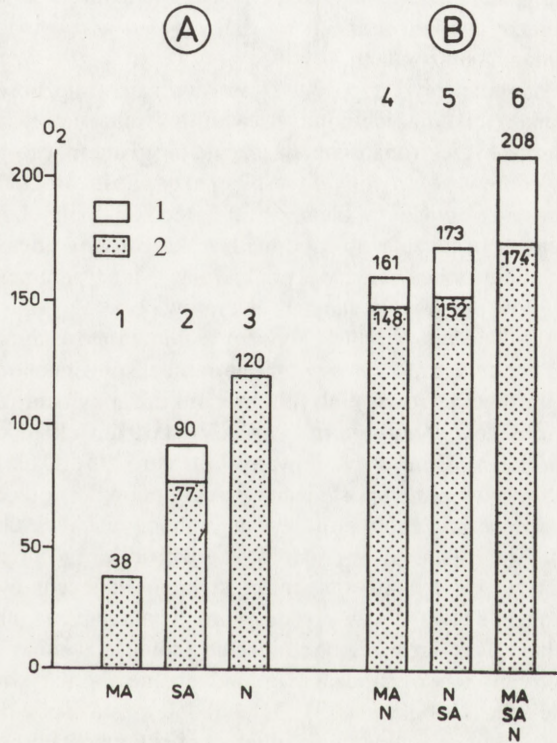
Takie kryterium udziału drogi alternatywnej w całkowitym oddychaniu można zastosować do mitochondriów ameby tylko w przypadku utleniania bursztynianu, ponieważ pozostałe



substraty – jabłczan i NADH w nieobecności KCN oddają elektrony wyłącznie na drogę cytochromową (rys. 3A). Częściowe hamowanie zużycia tlenu z bursztynianem jako substratem związane jest z równoczesnym podwyższaniem wartości KO z 2,1 do 2,4 i stosunku ADP/O z 1,4 do 1,7. Wyniki przekonują o udziale drogi alternatywnej w całkowitym oddychaniu mitochondriów ameby, gdy substratem jest bursztynian. Podobnie wyjątkową sytuację podczas utleniania bursztynianu, w porównaniu z innymi substratami, obserwowano w mitochondriach kotyledonów soi [8].

Mimo iż w mitochondriach ameby droga alternatywna według powyższego kryterium nie odbiera elektronów z jabłczanu lub NADH w nieobecności KCN, substraty te też mogą kierować elektrony na drogę alternatywną, jeżeli utleniane razem silnie zwiększają przepływ elektronów (rys. 3B, słupki 4). Według hipotezy Bahra i Bonnera [2] warunkiem ujawnienia się aktywności alternatywnej oksydazy w całkowitym oddychaniu jest "wysycenie" elektronami drogi cytochromowej w danym stanie oddechowym, a więc sytuacja, w której koenzym Q jest prawie w 100% zredukowany. Według takiej koncepcji ani utlenianie samego jabłczanu, ani utlenianie samego NADH w mitochondriach ameby nie spełnia tych warunków i dopiero łączne działanie obu substratów, podwyższając przepływ elektronów, umożliwia włączenie się drogi alternatywnej (rys. 3, słupki 1, 2 oraz 4). Jednakże nawet przy utlenianiu tej pary układ cytochromowy może jeszcze przyjąć więcej elektronów, gdy zostanie

dodany trzeci substrat – bursztynian (rys. 3, słupki 6), czego już koncepcją Bahra i Bonnera [2] nie można wytłumaczyć. Trudno też tą koncepcją wytłumaczyć fakt, że udział drogi alternatywnej w oddychaniu całkowitym ujawnia się podczas utleniania bursztynianu, chociaż szybkość tego utleniania jest niższa od szybkości utleniania samego NADH, w której droga alternatywna udziału nie bierze (rys. 3, słupki 2 i 3). Na fakt, że w mitochondriach ameby podczas utleniania bursztynianu droga cytochromowa w obecności SHAM najwidoczniej nie



Rys. 3. Udział drogi alternatywnej w całkowitym oddychaniu mitochondriów ameby w stanie 4 z różnymi substratami: A – substraty pojedyncze, B – substraty łączone, 1 –  $q_{Valt}$  – aktualny udział drogi alternatywnej w całkowitym oddychaniu (wyznaczony jako różnica cała pomiędzy oddychaniem w nieobecności inhibitorów, a oddychaniem drogą cytochromową w obecności SHAM), 2 –  $V_{cyt}$  – aktywność drogi cytochromowej (wyznaczona w obecności SHAM), MA – jabłczan; SA – bursztynian, N – NADH

wykorzystuje pełnych możliwości transportu elektronów w stanie 4, wskazuje również obserwacja, że dodanie następnego substratu, np. NADH, znacznie zwiększa zużycie tlenu w tych warunkach (rys. 3, słupki 2 i 5). Obie obserwacje sugerują, że podczas utleniania samego bursztynianu ubichinon zredukowany jest w mniejszym stopniu niż podczas utleniania samego NADH. Do włączenia drogi alternatywnej nie byłaby zatem konieczna całkowita redukcja ubichinonu, ale określony stopień redukcji ubichinonu niższy od redukcji całkowitej. Trudno jest jednak wyjaśnić, dlaczego ten krytyczny stopień redukcji ubichinonu miałby być wyższy w przypadku utleniania NADH niż bursztynianu. W każdym razie w nieobecności KCN taki krytyczny stopień redukcji musiałby być wyższy podczas utleniania NADH niż podczas utleniania bursztynianu.

Podobnie Day i wsp. [7, 17] potwierdzając zależność aktywności drogi alternatywnej od stopnia redukcji ubichinonu, zakwestionowali ostatnio konieczność "wysycenia" drogi cytochromowej elektronami dla włączenia drogi alternatywnej. Stwierdzili, że w mitochondriach kotyledonów soi (rośliny o wysokiej aktywności drogi alternatywnej) do uaktywnienia alternatywnej oksydazy wystarczy 60% redukcji puli ubichinonu [7]. Co więcej, autorzy ci sugerują, że na zależność pomiędzy aktywnością alternatywnej oksydazy a stanem redoks ubichinonu mogą mieć wpływ również i inne parametry kinetyczne, takie jak aktywność enzymów czy współdziałanie substratów [17].

Aktywność drogi alternatywnej w mitochondriach ameby próbowano zwiększyć prowadząc hodowle trofozoitów z inhibitorami ekspresji genomu mitochondrialnego (chloramfenikol i bromek etydyne) lub inhibitorami drogi cytochromowej (KCN i antymycyna A) [33]. Czynniki te indukują alternatywną oksydazę u wielu mikroorganizmów [41, 58] i w pewnych komórkach roślinnych hodowanych *in vitro* [35]. Okazało się, że w mitochondriach ameby inhibitory te silnie upośledzają wzrost hodowli i powodują zmiany w ultrastrukturze mitochondriów, szczególnie drastyczne w hodowlach z chloramfenikolem i bromkiem etydyne [26]. Nie zmieniają one jednak aktywności drogi alternatywnej, natomiast zwiększają jej udział w oddychaniu w wyniku osłabienia łańcucha cytochromowego [33]. Dzieje się tak niezależnie od tego, czy użyty czynnik działa poprzez inhibitory ekspresji genomu mitochondrialnego, czy też przez ograniczenie zdolności syntezy ATP w komórce.

Czynnikiem ograniczającym oddychanie alternatywne w mitochondriach ameby jest stężenie żelaza w pożywce [31, 32]. Niedobór żelaza powoduje zanik aktywności drogi alternatywnej przy początkowo niezmienionej aktywności drogi cytochromowej. Prawdopodobnie, gdy stężenie żelaza w pożywce jest zbyt niskie, żelazo zostaje najpierw wbudowywane w składniki łańcucha cytochromowego.

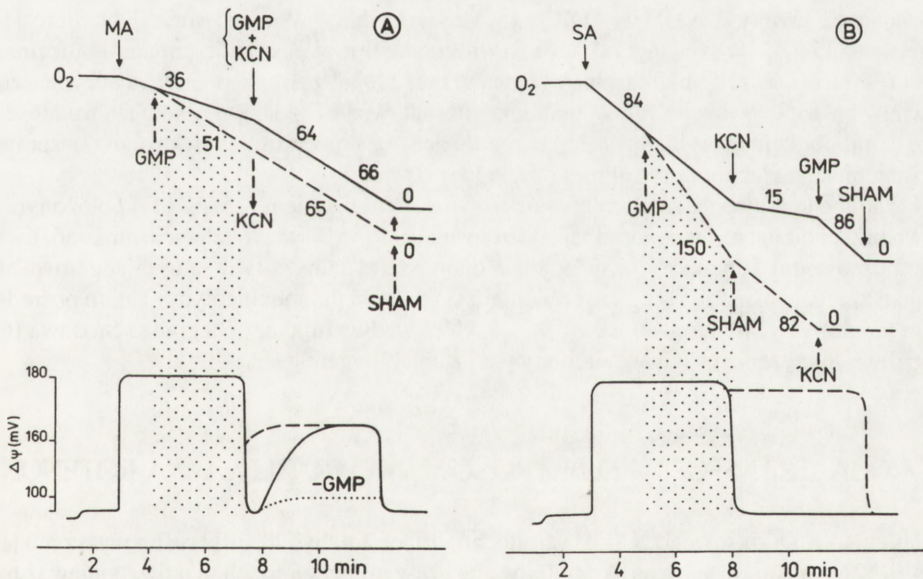
## STYMULACJA DROGI ALTERNATYWNEJ PRZEZ MONONUKLEOTYDY PURYNOWE

Oddychanie odporne na KCN stymulowane jest w mitochondriach ameby przez 5' -monofosforany nukleozydów: adeninowego [18, 22, 30, 31, 34], guaninowego i inozynowego [30, 34]. Identyczne działanie mononukleotydów obserwowano także w mitochondriach innych mikroorganizmów, takich jak *Euglena gracilis* [58], *Moniliella tomentosa* [23, 65], *Paramecium tetraurelia* [15] i *Neurospora crassa* [64]. Natomiast w mitochondriach roślin wyższych nie stwierdzono stymulacji drogi alternatywnej przez mononukleotydy [52].



W mitochondriach ameby maksymalny stopień stymulacji aktywności drogi alternatywnej w obecności KCN przez poszczególne mononukleotydy purynowe jest podobny (ok. 10-krotny) niezależnie od utlenianego substratu. Natomiast wartości  $K_m$  tej stymulacji są zróżnicowane, przy tej samej wartości  $V_{max}$  [30] i wynoszą dla: AMP – 0,6 mM, IMP – 0,2 mM, GMP – 30  $\mu$ M. Tak więc najefektywniejszym stymulatorem drogi alternatywnej u ameby okazał się GMP, podobnie jak u *N. crassa* [64]. Tymczasem w przypadku pantofelka [15] i *M. tomentos*a [65] najniższą spośród mononukleotydów wartość  $K_m$  stymulacji alternatywnego oddychania wyznaczono dla AMP – odpowiednio 120  $\mu$ M i 25  $\mu$ M. Z kolei u *E. gracilis* wartości te są jednakowe dla AMP i GMP – 100  $\mu$ M [60]. Porównanie tych danych wskazuje na odmienne powinowactwo poszczególnych mononukleotydów do drogi alternatywnej u różnych mikroorganizmów, natomiast regułą jest znacznie wyższa zdolność stymulacyjna mononukleotydów purynowych niż pirymidynowych [15, 30, 65].

Mononukleotydy stymulują transport elektronów drogą alternatywną zarówno przy wyłączeniu drogi cytochromowej (rys. 4A i B, linia ciągła), jak i podczas jej działania (rys. 4A i B, linia przerywana). To ostatnie jest szczególnie istotne, bowiem obecność mononukleotydów pozwala na udział w oddychaniu obu dróg oddechowych równocześnie i to nie tylko wtedy, kiedy substratem jest bursztynian (patrz rozdział poprzedni), ale także gdy jest nim jabłczan (rys. 4A, linia przerywana) lub egzogenny NADH. Tak więc możliwość stymulacji oddychania alternatywnego przez mononukleotydy ma duże znaczenie metodyczne, bowiem przy ich pomocy można sterować stopniem zaangażowania drogi alternatywnej w oddychaniu całkowitym, w nieobecności cyjanku.



Rys. 4. Stymulacja drogi alternatywnej w mitochondriach ameby przez GMP przy drodze cytochromowej wyłączonoj (linia ciągła) i początkowo nie wyłączonoj (linia przerywana, pole zakropkowane): A – jabłczan (MA), B – bursztynian (SA), dalsze objaśnienia w tekście

Przyspieszenie zużycia tlenu przez GMP nie wywiera wpływu na wysoką wartość  $\Delta\Psi$  generowanego przez główny łańcuch oddechowy, niezależnie od utlenianego substratu (rys. 4A i rys. 4B, linia przerywana, tło zakropkowane). Natomiast niski potencjał błonowy utrzymujący się w obecności KCN przy utlenianiu jabłczanu działaniem I miejsca sprzężenia (rys. 4A, linia kropkowana), zostaje przez GMP znacznie wzmożony (linia ciągła).

Zapis przebiegu tworzenia przedstawiony  $\Delta\Psi$  na rysunku 4A odzwierciedla proces skierowywania transportu elektronów z drogi cytochromowej na drogę alternatywną. W przypadku równoczesnego wyłączenia drogi cytochromowej przez KCN i pobudzenia drogi alternatywnej przez GMP  $\Delta\Psi$  nie powstaje od razu, a najwyższy w tych warunkach poziom osiąga dopiero po 1,5 minuty (linia ciągła). Tymczasem pobudzenie drogi alternatywnej przez GMP przed podaniem KCN skraca czas przestawienia całego transportu elektronów z drogi cytochromowej (po jej wyłączeniu) na alternatywną (rys. 4A, linia przerywana). Innymi słowy przepływ elektronów, który przed wejściem na drogę alternatywną przebiegał wyłącznie drogą cytochromową, wymaga dłuższego czasu na zmianę kierunku niż przepływ elektronów, który już przed wyłączeniem drogi cytochromowej wchodził częściowo na drogę alternatywną.

Mechanizm stymulacji transportu elektronów drogą alternatywną przez mononukleotydy pozostaje nadal nie wyjaśniony. Dotychczas ustalono tylko, że AMP funkcjonuje przy zewnętrznej powierzchni błony wewnętrznej. Jednym z dowodów na działanie AMP od zewnątrz jest obserwowana w mitochondriach pantofelka [14] i ameby [30] stymulacja drogi alternatywnej przez nieprzenikający przez błonę wewnętrzną mitochondrium kompleks AMP-agaroz. Poza tym sam AMP też nie przenika przez błonę wewnętrzną; u pantofelki sprawdzono, że radioaktywność  $^{14}\text{C}$ -AMP akumulowana jest w mitochondriach tylko w warunkach umożliwiających przejście AMP w ADP [14]. Vanderleyden i wsp. [63] oraz Doussiere [14] sugerowali, że AMP działając od zewnątrz mitochondriów powoduje zmianę konformacji nieokreślonego jeszcze białka błony wewnętrznej zlokalizowanego przy jej zewnętrznej powierzchni, a związanego funkcjonalnie z alternatywną oksydazą. Zasadniczą trudność w określeniu funkcji tego białka (białko regulujące, czy przenośnik elektronów?) sprawia nieznajomość molekularnej struktury drogi alternatywnej.

Ostatnio sugeruje się, że alternatywna oksydaza jest białkiem (35–37 kD) położonym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej od strony matriks [55]. Taka lokalizacja umożliwiałaby bezpośredni kontakt tej oksydazy z mononukleotydami, a tym samym sugerowałaby istnienie białka pośredniczącego w odbieraniu sygnału od mononukleotydu. Takim pośrednikiem mogłoby być białko – *engaging factor*, które według hipotezy Steginka i Siedowa [61] umożliwia sprzężenia oksydazy alternatywnej z ubiquinonem.

## DROGA TRANSPORTU ELEKTRONÓW NIEWRAŻLIWA NA ROTENON

Utlenianie matriksowego NADH w mitochondriach ameby [28, 30] i roślin wyższych [12, 48, 49, 62] okazało się bardziej skomplikowane niż w mitochondriach ssaków, ponieważ biorą w nim udział dwie dehydrogenazy NADH, obie umiejscowione w wewnętrznej błonie mitochondrialnej po jej matriksowej stronie. Jedna z dehydrogenaz jest odpowiednikiem klasycznego kompleksu I mitochondriów ssaków; charakteryzuje się ona wrażliwością na rotenon i piericydynę A oraz sprzężeniem transportu elektronów przy I miejscu fosforylacji oksydacyjnej. Natomiast druga dehydrogenaza jest niewrażliwa na inhibitory kompleksu I,



nie ma zdolności do translokacji protonów i dlatego droga przechodzących przez nią elektronów związana jest tylko z dwoma dalszymi miejscami fosforylacji (kompleks III i kompleks IV). O możliwości ominięcia przez elektrony kompleksu I w drodze do ubichinonu, świadczy częściowe tylko hamowanie przez rotenon i piericydynę A zużycie tlenu z substratami zależnymi od  $\text{NAD}^+$ . Tak więc niewrażliwa na rotenon i nieelektrogenna droga utleniania matriksowego NADH, tworząca tzw. obejście (*bypass*), może przebiegać równoległe do drogi wrażliwej na rotenon i elektrogennej. Obie te drogi redukują ubichinon, który może dalej oddawać elektrony znowu na dwie drogi oddechowe – cytochromową i alternatywną (rys. 1).

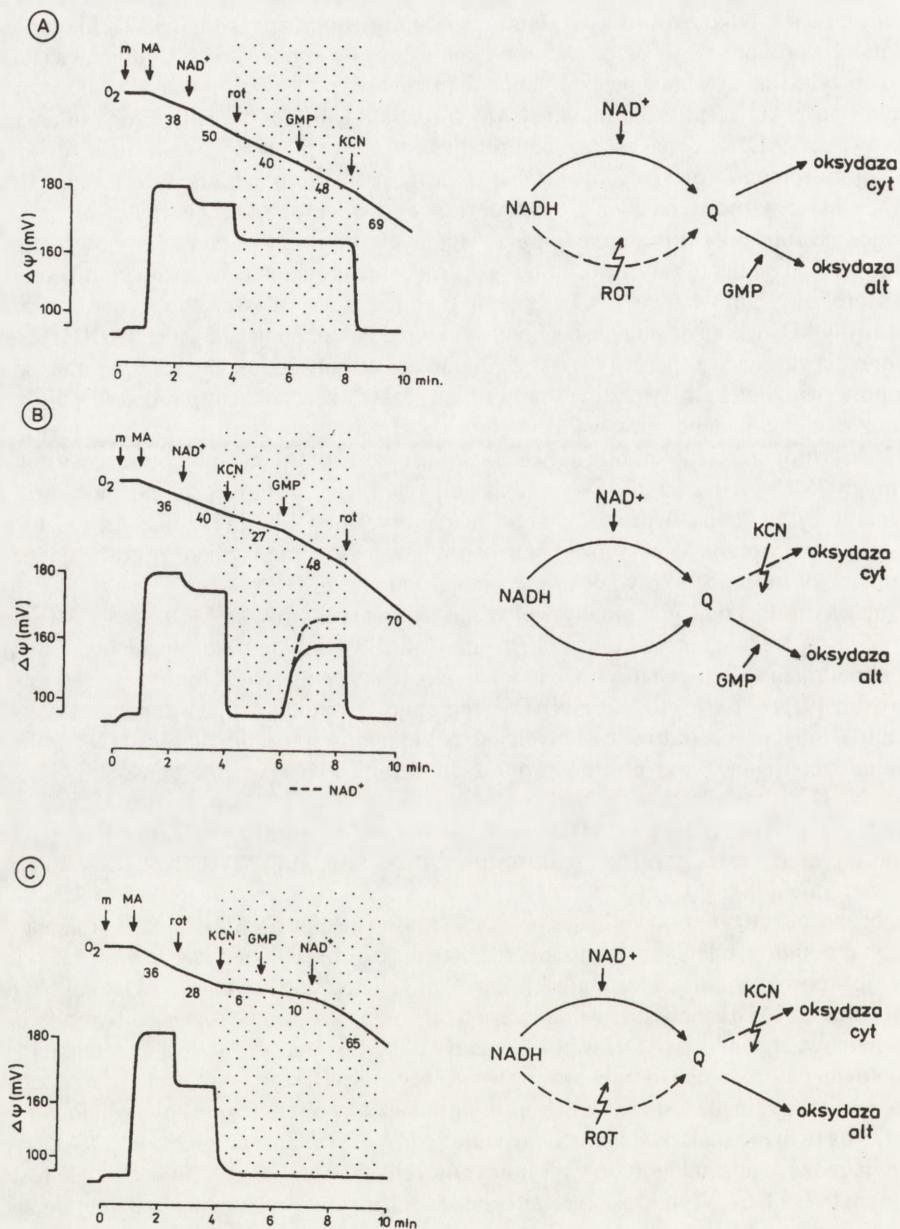
Wzajemne zależności i preferencje poszczególnych dróg transportu elektronów z matriksowego NADH do tlenu stały się ostatnio w energetyce mitochondriów roślin kontrowersyjnym i szeroko dyskutowanym zagadnieniem. Wyniknęło to zwłaszcza ze stwierdzenia, że egzogeny  $\text{NAD}^+$  wnikając do matriks i podwyższając mitochondrialną pulę NAD(H), może te preferencje znacząco zmienić [48, 62]. Poza faktem współistnienia dwóch dróg transportu elektronów, wrażliwej i niewrażliwej na rotenon, dalsze komplikacje wprowadza złożony mechanizm utleniania jabłczanu, w którym biorą udział dwa matriksowe enzymy generujące NADH: dehydrogenaza jabłczanowa (MDH) i zależny od  $\text{NAD}^+$  enzym jabłczanowy dekarboksylujący (ME) [9, 12, 62, 67]. Współdziałanie obu tych enzymów pozwala na całkowite utlenianie w cyklu Krebsa wprowadzonego anaplerotycznie jabłczanu, ponieważ szczawiooctan wytwarzany przez MDH może kondensować z acetylo-koenzymem A powstającym z pirogronianu dostarczanego równocześnie z jabłczanu przez ME.

W matriks mitochondriów ameby wykazano aktywność zarówno MDH, jak i ME oraz obecność bezpośrednich produktów obu enzymów [28]. Wyniki te wskazują na podobny jak w mitochondriach roślinnych mechanizm utleniania jabłczanu. Stwierdzono też, że podobnie jak u roślin [9, 48, 62] egzogeny  $\text{NAD}^+$  stymuluje w mitochondriach ameby utlenianie jabłczanu i innych substratów zależnych od nukleotydów pirymidynowych [28, 30]. W mitochondriach roślin wyższych zjawisko to zachodzi dzięki aktywnemu transportowi egzogenego  $\text{NAD}^+$  do matriks mitochondrialnej przy udziale specyficznego przenośnika [49, 62]. Transport cytoplazmatycznego  $\text{NAD}^+$  do mitochondriów ma istotne znaczenie dla regulacji aktywności MDH i ME, zależnej w dużej mierze od proporcji  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  w matriks mitochondrialnej [48].

W obecności rotenonu powodującego zwiększenie stosunku  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  zmienia się proporcja produktów utleniania jabłczanu; wzrasta ilość pirogronianu, a szczawiooctan redukowany jest powrotem do jabłczanu [62]. Zarazem zwiększenie stężenia NADH uaktywnia dehydrogenazę NADH niewrażliwą na rotenon, charakteryzującą się dziesięciokrotnie niższym powinowactwem do NADH w porównaniu z dehydrogenazą wrażliwą na rotenon [47].

Fizjologiczna rola dehydrogenazy wewnętrznej NADH niewrażliwej na rotenon w mitochondriach roślin nie jest znana. Sugeruje się jednak jej preferencyjne powiązanie z drogą alternatywną tworzącą całkowicie niefosforylującą drogę utleniania endogenego NADH, co umożliwia reoksydację nukleotydów pirymidynowych także przy wysokim potencjale fosforylacyjnym [47, 53, 67]. Tymczasem w mitochondriach ameby stwierdzono brak preferencyjnego kierowania elektronów z niewrażliwego na rotenon obejścia na drogę alternatywną [28], co ilustruje rysunek 5. Przykład ten zostanie omówiony szczegółowo, ponieważ sytuacja w mitochondriach ameb rzuca nowe światło na ten kontrowersyjny u roślin problem.

W obecności rotenonu, gdy nieelektrogenne obejście stymulowane dodatkowo przez  $\text{NAD}^+$ , jest jedyną drogą transportu elektronów z matriksowego NADH do ubichinonu, elektrony kierowane są nadal w dużej ilości na drogę cytochromową mimo stworzenia



Rys. 5. Współdziałanie dróg transportu elektronów z matriksowego  $NADH$  w mitochondriach ameb: MA – jablczan, rot – rotenon, objaśnienia w tekście



optymalnych możliwości funkcjonowania obu dróg oddechowych dzięki uaktywnieniu drogi alternatywnej przez GMP (rys. 5A, pion zakropkowany). Świadczy o tym brak obniżenia  $\Delta\Psi$  przez GMP (II i III miejsce sprzężenia utrzymują potencjał błonowy) przy niewielkim tylko przyspieszeniu zużycia tlenu. Dopiero podanie KCN uwalnia maksymalny przepływ elektronów drogą alternatywną i powoduje całkowite zniesienie potencjału. Równocześnie z rysunku 5A wynika, że dodanie  $\text{NAD}^+$  do mitochondriów utleniających jabłczan zwiększa zużycie tlenu i w niewielkim stopniu obniża potencjał generowany przez I miejsce sprzężenia. To nieznaczne obniżenie  $\Delta\Psi$  ilustruje stopień przesunięcia przepływu elektronów z kompleksu I na jego obejście. Za tym, że przesunięcie przez  $\text{NAD}^+$  przepływu elektronów z kompleksu I na obejście jest tylko częściowe, przemawia to, że rotenon powoduje dalsze obniżenie  $\Delta\Psi$ .

Obejście stymulowane przez  $\text{NAD}^+$  może funkcjonować równocześnie z drogą wrażliwą na rotenon także wtedy, gdy transport elektronów przebiega dalej wyłącznie drogą alternatywną (rys. 5B, pion zakropkowany). Świadczy o tym generowanie dość wysokiego poziomu  $\Delta\Psi$  przez I miejsce sprzężenia, gdy po zahamowaniu przez KCN drogi cytochromowej, GMP uaktywnia drogę alternatywną. Dopiero podanie rotenonu powoduje zniesienie  $\Delta\Psi$  w związku z przesunięciem wszystkich elektronów na obejście. Równoległe przyspieszenie zużycia tlenu przez rotenon odzwierciedla zniesienie kontroli nałożonej uprzednio na transport elektronów przez I miejsce sprzężenia.

Równoczesne wyłączenie I miejsca sprzężenia przez rotenon i łańcucha cytochromowego przez KCN (rys. 5C) pozostawia tylko jedną możliwość, mianowicie transport elektronów drogą prowadzącą przez obejście do alternatywnej oksydazy (pion zakropkowany). Transport elektronów via obejście jest wtedy słaby nawet w obecności GMP i dopiero dodanie  $\text{NAD}^+$  pozwala na pełny w tych warunkach przepływ elektronów. Świadczy to o niezależności dwóch procesów w mitochondriach ameby: 1) stymulacji przez  $\text{NAD}^+$  transportu elektronów via obejście niewrażliwe na rotenon i 2) stymulacji przez GMP transportu elektronów drogą alternatywną.

W odróżnieniu od mitochondriów roślin, w mitochondriach ameby w obecności  $\text{NAD}^+$  nie zaznacza się więc wyraźny podział na fosforylujący i niefosforylujący szlak transportu elektronów z dehydrogenaz wewnętrznego NADH do tlenu. Obejście niewrażliwe na rotenon może współpracować zarówno z drogą alternatywną, jak i cytochromową. Zarazem GMP stymuluje transport elektronów drogą alternatywną bez względu na to, czy elektrony pochodzą z kompleksu I, czy z niesprężonej z fosforylacją oksydacyjną dehydrogenazy NADH niewrażliwej na rotenon (obejście) (rys. 5).

Natomiast w mitochondriach roślin, w których GMP i inne nukleotydy nie są stymulatorami drogi alternatywnej [52], stwierdzono, że AMP stymuluje aktywność właśnie dehydrogenazy NADH wrażliwej na rotenon, która oddaje elektrony wyłącznie na drogę cytochromową [51]. Co więcej, stymulacja przez AMP powoduje hamowanie aktywności dehydrogenazy NADH niewrażliwej na rotenon, współpracującej wyłącznie z drogą alternatywną. W ten sposób stężenie cytoplazmatycznego AMP decydując przez którą z dehydrogenaz przepłyną aktualnie elektrony pośrednio wpływa na włączenie lub wyłączenie alternatywnej oksydazy *in vivo* [51].

Obserwowane w mitochondriach roślinnych powiązania funkcjonalne kompleksu I wyłącznie z drogą cytochromową oraz dehydrogenazy wewnętrznego NADH niewrażliwej na rotenon wyłącznie z drogą alternatywną, pozwalają na utleniania nadmiaru endogennego NADH drogą całkowicie niefosforylującą [12, 45]. Taki system pozwala komórce na szybkie oddychanie w stanie 4, nawet przy wysokim ładunku energetycznym [10, 43, 67]. Prawdopo-

dobnie system ten umożliwia nieskrępowane wysoką siłą protonomotoryczną dostarczanie przez metabolizm mitochondrialny szkieletów węglowych dla reakcji anabolicznych [53, 67].

Pomimo tego ogólnego schematu w mitochondriach pewnych roślin nie posiadających alternatywnej oksydazy obejście niewrażliwe na rotenon może przekazywać elektrony na drogę cytochromową, przy zachowaniu siły protonomotorycznej [10]. Day i wsp. [10] sugerują, że transport elektronów przez obejście obniża ogólny stosunek  $H^+/2e^-$  i pozwala na szybki przepływ elektronów w obecności wysokiej  $\Delta\mu_{H^+}$ , której termodynamiczny wpływ na stan równowagi redoks pomiędzy NAD(H) a ubichinonem zostaje w tych warunkach ograniczony. Podobny efekt termodynamiczny możliwy jest w mitochondriach ameby dzięki współpracy obejścia z obiema drogami oddechowymi.

## UTLENIANIE EGZOGENNEGO NADH

Zdolność do utleniania egzogenego NAD okazała się następną wspólną cechą mitochondriów ameby [27, 30] i roślin wyższych [45, 46, 52, 53] nie obserwowaną w mitochondriach ssaków. W obu typach organizmów utlenianie egzogenego NADH przebiega identycznie; jest szybsze niż utlenianie substratów cyklu Krebsa, prowadzi do syntezy dwóch cząsteczek ATP i nie wykazuje wrażliwości na rotenon, natomiast hamowane jest przez antymycynę A oraz KCN. Aktywność dehydrogenazy zewnętrznego NADH w mitochondriach roślin jest jednak silnie kontrolowana przez jony  $Ca^{2+}$  [46, 54], podczas gdy w mitochondriach ameby jony  $Ca^{2+}$  są tylko bardzo słabymi stymulatorami tej dehydrogenazy [50].

W mitochondriach większości gatunków roślinnych transport elektronów z egzogenego NADH, w przeciwieństwie do tegoż z substratów cyklu Krebsa, wykazuje o wiele silniejsze powinowactwo do drogi cytochromowej niż do drogi alternatywnej [40, 45, 46]. Wyjątek stanowią mitochondria tkanek termogennych (np. u *Araceae*), w których dostępność drogi alternatywnej jest taka sama dla elektronów z NADH, jak dla elektronów z innych substratów [40, 45].

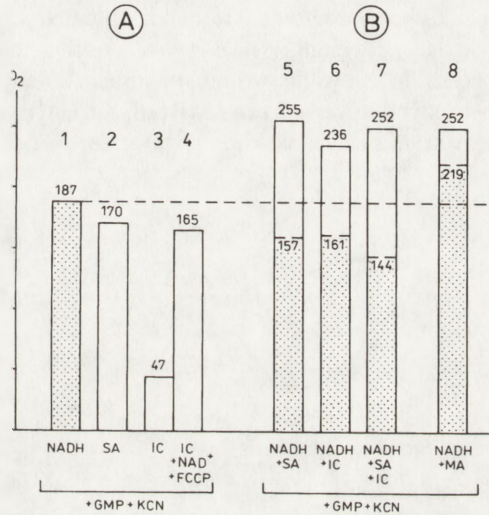
Taki nierównomierny, zależny od rodzaju substratu przepływ elektronów po obu drogach oddechowych w mitochondriach roślin trudno jest pogodzić z tzw. "modelem Q" Krögera i Klingenberg [37] zakładającym, że homogenna, ruchoma pula ubichinonu jest jednakowo dostępna dla wszystkich dehydrogenaz i oksydaz. Ten model – adekwatny do sytuacji w mitochondriach ssaków – nie tłumaczy mechanizmu rozdzielania elektronów pomiędzy komponenty rozgałęzionego łańcucha oddechowego zakończonego dwoma terminalnymi oksydazami i związanego z różnymi drogami utleniania matriksowego i egzogenego NADH [7, 43, 45]. Dlatego zaproponowano kilka odmiennych rozwiązań opartych na koncepcji oddzielnych pul ubichinonu związanych funkcjonalnie albo z różnymi dehydrogenazami, albo z różnymi oksydazami [6, 7, 24, 40, 51, 66]. Jednak nadal nie wyklucza się możliwości istnienia homogennej puli ubichinonu przy założeniu, że w mitochondriach roślin wolniejsze utlenianie egzogenego NADH niż innych substratów może być spowodowane dłuższą drogą dyfuzji ubichinonu pomiędzy alternatywną oksydazą a dehydrogenazą zewnętrznego NADH, w porównaniu z drogą dyfuzji pomiędzy tą oksydazą a kompleksem II i kompleksem I [44]. Za istnieniem homogennej puli ubichinonu przemawiają także wyniki badań, stwierdzające stymulację utleniania NADH przez substraty cyklu Krebsa [1, 4, 7, 8, 45, 66]. Z drugiej strony analiza zależności pomiędzy aktywnością alternatywnej oksydazy, a stanem redoks ubichino-



nu podczas utleniania NADH, bursztynianu i jabłczanu przeprowadzona ostatnio w tych samych mitochondriach, wskazuje raczej na heterogenność puli ubichinonu [7]. Tak więc problem ten jest nadal otwarty.

W mitochondriach ameby, odmiennie niż w przypadku większości roślin, elektrony z egzogenego NADH mają w obecności KCN równie łatwy dostęp do drogi alternatywnej jak elektrony z jabłczanu lub bursztynianu [29], niezależnie od obecności GMP (rys. 2 i rys. 6A). Niższe zużycie tlenu z substratami zależnymi od  $\text{NAD}^+$ , takimi jak jabłczan (rys. 2) czy izocytrynian (rys. 6A, słupek 3), wynika z kontroli transportu elektronów wywieranej przez I miejsce sprzężenia. Zniesienie tej kontroli przez rozpręszczacz, np. FCCP, oraz stymulacja niewrażliwego na rotenon obciążenia kompleksu I przez NAD (rys. 6A, słupek 4) pozwala osiągnąć z tymi substratami szybkość zużycia tlenu zbliżoną do tej z pozostałymi substratami (rys. 6A, słupki 1,2).

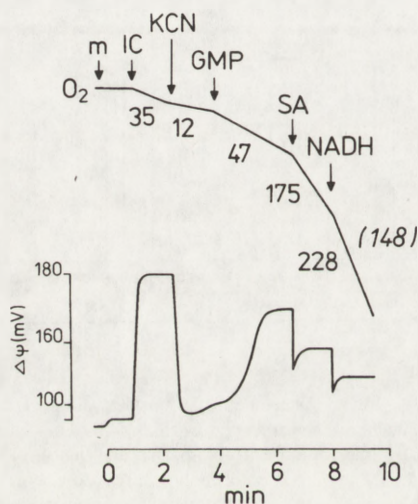
Natomiast w nieobecności KCN, podobnie jak u roślin, elektrony z NADH kierowane są w mitochondriach ameby wyłącznie na drogę cytochromową (rys. 3). Jednakże w tych warunkach elektrony z jabłczanu też nie są odbierane przez drogę alternatywną, co można tłumaczyć zbyt niskim stopniem redukcji ubichinonu wynikającym z tego, że przepływ elektronów podczas utleniania jabłczanu jest wolniejszy niż podczas utleniania bursztynianu. Przyjęcie proponowanej dla mitochondriów roślinnych koncepcji przeciwstawienia NADH substratom cyklu Krebsa jest więc w przypadku mitochondriów ameby niemożliwe, ponieważ w obecności GMP zarówno jabłczan i bursztynian (rys. 4A i B – linia przerywana, pion zakropkowany), jak i NADH [30] oddają elektrony na drogę alternatywną mimo aktywnej równocześnie drogi cytochromowej. Wydaje się więc, że stopień redukcji ubichinonu nie jest w mitochondriach ameby jedynym czynnikiem decydującym o kierowaniu elektronów na drogę alternatywną. Prawdopodobnie dużo większe znaczenie ma pobudzenie drogi alternatywnej przez GMP. Na podstawie dotychczasowych wyników nie można jednak rozstrzygnąć czy pula ubichinonu w mitochondriach ameby jest homogenna czy heterogenna. Wprawdzie brak dostępu do drogi alternatywnej dla elektronów z NADH w oddychaniu niehamowanym sugeruje istnienie odrębnych pul ubichinonu dla elektronów z NADH i bursztynianu, które ten dostęp mają, ale w obecności GMP elektrony z obu substratów łatwo wprowadzane są na drogę alternatywną. Także zahamowanie aktywności drogi cytochromowej w mitochondriach ameby pozwala na jednakowe utlenianie wszystkich substratów przez drogę alternatywną.



Rys. 6. Równoczesne utlenianie substratów oddechowych w mitochondriach ameby: pola zakropkowane – zużycie NADH mierzone spektrofotometrycznie (nmole  $\text{NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  białka) jednocześnie ze zużyciem tlenu ( $\text{nAtO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  białka) mierzonym amperometrycznie, SA – bursztynian, IC – izocytrynian, MA – jabłczan

W warunkach B (rys. 6B) zużycie tlenu jest znacznie wyższe niż w warunkach A (rys. 6A). W warunkach B (rys. 6B) zużycie tlenu jest znacznie wyższe niż w warunkach A (rys. 6A).

Zdolność mitochondriów ameby do utleniania NADH z szybkością porównywalną z szybkością utleniania pozostałych substratów zbiega się z brakiem stymulacji utleniania NADH przez substraty cyklu Krebsa (rys. 6B), które to zjawisko zaobserwowano w mitochondriach roślin [1, 4, 7, 8, 45, 66] przypisując mu duże znaczenie. Pomiar spektrofotometryczne wykazały, że w mitochondriach ameby podczas równoczesnego utleniania NADH z bursztynianem lub izocytrynianem, albo z obydwoma substratami razem, utlenianie NADH jest niższe (rys. 6B, słupki 5, 6, 7) od zużycia tlenu obserwowanego podczas utleniania samego NADH (rys. 6A, słupki 1). Ponadto we wszystkich trzech układach substratów udział NADH w oddychaniu jest bardzo zbliżony (rys. 6B, słupki 5, 6). Wprawdzie przy utlenianiu pary NADH z jabłczanem obserwuje się spektrofotometrycznie podobną jak u roślin [1, 4, 7, 8, 45, 66] stymulację utleniania NADH w obecności jabłczanu (rys. 6B, słupki 8), ale stymulacja ta jest pozorna. Mianowicie, w mitochondriach ameby podczas utleniania jabłczanu drogą alternatywną stymulowaną przez AMP [28] lub GMP (wyniki nie opublikowane) obok pirogronianu pojawia się znaczna ilość szczawiooctanu, w przeciwieństwie do sytuacji, w której aktywność drogi alternatywnej nie jest stymulowana. Tak więc, stymulacja utleniania egzogenego NADH przez jabłczan jest wynikiem zużycia NADH do redukcji szczawiooctanu przez MDH w przestrzeni międzybłonowej. W mitochondriach ameby szczawiooctan generowany w matriksie przechodzi przez wewnętrzną błonę mitochondrialną na zewnątrz [28]. Efekt ten znika, gdy przy łącznym utlenianiu substratów jabłczan zastąpi się izocytrynianem, bowiem produkty jego utleniania tej komplikacji nie powodują (rys. 6, słupki 6, 7).



Rys. 7. Konkurencja elektronów wprowadzanych na drogę alternatywną z różnych substratów widoczna jako obniżanie generowanego przez I miejsce sprzężenia: cyfra w nawiasie oznacza zużycie NADH (w nmolach  $\cdot$  min $^{-1}$   $\cdot$  mg $^{-1}$  białka) mierzone spektrofotometrycznie

tometrycznych wynika, że w tych warunkach udział elektronów z NADH w końcowej fazie oddychania wynosi aż 60%, co zarazem dowodzi silnej konkurencyjności NADH przy wprowadzeniu elektronów na tor alternatywny.

Przedstawione problemy są interesujące z tego względu, że mitochondria prawdopodobnie utleniają substraty równocześnie *in vivo*. W przypadku mitochondriów roślinnych sugeruje się wręcz regulację utleniania cytoplazmatycznego NADH w mitochondriach przez substraty cyklu Krebsa [12].



## UWAGI KOŃCOWE

W mitochondriach ameby *A. castellanii* wykryto większość cech charakterystycznych dla mitochondriów roślinnych, a niespotykanych u ssaków (tab. 1, 1–4). W przypadku innych mikroorganizmów dotychczas obszernie opisano tylko alternatywną drogę oddechową niewrażliwą na KCN i zdolność mitochondriów do utleniania egzogenego NADH (tab. 1).

Z kolei wspólną cechą mitochondriów ameby i innych pierwotniaków oraz drożdży i grzybów, różniącą je od mitochondriów roślin wyższych jest stymulacja drogi alternatywnej przez mononukleotydy purynowe (tab. 1), które prawdopodobnie są cytoplazmatycznym czynnikiem regulującym aktywność drogi alternatywnej *in vivo*.

TABELA 1. Zestawienie cech mitochondriów ameby z cechami mitochondriów roślin wyższych i mikroorganizmów

Cechy mitochondriów	Ameba	Rośliny wyższe	Mikroorganizmy
1. Droga alternatywna niewrażliwa na KCN	+ [19–21,30,31]	+ [12,39,40,45,57]	+ [16,25,36,41]
2. Obejście kompleksu I niewrażliwe na rotenon	+ [28,30]	+ [12,48,49,62]	?
3. Dehydrogenaza zewnętrznego NADH	+ [27,30]	+ [45,46,53,54]	+ [41]
4. Utleniania jabłczanu przez matriksowe MDH i ME	+ [28,30]	+ [12,45,46,62]	?
5. Stymulacja drogi alternatywnej przez mononukleotydy purynowe	+ [18,22,30,34]	– [52]	+ [15,23,58,64,65]

Zdefiniowanie roli dróg transportu elektronów funkcjonujących obok głównego łańcucha oddechowego napotyka na trudności pomimo znacznej ilości informacji doświadczalnych. Dotyczy to również fizjologicznej roli utleniania egzogenego NADH oraz skomplikowanego mechanizmu utleniania jabłczanu. Najwięcej danych uzyskano o drodze alternatywnej. Wskazują one na różnorakie znaczenie tej drogi, szczególnie w przypadku roślin wyższych [38, 39, 40, 56]. Na podstawie tych danych można jednak dojść do pewnego uogólnienia. Obecnie najczęściej przyjmuje się, że droga alternatywna wyzwala transport elektronów spod kontroli potencjału fosforylacyjnego komórki [12, 40, 54], co umożliwi usuwanie siły redukcyjnej w sytuacjach, gdy jej nadmiar blokuje odpowiednie szlaki metaboliczne. Ubocznym, a w szczególnych przypadkach wręcz fizjologicznym dla roślin znaczeniem drogi alternatywnej jest efekt działania termogeniny (białko rozprzegające) w mitochondriach ssaków.

Znacznie mniej wiadomo o roli fizjologicznej obejścia niewrażliwego na rotenon, a szczególnie o jego rzeczywistym udziale w oddychaniu *in vivo* [12, 39]. Ostatnio niektórzy autorzy sugerują, że obejście może być podobnie jak droga alternatywna konstytutywną cechą mitochondriów roślinnych umożliwiającą szybkie oddychanie w stanie 4 przy wysokim potencjale fosforylacyjnym komórki [43].

W komórkach zwierzęcych siła redukcyjna zasadniczo usuwana jest z cytoplazmy przez układy wahadłowe: glicerolo-3-fosforanowy i jabłczano-asparaginianowy. Tymczasem dzięki zdolności do bezpośredniego utleniania cytoplazmatycznego NADH i równoległej aktywności drogi alternatywnej, komórki roślin wyższych [45, 46, 53, 54] i mikroorganizmów [41] mają możliwość bezpośredniego usuwania ekwiwalentów redukcyjnych z cytoplazmy (a więc odblokowania glikolizy), całkowicie uwolnionego od kontroli ze strony potencjału fosforylacyjnego.

Jabłczan dzięki łatwości, z jaką przechodzi przez błony organelli oraz zaangażowaniu w różne reakcje anaplerotyczne i mechanizmy wahadłowe, pełni w komórkach roślinnych funkcję ruchomej siły redukcyjnej [40, 67]. Nadmiar tej siły redukcyjnej może zostać łatwo usunięty działaniem enzymu jabłczanowego współpracującego z niewrażliwym na rotenon obęjskiem kompleksu I niefosforylującą, alternatywną drogą oddechową, bez kontroli ze strony potencjału fosforylacyjnego czy ładunku energetycznego komórki [12, 40, 54, 67].

Porównanie energetyki mitochondriów ameby i roślin wyższych ujawniło przy uderzającym podobieństwie, także i pewne różnice w funkcjonowaniu rozgałęzionego łańcucha oddechowego (np. w dostępie elektronów z egzogenego NADH do drogi alternatywnej). Prawdopodobnie wynikają one ze specyfiki metabolizmu. Nie bez znaczenia jest też fakt, że przeprowadzone w tym artykule porównanie dotyczy organizmu jednokomórkowego pochodzącego z hodowli aksenicznych i organizmów tkankowych, żyjących w rozmaitych, czasem ekstremalnie różnych warunkach. Jednak rozpatrując – w aspekcie ogólnego metabolizmu – znaczenie niefosforylujących dróg transportu elektronów i ich powiązania z bezpośrednim utlenianiem cytoplazmatycznego NADH oraz z metabolizmem jabłczanu można przyjąć, że drogi te pełnią podobne funkcje w komórce ameby jak w komórkach roślin wyższych.

## LITERATURA

- [1] AZCON-BIETO J, SALOM CL, MACKIE ND, DAY DA. The regulation of mitochondrial activity during greening and senescence of soybean cotyledons. *Plant Physiol Biochem* 1989; **27**: 827–836.
- [2] BAHR JT, BONER WD. Cyanide - insensitive respiration. II. Control of the alternate pathway. *J Biol Chem* 1973; **248**: 3446–3450.
- [3] BARANOWSKI Z. Consequences of impeding in mitochondrial functions in *Physarum polycephalum*. III. Reversible cessation of the contraction-relaxation cycle and the temperature sensitivity of the alternate respiratory pathway. *Eur J Cell Biol* 1985; **39**: 283–289.
- [4] BRYCE JH, AZCON-BIETO J, WISKICH JT, DAY DA. Adenylate control of respiration in plants: the contribution of rotenone-insensitive electron transport to ADP-limited oxygen consumption by soybean mitochondria. *Physiol Plantarum* 1990; **78**: 105–111.
- [5] BYERS TJ. Growth, reproduction, and differentiation in *Acanthamoeba*. *Int Rev Cytol* 1979; **61**: 283–337.
- [6] COTTINGHAM IR, MOORE AL. Ubiquinone pool behaviour in plant mitochondria. *Biochem Biophys Acta* 1983; **724**: 191–200.
- [7] DAY DA, DRY IB, SOOLE KL, WISKICH JT, MOORE AL. Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria. *Plant Physiol* 1991; **95**: 948–953.
- [8] DAY DA, MOORE AL, DRY IB, WISKICH JT, AZCON-BIETO J. Regulation of nonphosphorylating electron transport pathways in soybean cotyledon mitochondria and its implications for fat metabolism. *Plant Physiol* 1988; **86**: 1199–1204.
- [9] DAY DA, NEUBURGER M, DOUCE R. Activation of NAD - linked malic enzyme in intact plant mitochondria by exogenous coenzyme A. *Arch Biochem Biophys* 1984; **231**: 233–242.



- [10] DAY AA, WISKICH JT, BRYCE JH, DRY IB. Regulation of ADP-limited respiration in isolated plant mitochondria. *Plant Mitochondria; Structural, Functional and Physiological Aspects*. AL Moore and RB Beechy (eds.) Plenum Press, New York 1987: 59–66.
- [11] DOMKA-POPEK A, MICHEJDA J. The uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  by mitochondria of amoeba supported by malate or ATP. *Bull Soc Amis Lett Poznań* 1986; **D-25**: 5–13.
- [12] DOUCE R, NEUBURGER M. The uniqueness of plant mitochondria. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1989; **40**: 371–414.
- [13] DOUGLAS SE, MURPHY CA, SPENCER DF, GRAY MW. Cryptomonad algae are evolutionary chimeras of two phylogenetically distinct unicellular eucariotes. *Nature* 1991; **350**: 148–151.
- [14] DOUSSIERE J. Respiration cyano-résistance des mitochondries de *Paramecium tetraurelia*. These pour obtenir le grade de docteur Sciences Naturelles. Université Scientifique et Médicale de Grenoble. 1982.
- [15] DOUSSIERE J, VIGNAIS PV. AMP-dependence of the cyanide-insensitive pathway in the respiratory chain of *Paramecium tetraurelia*. *Biochem J* 1984; **220**: 787–794.
- [16] DRABIKOWSKA AK. Oddychanie niewrażliwe na cyjanek. *Postępy Biochem* 1978; **24**: 59–74.
- [17] DRY JB, MOORE AL, DAY DA, WISKICH JT. Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria: nonlinear relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool. *Arch Biochem Biophys* 1989; **273**: 148–157.
- [18] EDWARDS SW, LLOYD D. Changes in oxygen uptake rates, enzyme activities, cytochrome amounts and adenine nucleotide pool levels during growth of *Acanthamoeba castellanii* in batch culture. *J Gen Microbiol* 1977; **102**: 135–144.
- [19] EDWARDS SW, LLOYD D. Cyanide-insensitive respiration in *Acanthamoeba castellanii*. Changes in sensitivity of whole cell respiration during exponential growth. *J Gen Microbiol* 1977; **103**: 207–213.
- [20] EDWARDS SW, LLOYD D. Cyanide insensitive respiration in *Acanthamoeba castellanii*. [w] Function of alternative terminal oxidases. (red.) Degn H, Lloyd D, Hill GC, 1978a; 31–37.
- [21] EDWARDS SW, LLOYD D. Properties of mitochondria isolated from cyanide-stimulated and cyanide-sensitive cultures of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochem J* 1978; **174**: 203–211.
- [22] EDWARDS SW, LLOYD D. Oscillations of respiration and adenine nucleotides in synchronous cultures of *Acanthamoeba castellanii*; Mitochondrial respiratory control in vivo. *J Gen Microbiol* 1978; **108**: 197–204.
- [23] HANSENS L, VERACHTERT H. Adenosine 5'-monophosphate stimulated cyanide-insensitive respiration in mitochondria of *Moniliella tomentosa*. *J Bacteriol* 1976; **125**: 829–836.
- [24] HEMRIKA-WAGNER AM, GUDE H, MARISSSEN N, VAN DER PLAS LHW, WERLEUR JD. Compartmentation of alternative oxidase in plant mitochondria. *Plant Cell Physiol* 1986; **27**: 499–503.
- [25] HENRY MP, NYNS EJ. Cyanide-insensitive respiration. An alternative mitochondrial pathway. *Sub-Cell Biochem* 1975; **4**: 1–65.
- [26] HRYNIEWIECKA L. Effect of chloramphenicol and ethidium bromide on bioenergetics of mitochondria of *Acanthamoeba castellanii* Neff. *Bull Soc Amis Sci Lett Poznań* 1979; **D-19**: 25–35.
- [27] HRYNIEWIECKA L. Electron transport and oxidative phosphorylation in mitochondria of *Acanthamoeba castellanii* Neff from cultures of slow growth. *Bull Soc Amis Sci Lett Poznań* 1980; **D-20**: 15–26.
- [28] HRYNIEWIECKA L. Malate oxidation in mitochondria of *Acanthamoeba castellanii* Neff. *Bull Soc Amis Sci Lett Poznań* 1986; **D-25**: 15–31.
- [29] HRYNIEWIECKA L. Electrons from external NADH reveal free access to the alternative respiratory pathway in amoeba mitochondria. *EBEC Reports* 1988; **V**: 285.
- [30] HRYNIEWIECKA L. Tor alternatywny w mitochondriach ameby (*Acanthamoeba castellanii* Neff). Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu, seria biologiczna nr 38. Wydawnictwo Naukowe, Poznań 1988; 1–131.
- [31] HRYNIEWIECKA L, JENEK J, MICHEJDA J. Cyanide resistance in soil amoeba *Acanthamoeba castellanii*. [w] *Plant Mitochondria*. (red) Duced G, Lance C, Elsevier/North Holland, Amsterdam 1978; 307–314.
- [32] HRYNIEWIECKA L, JENEK J, MICHEJDA J. Necessity of iron for the alternative respiratory pathway in *Acanthamoeba castellanii*. *Biochem Biophys Res Comm* 1980; **93**: 142–147.
- [33] HRYNIEWIECKA L, KRÓLIKOWSKA R. Can the alternative respiratory pathway in *Acanthamoeba castellanii* be stimulated by agents controlling the respiratory pathways in culture. *Bull Soc Amis Sci Lett* 1986; **D-26**: 11–23.
- [34] HRYNIEWIECKA L, MICHEJDA J. In amoeba mitochondria phosphate mononucleosides stimulate specifically the alternative respiratory pathway but not the rotenone-sensitive NADH dehydrogenase. *EBEC Reports* 1988; **V**: 286.
- [35] KLERK-KIEBERT JM, KNEPPSERS TJA, VAN DER PLACE LHW. Influence of chloramphenicol on growth and respiration of soybean (*Glycine max L.*) suspension cultures. *Physiol Plant* 1982; **55**: 98–102.
- [36] KRAEPELIN G. Bypass respiration: Biological significance and evolutionary implications. *Endocytobiol* 1983; **II**: 291–302.

- [37] KROGER A, KLINGENBERG M. The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to the electron-transport activity in the respiratory chain. *Eur J Biochem* 1973; **34**: 358–368.
- [38] LAMBERS H. Respiration in intact plants and tissues: Its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organism. [w] *Encyclopedia of Plant Physiology*, (red.) Douce R, Day DA, Springer Verlag, Berlin 1985: 418–473.
- [39] LAMBERS H, RYCHTER AM. The biochemical background of variation in respiration rate: respiratory pathways and chemical composition causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants. (red.) Lambers H et al. SPB Academic Publishing bv. The Hague, 1989: 199–225.
- [40] LANCE C, CHAUVEAU M, DIZENGREMEL P. The cyanide-resistant pathway of plant mitochondria. [w] *Encyclopedia of Plant Physiology: Higher Plant Cell Respiration*. (red.) Douce R, Day DA, Springer Verlag, Berlin-New York 1985; **8**: 202–247.
- [41] LLOYD D. The mitochondria of microorganisms. Academic Press London-New York 1974.
- [42] MITCHELL P. Chemiosmotic coupling in oxidative phosphorylation. *Biol Rev* 1966; **41**: 445–502.
- [43] MOORE AL, DRY IB, WISKICH JT. Regulation of electron transport in plant mitochondria under state 4 conditions. *Plant Physiol* 1991; **95**: 34–40.
- [44] MOORE AL, RICH PR. Organisation of the respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Encyclopedia of Plant Physiology: Higher Plant Cell Respiration*. (red.) Douce R, Day DA, Springer Verlag, Berlin- New York 1985; **6**: 134–172.
- [45] MOORE AL, SIEDOW JM. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1059**: 121–140.
- [46] MOLLER IM, LIN W. Membrane-bound NAD/P/H dehydrogenases in higher plant cells. *Ann Rev Plant Physiol* 1986; **37**: 309–334.
- [47] MOLLER JP, PALMER JM. Direct evidence for the presence of a rotenone resistant NADH-dehydrogenase on the inner surface of the inner-membrane of plant mitochondria. *Physiol Plant* 1982; **54**: 267–274.
- [48] NEUBERGER M, DAY DA, DOUCE R. The regulation of malate oxidation in plant mitochondria by the redox state of endogenous pyridine nucleotides. *Physiol Veg* 1984; **571**–580.
- [49] NEUBERGER M, DAY DA, DOUCE R. Transport of NAD<sup>+</sup> in percoll purified potato tuber mitochondria: Inhibition of NAD<sup>+</sup> influx and efflux by N-4-azido-2-nitrophenyl-4-aminobutryl-3'-NAD<sup>+</sup>. *Plant Physiol* 1985; **78**: 405–410.
- [50] NOWICKA J, MICHEJDA J. Oxygen uptake supported by the exogenous NADH in mitochondria of *Acanthamoeba castellanii* Neff. *Bull Soc Amis Sci Lett Poznań* 1986; **D-25**: 35–46.
- [51] PALMER JM. The "uniqueness" of plant mitochondria. *Biochem Soc Trans* 1979; **7**: 246–252.
- [52] PALMER JM. Cyanide-resistant respiration in eukaryotic cells. [w] *Cyanide in Biology*. (red.) Vennesland B, Conn EE, Knowles CJ, Westley J, Wissing F. Academic Press 1981; 437–449.
- [53] PALMER JM, MOLLER IM. Regulation of NAD/P/H dehydrogenases in plant mitochondria. *Trends Biochem Sci* 1982; **7**: 258–261.
- [54] PALMER JM, WARD JA. The oxidation of NADH by plant mitochondria. [w] *Encyclopedia of Plant Physiology: Higher Plant Cell Respiration* (red.) Douce R, Day DA. Berlin, New York, Springer Verlag, 1985; **8**: 173–201.
- [55] RASMUSSEN AG, MOLLER IM, PALMER JM. Component of the alternative oxidase localized to the matrix surface of the inner membrane of plant mitochondria. *FEBS Lett* 1990; **259**: 311–314.
- [56] RYCHTER AM. Alternatywna droga oddechowa w roślinach wyższych. *Post Biochem* 1982; **28**: 89–111.
- [57] SAKAJO S, MINAGAWA N, KOMIYAMA T, YOSHIMOTO A. Molecular cloning of cDNA for antimycin A-inducible mRNA and its role in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1090**: 102–108.
- [58] SHARPLESS TK, BUTOW RA. An inducible alternate terminal oxidase in *Euglena gracilis* mitochondria. *J Biol Chem* 1970; **245**: 58–70.
- [59] SILVA MAP, CARNIERI EGS, VERCESI AE. Calcium transport by corn mitochondria. *Plant Physiol* 1992; **98**: 452–457.
- [60] SOGIN ML, ELWOOD HJ, GUNDERSON JH. Evolutionary diversity of eucaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci* 1986; **83**: 1383–1387.
- [61] STEGINK SJ, SIEDOW JN. Binding of butyl gallate to plant mitochondria. II. Relationship to the presence or absence of the alternative pathway. *Plant Physiol* 1986; **80**: 196–201.
- [62] TOBIN A, DJERDJOUR B, NEUBERGER M, DOUCE R. Effect of NAD<sup>+</sup> on malate oxidation in intact plant mitochondria. *Plant Physiol* 1980; **66**: 225–229.
- [63] VANDERLEYDEN J, KURTH J, VERACHTERT H. Characterization of cyanide-insensitive respiration in mitochondria and submitochondrial particles of *Maniliella tomentosa*. *Biochem J* 1979; **182**: 437–443.



- [64] VANDERLEYDEN J, PEETERS C, VERACHTERT H, BERTRAND H. Stimulation of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* by nucleoside phosphates. *Biochem J* 1980b; **188**: 141–144.
- [65] VANDERLEYDEN J, VAN DEN EYNDE E, VERACHTERT H. Nature of the effect of adenosine 5'-monophosphate on the cyanide-insensitive respiration in mitochondria of *Moniliella tomentosa*. *Biochem J* 1980a; **186**: 309–316.
- [66] WAGNER AM, KRAAK MHS, VAN EMMERIKA WAM, van der PLAS LWH. Respiration of plant mitochondria with various substrates: alternative pathway with NADH and TCA cycle derived substrates. *Plant Physiol Biochem* 1989; **27**: 837–845.
- [67] WISKICH JT, DRY IB. The tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria: its operation and regulation. [w] *Encyclopedia of Plant Physiology: Higher Plant Cell Respiration*. (red.) Douce R, Day DA. Berlin-New York, Springer Verlag. 1985; 8: 282–313.
- [68] YOSHIMOTO A, SAKAJO S, MINAGAWA N, KOMIYAMA T. Possible role of a 36 kDa protein induced by respiratory inhibitors in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *J Bioch* 1989; **105**: 864–866.

Otrzymano: 20.03.1993 r.

Przyjęto: 20.04.1993 r.

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





# N-KOŃCOWE PEPTYDAZY KOMÓRKOWE I. AMINOPEPTYDAZY\*

## N-TERMINAL PEPTIDASES OF CELLS. I. AMINOPEPTIDASES

Halina OSTROWSKA

Zakład Analizy Instrumentalnej Akademii Medycznej w Białymstoku

*Streszczenie.* N-końcowe peptydazy hydrolizują wiązania peptydowe w N-końcu substratu i uwalniają jeden aminokwas (aminopeptydazy), dipeptyd (peptydazy dipeptydylowe) lub tripeptyd (peptydazy tripeptydylowe). W części I pracy dokonano przeglądu literatury dotyczącej aminopeptydaz komórkowych. Większość aminopeptydaz jest metalopeptydazami, zawiera komponentę węglowodanową, ma budowę podjednostkową i masę cząsteczkową zbliżoną do 300 000 daltonów. Enzymy te współdziałają ze sobą i z innymi proteazami w degradacji peptydów i białek.

*Słowa kluczowe:* aminopeptydazy.

*Summary.* N-terminal peptidases degrade N-terminal peptide bonds of substrate and release one amino acid (aminopeptidases), dipeptide (dipeptidyl peptidases) or tripeptide (tripeptidyl peptidases). The literature on amino-peptidases of cells is reviewed in part I of this article. Most of the aminopeptidases seem to be metallo-proteins, glycoproteins, have complex subunit structures with high molecular weight often reaching 300 000. They act synergistically with each other and with other proteases to degrade large peptides and proteins.

*Key words:* aminopeptidases

*Wykaz stosowanych skrótów:* DFP – diizopropylfluorofosforan, EDTA – kwas etylenodiaminocteroocowy, MCA – 7-amino-4-metylokumaryna, N<sub>2</sub>Ap – beta-naftyamid, NPhNO<sub>2</sub> – 4-nitroanilid, pNA – p-nitroanilid, pCMB – kwas p-chlorortęciobenzoowy, Pms-F – fluorek fenylometanosulfonowy

## PODZIAŁ I CHARAKTERYSTYKA AMINOPEPTYDAZ

Klasyfikacja aminopeptydaz oparta jest na ich specyficzności substratowej. Nazwę enzymu tworzy się od nazwy N-końcowego aminokwasu, do którego wykazuje on największe powinowactwo, dodając końcówkę *-ylowa*. Wyjątek stanowi aminopeptydaza rozszczepiająca

\*Praca została wykonana z budżetu Uczelni.

wiązanie peptydowe utworzone przez prolinę, występującą w drugiej pozycji od N-końca substratu. Enzym ten nazwano aminopeptydazą prolinową. Dotychczas opisane aminopeptydazy określane są w literaturze różnymi nazwami (tab. 1).

TABELA 1. Klasyfikacja aminopeptydaz wg [16]

Nazwa enzymu	Inne nazwy	Nr klasyfikacyjny
Aminopeptydaza leucylowa (LAP)	Peptydaza leucylowa, peptydaza aminoleucylowa, aminogzopeptydaza leucynowa, aminopeptydaza leucynowa, alkaliczna leucynamidaza, cytozolowa aminopeptydaza I	EC 3.4.11.1
Aminopeptydaza aspartylowa (DAP)	Aminopeptydaza aspartylowa aktywowana $Mg^{+2}$ , naftylamidaza aspartylowa, angiotensynaza $A_2$ , cytozolowa aminopeptydaza II	EC 3.4.11.-
Rozpuszczalna aminopeptydaza alanylowa (sAAP)	Arylamidaza, arylamidaza obojętna, arylamidaza alanylowa, naftylamidaza aminokwasowa, aminopeptydaza aktywowana tiolami, aminopeptydaza wątroby człowieka (HLA), aminopeptydaza wrażliwa na puromycynę, aminopolipeptydaza, cytozolowa aminopeptydaza III	EC 3.4.11.14
Rozpuszczalna aminopeptydaza arginylowa (sRAP)	Aminopeptydaza B (APB), arylamidaza arginylowa, arylamidaza B, aminopeptydaza argininowa, aminopeptydaza argininowa aktywowana $Cl^-$ , cytozolowa aminopeptydaza IV	EC 3.4.11.6
Aminopeptydaza prolylowa (sPAP)	Iminopeptydaza prolinowa, aminopeptydaza prolinowa, cytozolowa aminopeptydaza V	EC 3.4.11.5
Aminopeptydaza tripeptydowa (TAP)	Imidoendodipeptydaza, aminogzotripeptydaza, limfopeptydaza, aminotripeptydaza, tripeptydaza	EC 3.4.11.4
Mikrosomalna aminopeptydaza alanylowa (mAAP)	Aminopeptydaza M, aminopeptydaza N, aminopeptydaza częściowo związana z błonami, aminopeptydaza mikrosomalna, amino-oligopeptydaza, aminopeptydaza pseudoleucynowa, błonowa aminopeptydaza I	EC 3.4.11.2
Aminopeptydaza glutamylova (EAP)	Aminopeptydaza A, angiotensynaza A, aminopeptydaza EC 3.4.11.7 aspartylowa, aminopeptydaza glutamylova aktywowana $Ca^{+2}$ , peptydaza glutamylova, hydrolaza glutamyl- $\beta$ -naftylamidu, peptydaza- $\alpha$ -aminokwasowa, błonowa aminopeptydaza II	EC 3.4.11.7
Mikrosomalna aminopeptydaza prolinowa (mPAP)	Aminopeptydaza P,X-prolylaminopeptydaza	EC 3.4.11.9
Aminopeptydaza cystynylowa (CAP)	Oksytocynaza, aminopeptydaza cystynowa, aminopeptydaza cystylowa	EC 3.4.11.3
Lizosomalna aminopeptydaza arginylova (IRAP)	Katepsyna H, Katepsyna III, naftylamidaza leucylowa, naftylamidaza aminokwasowa, lizosomalna aminopeptydaza, arylamidaza, katepsyna $B_3$ , katepsyna $B_1A$ , endoaminopeptydaza, hydrolaza benzoilarginino-2-naftylamidu (BANA), amidohydrolaza benzoilarginino-2naftylamidowa	EC 3.4.22.16
Aminopeptydaza metionylowa (MAP)	Aminopeptydaza metioninowa	EC 3.4.11.-

Aminopeptydazy występują we frakcji cytozolowej (aminopeptydaza leucylowa, aspartylowa, alanylowa, arginylova, prolylowa i aminopeptydaza tripeptydowa), błonowej (mikrosomalna aminopeptydaza alanylowa, aminopeptydaza glutamylova, mikrosomalna aminopeptydaza prolinowa, aminopeptydaza metionylowa) i lizosomalnej (aminopeptydaza cystynylowa i arginylova) tkanek i narządów różnych gatunków zwierząt i człowieka [16, 17,



22]. Jedynie aminopeptydazy błonowe wiążą się z błonami struktur komórkowych, co odbywa się za pomocą małego hydrofobowego fragmentu zlokalizowanego w N-końcu cząsteczki enzymu [32]. Uwolnienie aminopeptydaz błonowych odbywa się w drodze autolizy za pomocą proteaz, takich jak: papaina, bromelina, trypsyna oraz przy użyciu detergentów [22].

Charakterystykę aminopeptydaz komórkowych przedstawia tabela 2.

TABELA 2. Charakterystyka aminopeptydaz wg [16, 17] z uzupełnieniami

Enzym	Źródło enzymu	Substrat	Optimum pH	Aktywator	Inhibitor	M. cz
Aminopeptydaza leucylowa	nerki, jelito, soczewka	Leu-NH <sub>2</sub>	9,0–10,0	Mn, Mg <sup>+2</sup>	fenantrolina, EDTA	32 6000
Aminopeptydaza aspartylowa	nerki psa	Asp-NNap	6,2	Mn <sup>+2</sup>	nie poznano	25000
Rozpuszczalna aminopeptydaza alanylowa	wątroba człowieka	Ala-NNap	6,9	Zn <sup>+2</sup> , Co <sup>+2</sup>	EDTA, fenantrolina, puromycyna	235000
Rozpuszczalna aminopeptydaza arginylowa	wątroba szczura	Arg-NNap	7,5	Cl <sup>-</sup>	pCMB, Hg <sup>+2</sup> , bestatyna	95000
Aminopeptydaza prolylowa	nerki świni	Pro-Leu-NH <sub>2</sub>	7,5	Mn <sup>+2</sup>	pCMB, jodoacetamid	300000
Aminopeptydaza tripeptydowa	nerki świni	Gly-Gly-Gly, Leu-Gly-Gly	7,8	nie wymaga	fenantrolina, pCMB, bestatyna	71000
Mikrosomalna aminopeptydaza alanylowa	nerki świni	Leu-NA	6,5–8,5	Co <sup>+2</sup>	EDTA, fenantrolina, amastatyna, bestatyna	280000
Aminopeptydaza glutamylowa	nerki	Glu-NNap, Asp-NNap	6,2	Ca <sup>+2</sup>	EDTA, Mn <sup>+2</sup>	270000
Mikrosomalna aminopeptydaza prolinowa	nerki świni	Gly-Pro-Ala	8,0	Mn <sup>+2</sup>	fenantrolina, merkaptoetanol	1000000
Aminopeptydaza metionylowa	wątroba szczura	Met-NNap, Met-Lys-bradykinina	7,0	nie wymaga	pCMB, fenantrolina	74000
Aminopeptydaza cystynylowa	łożysko	Leu-NNap, Lys(NNap)	7,3	nie wymaga	DFP, pCMB, Cu <sup>+2</sup> , Zn <sup>+2</sup>	320000
Lizosomalna aminopeptydaza arginylowa	lizosomy tkanek	Arg-NNap	6,8	tiole	pCMB	26000 28000

## AMINOPEPTYDAZY CYTOZOŁOWE

### AMINOPEPTYDAZA LEUCYLOWA

Aminopeptydaza leucylowa (LAP, EC 3.4.11.1) odszczepia od peptydów wszystkie N-końcowe L-aminokwasy, wykazując najwyższe powinowactwo do N-końcowej leucyny [16]. Enzym ten występuje w cytozolu komórek wielu narządów oraz w leukocytach i moczu [17, 22]. Głównym źródłem aktywności aminopeptydazy leucylowej jest nerka, wątroba i soczewka oka [15, 16].

Aminopeptydaza leucylowa jest cynkową metaloproteazą, o budowie podjednostkowej i w odróżnieniu od innych aminopeptydaz nie zawiera węglowodanów [16]. Enzym z soczewki

oka i nerek świnia składa się z 6 identycznych podjednostek o m. cz. 54000 daltonów każda. W centrum aktywnym każdej podjednostki występują dwa jony  $Zn^{+2}$ . Aktywacja następuje w wyniku zamiany jonu  $Zn^{+2}$  na jony  $Mg^{+2}$  lub  $Mn^{+2}$  z utworzeniem  $Zn^{+2}-Mg^{+2}(Mn^{+2})LAP$ . Poznano również miejsce wiążące tego enzymu [4]. Natywna cząsteczka aminopeptydazy leucylowej ma kształt cylindryczny i wymiary  $67 \times 107 \text{ \AA}$ . N-końiec LAP stanowi treonina. Poznano też strukturę I-rzędową N-końcowego fragmentu tego białka [16]. Punkt izoelektryczny LAP znajduje się w pH 4,9.

Aminopeptydaza leucylowa wykazuje największe powinowactwo do substratów zawierających w N-końcu leucynę i alaninę (tab. 3). Arylamidy tych aminokwasów hydrolizuje ona w niewielkim stopniu [22]. LAP z soczewki wołu nie działa na substraty z N-końcowym kwasem glutaminowym, aspartylowym i proliną. Enzym z nerek człowieka degradowuje peptydy biologicznie czynne, takie jak: Leu-enkefalina, luliberyna i proktolina [15], natomiast LAP łożyska inaktywuje oksytocynę i angiotensynę II [16]. Aminopeptydaza leucylowa wykazuje też aktywność transferazową i esterazową [17].

TABELA 3. Specyficzność substratowa aminopeptydazy leucylowej wg [17]

Substrat	Aktywność (%) w obecności	
	$Mn^{+2}$	$Mg^{+2}$
L-Leu-NH <sub>2</sub>	100,0	100,0
L-Phe-NH <sub>2</sub>	26,0	17,0
L-Ile-NH <sub>2</sub>	20,0	17,0
L-Lys-NH <sub>2</sub>	7,1	12,0
L-Ala-NH <sub>2</sub>	3,4	4,9
L-Pro-NH <sub>2</sub>	0,7	–
Gly-NH <sub>2</sub>	0,1	0,1
D-Leu-NH <sub>2</sub>	0,0	0,0
L-Leu-Leu	100,0	53,0
L-Leu-Ile	64,0	50,0
L-Leu-Ala	64,0	–
L-Ala-Leu	93,0	–
L-Ala-L-Leu-NH <sub>2</sub>	186,0	186,0
L-Leu-L-Ala-NH <sub>2</sub>	129,0	82,0
Gly-L-Leu-NH <sub>2</sub>	43,0	94,0
L-Leu-Gly-Gly	120,0	70,0
Gly-Gly-Gly	2,4	–

Aktywność aminopeptydazy leucylowej oznacza się przy użyciu Leu-NH<sub>2</sub> w pH 9,0 po aktywacji enzymu jonami  $Mn^{+2}$  lub w pH 10 w obecności jonów  $Mg^{+2}$  [15, 16, 22]. Do oznaczania aktywności tego enzymu jest stosowany również ester metylowy Leu-Leu oraz Phe-3-thia-Phe [22].

Inhibitorem LAP jest 1,10-fenantrolina, EDTA, cytryniany, jony  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$  i  $Co^{+2}$  oraz bestatyna i amastatyna [4, 15, 17]. Aktywność enzymu obniżają także długołańcuchowe kwasy organiczne oraz analogi leucyny. Występuje najprawdopodobniej endogenny inhibitor tego enzymu [16].

LAP jest stabilna w stanie zamrożenia w pH 7–9 w obecności  $MgCl_2$  lub w postaci kompleksu z fosforanem wapnia [16]. Jest natomiast inaktywowana w pH poniżej 5 i powyżej 11.

Uwalnianie aminopeptydazy leucylowej do krwi z komórek wątroby w przypadku ich martwicy wykorzystywane jest do celów diagnostycznych [22, 33]. Zwiększenie aktywności tego enzymu jest bardziej wiarygodnym wskaźnikiem ostrego zapalenia wątroby niż zwiększenie aktywności aminotferaz. Znacznie wyższy poziom aktywności LAP w limfocytach może być wskaźnikiem infekcji wirusowych [22].

#### AMINOPEPTYDAZA ASPARTYLOWA

Aminopeptydaza aspartyłowa (DAP, EC 3.4.11.-) odszczepia od N-końca peptydów kwas asparaginowy [16]. Źródłem jej aktywności jest frakcja cytozolowa nerek psa. Enzym ten częściowo oczyszczono i ustalono m. cz. na 250000–300000 daltonów.



Aktywność aminopeptydazy aspartylowej oznacza się przy użyciu Asp-NNap w pH 6,2–7,5, po aktywacji jonami  $Mn^{+2}$ . Glu-NNap jest hydrolizowany z mniejszą szybkością, a inne aminoacylonafitylamidy nie są podatne na działanie tego enzymu. Aminopeptydaza aspartylowa odszczepia N-końcowy kwas asparaginowy od angiotensyny II.

### AMINOPEPTYDAZA ALANYLOWA

Aminopeptydaza alanylowa (sAAP, EC 3.4.11.14) wykazuje największe powinowactwo do substratów z N-końcową alaniną [16]. Enzym ten występuje we frakcji cytozolowej wątroby, nerek, trzustki, jelita cienkiego, mięśni szkieletowych oraz w cytozolu wielu innych narządów [15, 16].

Aminopeptydaza alanylowa jest glikoproteiną, mającą budowę podjednostkową [16]. Enzym z wątroby człowieka jest dimerem o m. cz. 235000 daltonów i zawiera 21% węglowodanów. Każda podjednostka ma m. cz. 118000 daltonów i zawiera jon  $Zn^{+2}$ . sAAP z wątroby świni oraz z nerek człowieka jest monomerem o m. cz. odpowiednio 96000 i 103000 daltonów.

We krwi człowieka występuje wiele izoenzymów sAAP różniących się ruchliwością elektroforetyczną, lecz mających wspólną determinantę antygenową [16].

Aminopeptydaza alanylowa uwalnia N-końcowe aminokwasy od dipeptydów, tripeptydów, oligopeptydów oraz amidów i aryamidów aminokwasów [15, 16]. Enzym z wątroby człowieka hydrolizuje najszybciej naftyamid alaniny, fenyloalaniny i metioniny. Nie hydrolizuje natomiast Leu-Gly i Leu-NH<sub>2</sub>, które są substratami aminopeptydazy leucylowej. sAAP hydrolizuje Met-Lys-bradykininę, Lys-bradykininę, Leu- i Met-enkefalinę, angiotensynę, oksytocynę, Arg-wazopresynę, somatostatynę i cholecystokininę. Oligopeptydy z zablokowaną grupą aminową (tyroliberyna, neurotensyna) oraz zawierające w N-końcu prolinę (bradykinina, substancja P) nie są podatne na działanie tej aminopeptydazy.

Aktywność aminopeptydazy alanylowej oznacza się przy użyciu Ala-NNap i Ala-MCA w pH 6,9 po aktywacji jonami  $Co^{+2}$  lub  $Zn^{+2}$  [16].

sAAP jest cynkową metaloproteazą, której aktywność znosi 1,10-fenantrolina, bestatyna, puromycyna i inne antybiotyki oraz wolne aminokwasy hydrofobowe [15, 16].

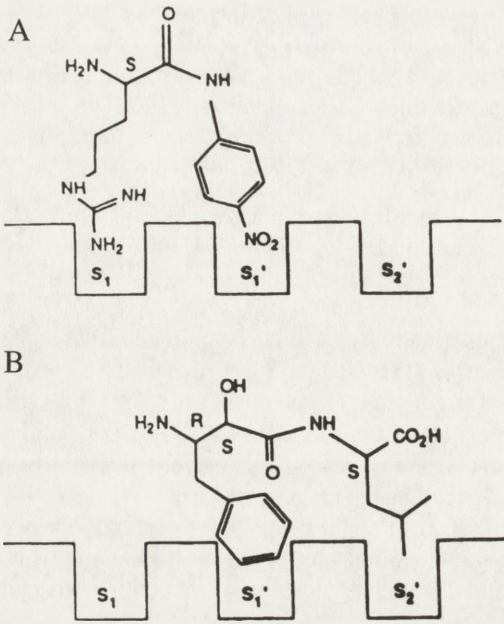
Rozpuszczalna aminopeptydaza alanylowa (EC 3.4.11.14) wykazuje duże podobieństwo pod względem właściwości fizykochemicznych i biochemicznych do aminopeptydazy leucylowej (EC 3.4.11.1) i mikrosomalnej aminopeptydazy alanylowej (EC 3.4.11.2). Powyższe podobieństwa, jak i tworzenie asocjatów z innymi składnikami stwarzają duże trudności preparatywnego oddzielenia tych enzymów.

Z cytozolu erytrocytów człowieka wyizolowano alanylową aminopeptydazę aktywowaną jonami  $Cl^-$  [1]. Enzym ten ma m. cz. 70000 daltonów i punkt izoelektryczny w pH 5,1. Wykazuje wysokie powinowactwo do naftylamidu alaniny, a jego aktywność hamuje bestatyna, amastatyna, jony metali dwuwartościowych oraz pCMB i 1,10-fenantrolina.

### AMINOPEPTYDAZA ARGINYLOWA

Aminopeptydaza arginylowa (sRAP, EC 3.4.11.6) odszczepia od peptydów i polipeptydów N-końcowe aminokwasy zasadowe [16, 17, 22]. Enzym ten występuje w wątrobie, nerkach, mięśniach szkieletowych i wielu innych narządach oraz w erytrocytach i leukocytach [16, 22].

Masa cząsteczkowa aminopeptydazy arginylowej z wątroby szczura oraz z erytrocytów człowieka i leukocytów wołu wynosi 95000 daltonów [16]. Natomiast enzym z mięśni szkieletowych człowieka ma m. cz. ok. 76000 daltonów, a z wątroby wołu i świni ok. 58000



Rysunek 1. Model miejsca aktywnego aminopeptydazy argyny-  
lowej i mechanizm wiązania substratu (A) i inhibitora (B)  
przez ten enzym

raz do miejsca  $S_2'$  przyłącza się bestatyna. Aktywność aminopeptydazy argynyłowej znosi również 1,10-fenantrolina, EDTA, pCMB, jony  $Hg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  i  $Pb^{+2}$  oraz niektóre aminokwasy.

Wzrost aktywności aminopeptydazy argynyłowej w surowicy krwi obserwuje się w stanach zapalnych o różnej etiologii [16].

### AMINOPEPTYDAZA PROLYLOWA

Aminopeptydaza prolylowa (sPAP, EC 3.4.11.5) odszczepia od N-końca peptydów prolinę w obecności jonów  $Mn^{+2}$  jako aktywatorów [16]. Występuje ona we frakcji cytozolowej wielu tkanek zwierząt i człowieka, wykazując najwyższą aktywność w wątrobie, nerkach i fibroblastach skóry [16].

Enzym z nerek wołu składa się z 6 identycznych podjednostek, ma m. cz. ok. 300000 daltonów i punkt izoelektryczny w pH 4,1. Natomiast aminopeptydaza z narządów człowieka występuje w formie monomeru o m. cz. 80000 daltonów, a jej punkt izoelektryczny znajduje się w pH 5,3.

Aktywność aminopeptydazy prolylowej z nerek świni oznacza się przy użyciu Pro-Leu-NH<sub>2</sub> w pH 7,5, a z narządów człowieka przy użyciu Pro-Gly-Gly w obecności jonów  $Mn^{+2}$  w pH 7,4–8,0 lub bez tych jonów w pH 8,5 [16].

daltonów. W czasie przechowywania w temperaturze +4°C aminopeptydaza argynyłowa tworzy agregatyny, które w obecności substratu dysocjują na monomery o różnej masie cząsteczkowej. Punkt izoelektryczny enzymu z różnych tkanek znajduje się w pH ok. 5,0.

Aktywność aminopeptydazy argynyłowej oznacza się przy użyciu Arg-NNap lub Lys-NNap, w pH 7,0–7,5, w obecności jonów  $Cl^-$  lub  $Br^-$  [16, 17]. Enzym ten nie hydrolizuje substratów rozkładanych przez inne aminopeptydazy. Naturalnym substratem jest kallidyna, bradykinina, proangiotensyna i neurotensyna.

Aminopeptydaza argynyłowa jest proteazą cynkową, której aktywność hamuje bestatyna [8]. Mechanizm wiązania substratu oraz inhibitora przez ten enzym przedstawia rysunek 1. W centrum katalitycznym znajdują się dwa miejsca wiążące, do których przyłącza się substrat: miejsce  $S_1$  wiąże aminokwasy zasadowe, a miejsce  $S_1'$  reszty aromatyczne (pNA). Do miejsca  $S_1'$  o-



Aminopeptydazę odszczepiającą N-końcową prolinę z polipeptydów wyizolowano też z frakcji cytozolowej nerek i mózgu szczura [26]. Enzym ten uwalnia prolinę z Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> po aktywacji jonami Mn<sup>+2</sup>.

Aktywność aminopeptydazy prolylowej znosi pCMB, jodoacetamid i jony Cd<sup>+2</sup> [16]. W czasie przechowywania w temperaturze +4°C lub -20°C enzym traci 10–20% aktywności. W tych warunkach całkowicie traci aktywność dipeptydaza prolylowa. Eliminuje to wpływ tego enzymu na oznaczanie aktywności aminopeptydazy prolylowej w materiale biologicznym.

### AMINOPEPTYDAZA TRIPEPTYDOWA

Aminopeptydaza tripeptydowa (TAP, EC 3.4.11.4) odszczepia N-końcowy aminokwas od tripeptydów [16, 22]. Enzym ten występuje w wielu tkankach i narządach, takich jak: nerki, mózg, wątroba, śluzówka jelita, skóra, mięśnie szkieletowe, mięśnie gładkie macicy, łożysko i limfocyty zwierząt i człowieka [16].

Aminopeptydaza tripeptydowa z nerek świni występuje w trzech różnych formach molekularnych: monomeru (71000 daltonów) oraz dimeru stabilnego (142000 daltonów) i niestabilnego [16]. Częsteczkę monomeru stanowi pojedynczy łańcuch polipeptydowy zawierający stosunkowo dużą liczbę reszt tryptofanowych i 11 reszt cystynylowych. Poznano również skład aminokwasowy tej aminopeptydazy z mózgu małpy [16]. Punkt izoelektryczny TAP nerek znajduje się w pH 4,94.

Aminopeptydaza tripeptydowa odszczepia N-końcowy aminokwas od tripeptydów wykazując najwyższą aktywność w pH 7,5–7,8 [22]. W tabeli 4 przedstawiono specyficzność substratową enzymu z nerek świni, jelita królika i mózgu szczura. Tripeptydy mające na drugim miejscu prolinę, hydroksyprolinę, kwas glutaminowy i kwas asparaginowy nie są hydrolizowane [16]. Aminopeptydaza tripeptydowa z cytozolu mózgu szczura hydrolizuje biologicznie aktywne tripeptydy, takie jak: Met-Leu-Tyr (czynnik chemotaktyczny), Gly-His-Lys (czynnik wzrostowy wątroby) i Thr-Val-Leu (tripeptyd z centralnego układu nerwowego).

TABELA 4. Specyficzność substratowa aminopeptydazy tripeptydowej wg [16]

Substrat	Aktywność, %		
	nerki świni	jelito królika	mózg szczura
Pro-Gly-Gly	100,0	100,0	100,0
Ala-Gly-Gly	57,0	95,0	314,0
Leu-Gly-Gly	53,0	49,0	286,0
Gly-Gly-Gly	33,0	23,0	188,0
Phe-Gly-Gly	18,0	n.o.	220,0
Tyr-Gly-Gly	11,0	n.o.	57,0
Trp-Gly-Gly	0,7	n.o.	n.o.
Ala-Ala-Ala	n.o.	77,0	n.o.
Gly-Gly-Leu	n.o.	n.o.	105,0

Aktywność aminopeptydazy tripeptydowej oznacza się najczęściej przy użyciu Leu-Gly-Gly, Pro-Gly-Gly lub Gly-Gly-Gly [16, 22]. Aktywność tego enzymu oznaczana jest także w surowicy krwi w celach diagnostycznych [22]. Jest ona podwyższona w surowicy pacjentów ze schorzeniami wątroby oraz u chorych na białaczkę.

Inhibitorem TAP jest bestatyna oraz blokery grup SH [16]. Inhibicję przez fenantrolinę znoszą jony Co<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> i Mn<sup>+2</sup>, a przez pCMB – cysteina. Nie jest ona wrażliwa na puromycynę i amastatynę.

## AMINOPEPTYDAZY BŁONOWE

## MIKROSOMALNA AMINOPEPTYDAZA ALANYLOWA

Mikrosomalna aminopeptydaza alanylowa (mAAP, EC 3.4.11.2) występuje we frakcji mikrosomalnej wielu tkanek i narządów różnych gatunków zwierząt i człowieka [16, 22]. Enzym ten wyizolowano z nerek [14, 23], jelita cienkiego [19], wątroby [17], mózgu [5], łożyska [12] i z plazmy nasiennej [27] oraz z surowicy kobiet ciężarnych [12] i z osocza [16].

Fragment N-końca cząsteczki mAAP, za pomocą którego wiąże się ona z błonami, obejmuje sekwencję  $\text{Leu}^{10}\text{-Val}^{32}$ , w której przeważają reszty aminokwasów hydrofobowych [19].

Mikrosomalna aminopeptydaza alanylowa charakteryzuje się znaczną heterogennością molekularną, która jest wynikiem potranslacyjnej modyfikacji tego enzymu [21]. W większości narządów występuje enzym o budowie podjednostkowej. mAAP z narządów wieprza, szczura i człowieka jest dimerem, a z narządów królika monomerem. Masa cząsteczkowa dimeru wynosi 280000 daltonów, a monomeru 125000–136000 daltonów [17]. mAAP z jelita

TABELA 5. Skład aminokwasowy mikrosomalnej aminopeptydazy alanylowej nerek szczura i człowieka wg [23]

Aminokwas	Nerki [g/100g białka]	
	szczura	człowieka
Asp	11,6	11,2
Thr	6,9	5,4
Ser	7,4	4,9
Glu	10,7	12,7
Gly	4,6	2,7
Ala	7,2	4,6
Val	6,6	5,7
Met	1,1	2,1
Ile	5,0	4,6
Leu	9,2	10,4
Tyr	4,8	6,2
Phe	4,8	6,0
His	5,1	2,5
Lys	4,7	5,6
Arg	3,9	5,8
Pro	5,7	4,2
Cys	0,7	0,6
Trp	–	3,5

cienkiego świni składa się z trzech różnych podjednostek: A (162000 daltonów), B (123000 daltonów) i C (62000 daltonów). Enzym ten jest syntetyzowany w formie podjednostki A, która in vivo może być konwertowana do podjednostki B i C przez tripsynę.

Poznano skład aminokwasowy (tab. 5) i cukrowy mikrosomalnej aminopeptydazy alanylowej [23, 32]. Enzym z osocza charakteryzuje się niższą zawartością węglowodanów (11,6%) w porównaniu do tego enzymu wyizolowanego z innych narządów (17,4–22,1%) [16]. Punkt izoelektryczny przypada na pH 3,9 dla aminopeptydazy z osocza oraz na pH 4,2–4,8 dla enzymu z narządów [22]. Poznano również sekwencję aminokwasową mikrosomalnej aminopeptydazy alanylowej z nerek szczura [14] i jelita cienkiego człowieka [19]. Enzym z jelita zawiera 967 reszt aminokwasowych.

Mikrosomalna aminopeptydaza alanylowa z osocza człowieka jest identyczna immunologicznie z enzymem z nerek i wątroby [16].

Centrum aktywne mikrosomalnej aminopeptydazy alanylowej zawiera argininę, histydynę i reszty aminokwasów kwaśnych w miejscu wiążącym oraz tyrozynę w miejscu katalitycznym, mającym także jony  $\text{Zn}^{+2}$  [9].

Mikrosomalna aminopeptydaza alanylowa wykazuje szeroką specyficzność substratową. Hydrolizuje amidy, nitroanilidy i naftylamidy aminokwasów obojętnych (Ala, Leu, Tyr, Phe) i z tego względu nazywano ją aminopeptydazą N (neutralną). Największe powinowactwo



wykazuje jednak do substratów zawierających N-końcową alaninę i jest najczęściej nazywana aminopeptydazą alaninową. Nie hydrolizuje natomiast substratów z N-końcową proliną, kwasem asparaginowym i glutaminowym [16, 17, 22]. Ze względu na szeroką specyficzność substratową i znaczną stabilność jest wykorzystywana do ustalania sekwencji peptydów [16].

Na działanie mikrosomalnej aminopeptydazy alanylowej podatne są niektóre biologicznie czynne peptydy (tab. 6). Przeprowadza ona konwersję kallidyny do bradykininy, inaktywuje des(Asp<sup>1</sup>)-angiotensynę I i (Asn<sup>1</sup>)-angiotensynę II, angiotensynę III, hepta (5-11)-substancję P i Met<sup>5</sup>-enkefalinę [5, 20, 29]. Na działanie tego enzymu jest oporna bradykinina, angiotensyna I i II, substancja P oraz beta-endorfiny. W degradacji bradykininy współdziała z mikrosomalną aminopeptydazą prolinową i peptydazą dipeptydową IV. Angiotensyna III, substancja P i kallidyna hamują kompetencyjnie degradację enkefalin dokonywaną przez ten enzym [20]. Enkefaliny i inne niskocząsteczkowe, opioidowe peptydy hydrolizowane są przez mAAP mózgu, włosowatych naczyń mózgowych i płynu mózgowo-rdzeniowego [3, 5]. Mikrosomalna aminopeptydaza alanylowa nerek królika hydrolizuje ponadto somatostatynę

TABELA 6. Hydroliza biologicznie czynnych peptydów przez mikrosomalną aminopeptydazę alanylową wg [20, 29]

Peptyd	Sekwencja aminokwasowa i rozszczepiane wiązanie peptydowe
Angiotensyna I	Asp—Arg—Val—Tyr—Ile—His—Pro—Phe—His—Leu ↓
des-Asp <sup>1</sup> -angiotensyna I	Arg—Val—Tyr—Ile—His—Pro—Phe—His—Leu
Angiotensyna II	Asp—Arg—Val—Tyr—Ile—His—Pro—Phe ↓
(Asn <sup>1</sup> )angiotensyna II	Asn—Arg—Val—Tyr—Ile—His—Pro—Phe ↓
Angiotensyna III	Arg—Val—Tyr—Ile—His—Pro—Phe ↓
Kallidyna	Lys—Arg—Pro—Pro—Gly—Phe—Ser—Pro—Phe—Arg
Bradykinina	Arg—Pro—Pro—Gly—Phe—Ser—Pro—Phe—Arg
Substancja P	Arg—Pro—Lys—Pro—Gln—Gln—Phe—Phe—Gly—Leu—Met ↓
Hepta(5-11)-substancja P	Gln—Gln—Phe—Phe—Gly—Leu—Met ↓
(Met <sup>5</sup> )enkefalina	Tyr—Gly—Gly—Phe—Met ↓
Somatostatyna	Ala—Gly—Cys—Lys—Asn—Phe—Phe—Trp—Lys—Phe—Thr—Phe—Ser—Cys

i niektóre analogii neurokinin [29]. Natomiast enzym z plazmy nasiennej wykazuje powinowactwo do Arg-Arg-pNA, syntetycznego substratu peptydazy dipeptydylowej III [27]. mAAP tarczycy bierze udział w niektórych etapach hydrolizy tyreoglobuliny [16]. Występująca na powierzchni leukocytów wielojądrzastych mAAP może dokonywać inaktywacji tetrapeptydu stymulującego fagocytozę (Thr-Lys-Pro-Arg, tuftsin), który jest uwalniany z leukokinin przez leukokinazę [16].

Opracowano różne metody oznaczania aktywności mikrosomalnej aminopeptydazy alanylowej [21]. Do tego celu służą nitroanilidy i naftylamidy alaniny lub leucyny. mAAP wykazuje optymalną aktywność w pH 6,5–8,5 i wymaga aktywacji jonami Co<sup>+2</sup> [17, 22]. Wadą

arylamidów leucynowych i Ala-NNap jest ich częściowa hydroliza przez aminopeptydazę cystynylową. Do oznaczania aktywności mAAP w surowicy oraz w moczu zaleca się używanie nitroanilidu alaniny lub Leu-3-karboksy-4-hydroksyaniliny [21, 22]. Zawartość aminopeptydazy alanylowej w surowicy oznacza się też metodą radioimmunologiczną [22].

Mikrosomalna aminopeptydaza alanylowa jest cynkową proteinazą, której aktywność hamuje EDTA, niskie stężenia o-fenantroliny, aminokwasy hydrofobowe Tris i jony  $Mg^{+2}$  [16, 22]. Aktywność tego enzymu hamuje także amastatyna, bestatyna i puromycyna oraz kwas o-(fenylotio)-fenylooctowy, będący lekiem przeciwwzapalnym [16, 27].

mAAP jest stabilna w temperaturze laboratoryjnej w zakresie pH 3,5–10,8 w ciągu 1 godziny [16]. Wysokooczyszczone preparaty tego enzymu mogą być przechowywane w stanie zamrożenia lub po liofilizacji przez wiele miesięcy. mAAP jest stabilna w 6 M moczniku, natomiast 0,5 M chlorek guanidyny powoduje nieodwracalną jej inaktywację.

Oznaczanie mikrosomalnej aminopeptydazy alanylowej w surowicy i moczu ma znaczenie diagnostyczne [21, 22]. Aktywność tego enzymu w surowicy jest 10-krotnie wyższa niż w moczu. Zależy ona od płci i wieku. Wzrasta w surowicy krwi kobiet ciężarnych. Wzrost aktywności tego enzymu w surowicy obserwuje się także u pacjentów z rakiem trzustki oraz w uszkodzeniach wątroby wywołanych etanolem i niektórymi innymi związkami chemicznymi.

#### AMINOPEPTYDAZA GLUTAMYŁOWA

Aminopeptydaza glutamyłowa (EAP, EC 3.4.11.7) odszczepia od peptydów N-końcową resztę glutamyłową lub aspartyłową [16]. Wysoka aktywność tego enzymu występuje w łożysku i surowicy kobiet ciężarnych [18] oraz w męskich narządach rozrodczych i w naczyniach włosowatych [2, 17].

Aminopeptydazę glutamyłową wyizolowano z jelita cienkiego, nerek, łożyska i z surowicy krwi [16, 22]. Z jelita świni wyizolowano formę D-EAP po solubilizacji detergentami i formę P-EAP po uwolnieniu jej proteazami. Masa cząsteczkowa D-EAP wynosi 350000–400000 daltonów, a P-EAP 250000–270000 daltonów. Forma D jest konwertowana do formy P przez trypsynę. N-końcowym aminokwasem formy P-EAP jest asparagina lub kwas asparaginowy, a D-EAP leucyna. Obie formy są dimerami. Każda podjednostka formy D zawiera hydrofobowy peptyd złożony z 42 reszt aminokwasowych, za pomocą którego enzym wiąże się z powierzchnią błony. Każda podjednostka zawiera jon  $Ca^{+2}$ . EAP z jelita cienkiego królika występuje w formie monomeru o m. cz. 170000 daltonów.

Aminopeptydaza glutamyłowa uwalnia N-końcowy kwas glutaminowy i kwas asparaginowy od peptydów oraz naftylamidów aminokwasowych [16, 22]. Naturalnym substratem aminopeptydazy glutamyłowej jest angiotensyna I i II [2]. Enzym ten dokonuje inaktywacji angiotensyny II w osoczu krwi [18]. Aktywność EAP wzrasta we krwi kobiet ciężarnych w wyniku przechodzenia enzymu z łożyska.

Aktywność aminopeptydazy glutamyłowej oznacza się przy użyciu Glu-NNap lub Asp-NNap odpowiednio w pH 6,2 oraz w pH 7,4 w obecności jonów  $Ca^{+2}$  [16, 20, 22]. Aktywacji enzymu dokonują obok jonów  $Ca^{+2}$  również jony  $Ba^{+2}$  i  $Sr^{+2}$ . Substratem zalecanym do oznaczania aktywności aminopeptydazy glutamyłowej w surowicy krwi jest Glu-pNA, Glu-NNap i Glu-MCA [22].



Inhibitorem aminopeptydazy glutamylovej jest EDTA, 1,10-fenantrolina, jony  $Zn^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$  i  $Cd^{+2}$  oraz cytryniany i fosforany [16, 22]. Jony  $Mn^{+2}$  i  $Ca^{+2}$  odwracają inhibicję dokonywaną przez EDTA. Aktywność enzymu hamują też związki tiolowe i amastatyna.

### MIKROSOMALNA AMINOPEPTYDAZA PROLINOWA

Mikrosomalna aminopeptydaza prolinowa (mPAP, EC 3.4.11.9) odszczepia N-końcowy aminokwas związany z proliną od substratów o ogólnym wzorze X-Pro-Y— [13, 16]. Enzym ten występuje w nerkach [11], jelicie cienkim [13], mózgu [7], płucach [16], płytkach krwi [24, 28], leukocytach [10] i w surowicy [30] oraz w innych narządach zwierząt [16].

Aminopeptydaza prolinowa wyizolowana z nerek świni charakteryzuje się bardzo dużą masą cząsteczkową wynoszącą 1000000 i 2000000 daltonów [16]. Przyczyną tego jest najprawdopodobniej wiązanie się enzymu ze składnikami lipidowymi, które nie są oddzielane w czasie oczyszczania. Natomiast aminopeptydaza prolinowa z płytek krwi człowieka [28] i z mózgu szczura [7] ma masę cząsteczkową odpowiednio 223000 i 143000 daltonów.

Aminopeptydaza prolinowa hydrolizuje wiele X-Pro-dipeptydów [7, 11, 13]. Enzym z płuc człowieka uwalnia N-końcowy aminokwas z Arg-Pro, Leu-Pro i Ala-Pro. Nie hydrolizuje natomiast substratów zawierających N-końcową prolinę. Aktywność aminopeptydazy prolinowej oznacza się najczęściej przy użyciu Gly-Pro-Ala i Gly-Pro-Hyp w pH 8,0 [10, 16] lub innych syntetycznych substratów [13]. Aktywatorami tej aminopeptydazy są jony  $Mn^{+2}$  [7].

Naturalnym substratem aminopeptydazy prolinowej jest bradykinina i substancja P [7, 28, 30]. W degradacji bradykininy współdziała z peptydazą dipeptydylową IV i mikrosomalną aminopeptydazą alanylową. Enzym z mózgu hydrolizuje kazomorfinę i (Tyr)-melanostatynę [7]. Aminopeptydaza prolinowa płytek krwi bierze udział w inaktywacji cytokinin, płytkowego czynnika wzrostu, tachykinin i interleukiny 1 i 2 [24]. Rozkładanie wiązań peptydowych utworzonych przez prolinę sugeruje rolę tej aminopeptydazy w degradacji kolagenu.

Aminopeptydaza prolinowa jest metalopeptydazą wrażliwą na 1,10-fenantrolinę i merkaptoetanol [7, 16]. Aktywność enzymu z płuc człowieka obniżają niektóre antybiotyki [16].

### AMINOPEPTYDAZA METIONYLOWA

Aminopeptydaza metionylowa (MAP, EC 3.4.11.-) występuje we frakcji mikrosomalnej i mitochondrialnej wątroby szczura [25] oraz w nerkach i osoczu krwi szczura [16]. Cząsteczka enzymu z wątroby tego zwierzęcia ma masę 74000 daltonów i zawiera 5 grup sulfydrylowych.

Aminopeptydaza metionylowa odszczepia N-końcową metioninę od dipeptydów i Met-NNap. W mniejszym stopniu hydrolizuje też Leu-NNap, Ala-NNap, Arg-NNap i Lys-NNap. Hydrolizuje również Met-Lys-bradykininę. Optimum aktywności znajduje się w pH 7,0. Substratem służącym do oznaczania aktywności tego enzymu jest Met-NNap lub Met-Lys-bradykinina.

Aktywność MAP znosi całkowicie pCMB, 1,10-fenantrolina i w 50% puromycyna. Enzym traci aktywność w czasie przechowywania, czemu zapobiega dodanie merkaptoetanolu lub glicerolu.

Rola biologiczna aminopeptydazy metionylowej jest związana z uwalnianiem N-końcowej metioniny z nowosyntetyzowanych białek [25].

## AMINOPEPTYDAZY LIZOSOMALNE

### AMINOPEPTYDAZA CYSTYNYLOWA

Aminopeptydaza cystynylowa (CAP, EC 3.4.11.3) opisywana jest w literaturze pod nazwą oksytocynazy. Źródłem jej aktywności jest frakcja lizosomalna łożyska i surowica kobiet ciężarnych [16, 22].

Aminopeptydaza cystynylowa jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej – 280000–325000 daltonów [16]. Cząsteczka enzymu składa się z dwóch identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej 140000 daltonów każda, zawierających jon  $Zn^{+2}$ . CAP występuje w dwóch formach: CAP-1 i CAP-2, które można rozdzielić metodą elektroforezy. W surowicy występuje forma CAP-2. Zawiera ona wewnątrzcząsteczkowe wiązanie jonowe utworzone pomiędzy grupą karboksylową kwasu sjałowego i grupą aminową reszty aminokwasowej. Neraminidaza odszczepia kwas sjałowy i powoduje powstanie formy CAP-1. Punkt izoelektryczny formy CAP-2 znajduje się w pH 3,7.

Aminopeptydaza cystynylowa wyizolowana z surowicy krwi pozałożyskowej wykazuje szeroką specyficzność substratową [16]. Hydrolizuje ona wiele aminoacylo-naftyamidów, takich jak: Leu-NNap, Arg-NNap, Lys-NNap, Ala-NNap, Tyr-NNap i Cys(-NNap)<sub>2</sub>. Nie działa natomiast na Asp- i Glu-NNap [22]. Enzym wykazuje aktywność w zakresie pH 4,0–8,7, z maksimum w pH 7,3. Naturalnym substratem CAP jest oksytocyna, wazopresyna, angiotensyna II i jej amid [16, 22].

Aktywność aminopeptydazy cystynylowej oznacza się przy użyciu Cys(-NNap)<sub>2</sub>, Cys(Bzl)-NPhNO<sub>2</sub> lub Leu-NNap [16]. Do oznaczania aktywności tego enzymu w surowicy krwi polecana jest metoda fluorymetryczna, w której substratem jest S-Bz-Cys-MCA [22].

Aktywność aminopeptydazy cystynylowej hamuje EDTA, 1,10-fenentrolina oraz jony  $Zn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  i  $Ag^{+2}$  [16, 17]. W odróżnieniu od innych aminopeptydaz nie jest ona wrażliwa na amastatynę, bestatynę i metioninę. Enzym traci aktywność w czasie przechowywania w stanie zamrożenia lub po liofilizacji.

Aktywność aminopeptydazy cystynylowej w surowicy zwiększa się wraz z rozwojem ciąży [22]. Oznaczanie tego enzymu w surowicy krwi ma znaczenie w ocenie funkcji łożyska. Aktywność CAP w płynie owodniowym jest nieznaczna.

Z mięśni szkieletowych człowieka wyizolowano aminopeptydazę cystynylową aktywowaną jonami  $Cl^-$  [31]. Hydrolizuje ona S-Bz-Cys-MCA w pH 7,5. Jej aktywność hamuje bestatyna. Nie jest natomiast wrażliwa na puromycynę i EDTA. Masa cząsteczkowa tej aminopeptydazy wynosi 66000 daltonów.

### LIZOSOMALNA AMINOPEPTYDAZA ARGINYLOWA

Lizosomalna aminopeptydaza argynylowa (IRAP) opisywana jest w literaturze jako katepsyna H (EC 3.4.22.16). Enzym ten występuje w lizosomach śledziony, nerek, wątroby i płuc [16]. Masa cząsteczkowa aminopeptydazy argynylowej wynosi 26000–28000 daltonów. W wątrobie szczura występuje jedna forma enzymu o pI 7,1, w wątrobie człowieka dwie formy o pI 6,0 i 6,4, a w płucach królika kilka form tego enzymu o pI 5,8–6,5.

Lizosomalna aminopeptydaza argynylowa wykazuje największe powinowactwo do N-końcowej argininy [16]. Hydrolizuje ponadto naftyamidami aminokwasów, takich jak: Thr, Met, Ser, His, Lys, Ala, Leu i Glu oraz wykazuje nieznaczną aktywność endopeptydazową i



hydrolizuje azokazeinę. Optimum aktywności tego enzymu znajduje się w pH 6,8. Aktywność aminopeptydazy arginyłowej oznacza się przy użyciu Arg-NNap lub Arg-MCA [16].

Inhibitorem enzymu są blokery grup SH, takie jak pCMB i jodoacetamid [16]. Leu-CH<sub>2</sub>Cl w stężeniu 1 μM hamuje aktywność egzo-peptydazową i endo-peptydazową tej aminopeptydazy. IRAP jest całkowicie hamowana przez cystatynę białka jaja, cystatynę A i B wątroby i inhibitor proteinazy alfa-cysteinowej. Aktywność tego enzymu hamuje także alfa<sub>2</sub>-makroglobulina.

## OZNACZANIE AKTYWNOŚCI AMINOPEPTYDAZ

Metody oznaczania aminopeptydaz w surowicy krwi człowieka są przedmiotem pracy przeglądowej [22]. Trudności w oznaczaniu aktywności tych aminopeptydaz są spowodowane głównie brakiem specyficznego substratu. Oznaczanie aktywności umożliwiają różnice w optimum pH oraz we wrażliwości na aktywatory i inhibitory poszczególnych aminopeptydaz. I tak na przykład Leu-NH<sub>2</sub>, będący substratem aminopeptydazy leucyłowej jest hydrolizowany również przez mikrosomalną aminopeptydazę alanyłową. W celu oznaczenia aktywności LAP w surowicy przy użyciu tego substratu inkubację przeprowadza się w pH 9,0 w obecności jonów Mg<sup>+2</sup>. Natomiast mAAP hydrolizuje Leu-NH<sub>2</sub> w pH obojętnym po aktywacji jonami Co<sup>+2</sup>, a jony Mg<sup>+2</sup> hamują jej aktywność. Aktywność aminopeptydazy leucyłowej oznacza się również przy użyciu Leu-hydrazyny w pH 10, co eliminuje wpływ mikrosomalnej aminopeptydazy alanyłowej. Do oznaczania aktywności LAP stosuje się też Phe-thia-Phe, która hydrolizowana jest przez ten enzym 20-krotnie szybciej niż mAAP [22].

Leu-NNap może posłużyć do oznaczania aktywności mikrosomalnej aminopeptydazy alanyłowej i aminopeptydazy cystynyłowej, jeśli oznaczenie przeprowadzi się w odpowiednich warunkach. W celu oznaczenia aktywności aminopeptydazy cystynyłowej do układu należy dodać amastatynę, bestatynę lub metioninę. Aminopeptydaza cystynyłowa hydrolizuje też Ala-NNap, substrat służący do oznaczania aktywności mikrosomalnej aminopeptydazy alanyłowej. Nie wykazano natomiast hydrolizy Ala-pNA przez aminopeptydazę cystynyłową surowicy [21]. Z tego względu do oznaczania aktywności mAAP w surowicy oraz w moczu zaleca się użycie Ala-pNA [6].

Aminopeptydaza aspartyłowa (DAP) i aminopeptydaza glutamyłowa (EAP) hydrolizują peptydy z N-końcowym kwasem glutaminowym lub asparaginowym. Jednak DAP wymaga aktywacji jonami Mn<sup>+2</sup> i nie jest wrażliwa na EDTA. Związki te hamują natomiast aktywność aminopeptydazy glutamyłowej, która jest aktywowana jonami Ca<sup>+2</sup> [18].

Na wynik oznaczania aktywności aminopeptydazy tripeptydowej przy użyciu Leu-Gly-Gly wpływa obecność innych aminopeptydaz. Aktywność tego enzymu w surowicy krwi oznacza się więc w obecności amastatyny [22]. Aktywność rozpuszczalnej aminopeptydazy arginyłowej (sRAP) oznacza się przy użyciu Arg-NNap. Substrat ten jest hydrolizowany także przez aminopeptydazę glutamyłową (EAP), aminopeptydazę leucyłową (LAP) i lizosomalną aminopeptydazę arginyłową (katepsyna H). W celu oznaczenia aktywności sRAP i wyeliminowania wpływu LAP i EAP stosuje się amastatynę. Natomiast w celu odróżnienia aktywności tego enzymu od lizosomalnej aminopeptydazy arginyłowej stosuje się 0,1 mM bestatynę, która znosi aktywność sRAP [16]. Ponadto rozpuszczalna aminopeptydaza arginyłowa hydrolizuje

jedynie nieznacznie Leu-NNap, podczas gdy lizosomalna aminopeptydaza argynylowa hydrolyzuje ten substrat ze znaczną szybkością.

## LITERATURA

- [1] ABRAMIC M, VITALE L. New chloride-activated aminopeptidase from human erythrocytes. *FEBS* 1989; **253**: 79–82.
- [2] BAUSBACK HH, CHURCHILL L, WARD PE. Angiotensin metabolism by cerebral microvascular aminopeptidase A. *Biochem Pharmacol* 1988; **37**: 155–160.
- [3] BENTER JF, HIRSH EM, TUCHMAN AJ, WARD PE. N-terminal degradation of low molecular weight opioid peptides in human cerebrospinal fluid. *Biochem Pharmacol* 1990; **40**: 465–472.
- [4] BURLEY SK, DAVID PR, LIPSCOMB WN. Leucine-aminopeptidase-bestatin inhibition and a model for enzyme-catalyzed peptide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6916.
- [5] CHURCHILL L, BAUSBACK HH, GERRISTEN ME, WARD PE. Metabolism of opioid peptides by cerebral microvascular aminopeptidase M. *Biochim Biophys Acta* 1987; **923**: 35–41.
- [6] FLANDORIS CH, LAHET CH, FELDMAN D, GABASTON JM, GONNON A, MAIRE I. Urinary alanine aminopeptidase assay improved as result of multivariate response-surface analysis. *Clin Chem* 1988; **34**: 954–957.
- [7] HARBECK HT, MENTLEIN R. Aminopeptidase P from rat brain. Purification and action on bioactive peptides. *Eur J Biochem* 1991; **198**: 451–458.
- [8] HARBESON SL, RICH DH. Inhibition of arginine aminopeptidase by bestatin and arphamenine analogues. Evidence for a new mode of binding to aminopeptidases. *Biochemistry* 1988; **27**: 7301–7310.
- [9] HELENE A, BEAUMONT A, ROQUES BP. Functional residues at the active site of aminopeptidase N. *Eur J Biochem* 1991; **196**: 385–393.
- [10] HENDRIKS D, DEMEESTER I, UMIEL T, VANHOOF G, VAN SANDE M, SCHARPE S, YARON A. Aminopeptidase P and dipeptidyl peptidase IV activity in human leukocytes and in stimulated lymphocytes. *Clin Chim Acta* 1991; **196**: 87–96.
- [11] HOOPER NM, HRYSZKO J, TURNER J. Purification and characterization of pig kidney aminopeptidase P. *Biochem J* 1990; **267**: 509–515.
- [12] ISHIURA S, NOJIMA M, FUNABASHI H, OKUYAMA T, SUGITA H. Comparative studies of aminopeptidases in human placenta and pregnant serum. [w] Tomoda Y (red.) Placental and endometrial proteins, Utrecht, Netherlands VSP Press, 1988: 291–294.
- [13] LASCH J, KOELSCH R, STEINMETZER T, NEUMANN U, DEMUTH HU. Enzymic properties of intestinal aminopeptidase P: a new continuous assay. *FEBS Letters* 1988; **227**: 171–174.
- [14] MALFROY B, KADO-FONG H, GROS C, GIROS B, SCHWARTZ JC, HELLMISS R. Molecular cloning and amino acid sequence of rat kidney aminopeptidase M: a member of a super family of zinc-metallohydrolases. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **161**: 236–241.
- [15] MANTLE D, LAUFFART B, MCDERMOTT J, GIBSON A. Characterization of aminopeptidases in human kidney soluble fraction. *Clin Chim Acta* 1990; **187**: 105–114.
- [16] MCDONALD JK, BARRETT AJ. Mammalian proteases. A Glossary and bibliography. 2. Exopeptidases. Academic Press 1986.
- [17] MCDONALD JK, SCHWABE C. Intracellular exopeptidases. [w] Barrett AJ (red.) Proteinases in mammalian cells and tissues. North-Holland Publ Co Amsterdam 1977: 311–391.
- [18] OKUYAMA T, ISHIURA S, NOJIMA M, TSUKAHARA T, YANAGIDA M, SUGITA H. Aminopeptidase A in human placenta and pregnant serum. *Clin Chim Acta* 1991; **196**: 207–216.
- [19] OLSEN J, COWELL GM, KONIGSHOFERE, DANIELSEN M, MOLLER J, LAUSTEN L, HANSEN OC, WELINDERK G, ENGBERG J, HUNZIKER W, SPIESS M, SJOSTROM H, NOREN O. Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS Lett* 1988; **238**: 307–314.
- [20] PALMIERI FE, BAUSBACK HH, WARD PE. Metabolism of vasoactive peptides by vascular endothelium and smooth muscle aminopeptidase M. *Biochem Pharmacol* 1989; **38**: 173–180.
- [21] SANDERINK GJ, ARTUR Y, SCHIELE F, GUEGUEN R, SIEST G. Alanine aminopeptidase in serum: biological variations and reference limits. *Clin Chem* 1988; **34**: 1422–1426.
- [22] SANDERINK GJ, ARTUR Y, SIEST G. Human aminopeptidases: a review of the literature. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; **26**: 795–807.



- [23] SANSOT JL, PHILIPPON CL, COLLE A, PREVOT D, MANUEL Y. Isolation and characterization of rat kidney alanine aminopeptidase. *Enzyme* 1986; **35**: 18–26.
- [24] SCHARPE SL, VANHOOF GC, DEMEESTER IA, HENDRIKS DF, VANSANDE ME, MUYLLE LM, YARON A. Exopeptidases in human platelets: an indication for proteolytic modulation of biologically active peptides. *Clin Chim Acta* 1990; **195**: 125–132.
- [25] TERMIGNONI C, FREITAS JO, GUIMARAES JA. Methionyl aminopeptidase from rat liver: distribution of the membrane-bound subcellular enzyme. *Mol Cell Biochem* 1991; **102**: 101–113.
- [26] TURZYNSKI A, MENTLEIN R. Prolyl aminopeptidase from rat brain and kidney. Action on peptides and identification as leucyl aminopeptidase. *Eur J Biochem* 1990; **190**: 509–515.
- [27] VANHA-PERTTULA T. Dipeptidyl peptidase III and alanyl aminopeptidase in the human seminal plasma: origin and biochemical properties. *Clin Chim Acta* 1988; **177**: 179–196.
- [28] VANHOOF G, DEMEESTER I, GOOSSENS F, HENDRIKS D, SCHARPE S, YARON A. Kininase activity in human platelets: cleavage of the Arg-Pro bond of bradykinin by aminopeptidase P. *Biochem Pharmacol* 1992; **44**: 479–487.
- [29] WARD PE, BENTER IF, DIC L, WILK S. Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase M. *Biochem Pharmacol* 1990; **40**: 1725–1732.
- [30] WARD PE, CHOW A, DRAPEAU G. Metabolism of bradykinin agonists and antagonists by plasma aminopeptidase P. *Biochem Pharmacol* 1991; **42**: 721.
- [31] YAMAMOTO M, ISHIURA S, SUGITA H. Chloride-activated cystine aminopeptidase: a new enzyme in human skeletal muscle. *Biomedical Research* 1988; **9**: 11–19.
- [32] YAMASHITA K, TACHIBANA Y, MATSUDA Y, KATUNUMA N, KOCHIBEN, KOBATA A. Comparative studies of the sugar chains of aminopeptidase N and dipeptidase IV purified from rat kidney brush border membrane. *Biochemistry* 1988; **27**: 5565–5573.
- [33] ZAITSEV VT, GUBSKY VI, GRIGORYEVA NS, KOSENKO OP. Diagnostic significance of the blood serum leucine aminopeptidase activity in hepatobiliary diseases. *Lab Deto* 1988; **2**: 54–57.

Otrzymano: 24.02.1993 r.

Przyjęto: 07.05.1993 r.

Adres autora: ul. Mickiewicza 2, 15-230 Białystok.





# CELOWANE MODYFIKOWANIE GENOMU SSAKÓW

## GENE TARGETING IN THE MAMMALIAN GENOME

Michał HETMAN

Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, Warszawa

*Streszczenie.* W ciągu ostatnich 5 lat rozwinięto nową technikę genetyki molekularnej umożliwiającą wprowadzanie zmian genetycznych w ściśle określone miejsca genomu komórek ssaków. U myszy stało się również możliwe przeniesienie takich zmian na poziom organizmu. Dotąd w rękach badaczy nie było narzędzia, które pozwalałoby badać bezpośrednio funkcję poszczególnych fragmentów informacji genetycznej *in vivo*, z zachowaniem fizjologicznej struktury genomu. Nie było też narzędzia, które czyniłoby wykonalnym naprawienie dominującej mutacji powodującej chorobę genetyczną. Teraz takie narzędzie istnieje i nazywa się celowanym modyfikowaniem genomu (*gene targeting*). Poniższy artykuł przedstawia zasady jego działania oraz niektóre wyniki zastosowań.

*Słowa kluczowe:* celowane modyfikowanie genomu, homologiczna rekombinacja, zarodkowe komórki macierzyste, myszy

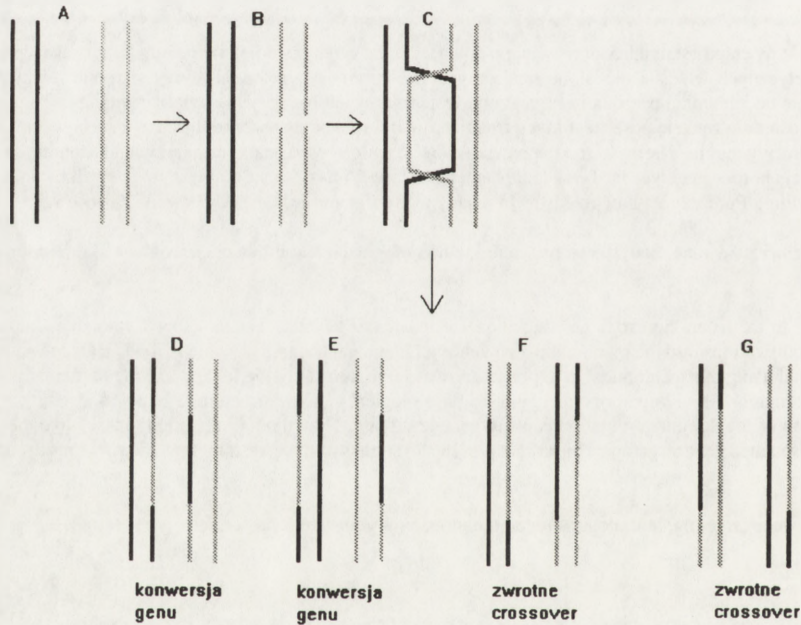
*Summary.* In the recent 5 years a new technique of molecular genetics was developed. It enables introduction of targeted modifications into the mammalian cell genome. In mice it became possible to modify the genome of the whole animal using this technique. Up to now there was no tool to study the function of the particular pieces of the genetic information *in vivo* without changing the physiological genome structure. There was also no tool enabling the correction of the dominant mutation causing genetic disease. Now the tool making the tasks like these feasible exists and is named gene targeting. This article presents the tenets of the gene targeting and some results of its usage.

*Keywords:* gene targeting, homologous recombination, embryonic stem cells, mice

## W CELOWANYM MODYFIKOWANIU GENOMU WYKORZYSTUJE SIĘ PROCES HOMOLOGICZNEJ REKOMBINACJI

Homologiczna rekombinacja jest procesem polegającym na interakcji pomiędzy dwoma cząsteczkami DNA o identycznych sekwencjach. Interakcja taka kończy się wzajemną wymianą fragmentów cząsteczek. Wskutek tego produktem homologicznej rekombinacji są cząsteczki DNA składające się z elementów obydwu substratów.

Istnieją obecnie dwa podstawowe modele wyjaśniające dane doświadczalne na temat zjawiska homologicznej rekombinacji: model Meselona i Raddinga [45,60] lepiej tłumaczący rekombinację u bakterii oraz model naprawy dwuniciowych przerw DNA (*double-strand-break repair*), który lepiej wyjaśnia dane na temat rekombinacji u *Eukaryota* [60,70,79]. Drugi z tych modeli został w uproszczeniu przedstawiony na rysunku 1. Warunkiem zajścia homologicznej rekombinacji jest pojawienie się dwuniciowej przerwy w ciągłości jednej z cząsteczek DNA biorącej udział w reakcji. Kompleks powstały w wyniku rozpoznania się homologicznych sekwencji dwóch cząsteczek DNA i utworzenie przez nie dwóch wiązań Hollidaya [60,70] może dać początek dwojakiego rodzaju produktom. Pierwszy jest wynikiem rozwiązania kompleksu szlakiem konwersji genu (*gene conversion*), drugi powstaje poprzez zwrotny proces *crossover* (*reciprocal crossover event*). Wszystkie etapy homologicznej rekombinacji (rozpoznanie homologicznych sekwencji, utworzenie kompleksu i jego rozdzielenie) wymagają udziału enzymów składających się na komórkowy aparat homologicznej rekombinacji.



Rys. 1. Uproszczone przedstawienie modelu naprawy dwuniciowych przerw DNA: (A) dwie homologiczne sekwencje odnajdują się i ustawiają obok siebie (jedna z cząsteczek jest w kolorze czarnym, druga jaśniejsza); (B) dwuniciowe przerwanie ciągłości jednej z cząsteczek; (C) utworzenie kompleksu składającego się z obydwu cząsteczek połączonych dwoma wiązaniami Holliday'a; (D) kompleks jest rozwiązywany przez cięcia poszczególnych nici DNA z utworzeniem 2 zrekombinowanych cząsteczek DNA; mogą to być cząsteczki powstałe w wyniku rozwiązania kompleksu szlakiem konwersji genu (E, F) lub szlakiem zwrotnego zjawiska *crossover* (G, H)

Homologiczna rekombinacja jest zjawiskiem powszechnym u wszystkich organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Umożliwia naprawę uszkodzeń DNA, a także tworzenie



nowych jakości genetycznych w procesie rekombinacji towarzyszącemu mejozie [4,45,60,70,79].

Homologiczna rekombinacja została wykorzystana do wprowadzania zmian genetycznych w ściśle określone miejsca genomów komórek i organizmów, a technikę tę nazwano celowym modyfikowaniem genomu (*gene targeting*).

## EGZOGENNY DNA MOŻE BRAĆ UDZIAŁ W HOMOLOGICZNEJ REKOMBINACJI

Jeżeli do komórek ssaków zostaje wprowadzony z zewnątrz DNA o danej sekwencji, jego los może być dwojaki :

1) większość komórek hydrolizuje egzogeny kwas nukleinowy, który w ten sposób podlega całkowitej degradacji ,

2) mała część komórek integruje obcą cząsteczkę DNA do swojego genomu i przekazuje ją potem potomnym komórkom [57,60].

Integracja egzogenego DNA przebiega w sposób przypadkowy, a więc nie dający się przewidzieć. Jeżeli wprowadzany przez eksperymentatora DNA zawiera sekwencje homologiczne do jakichś części genomu komórki, to możliwe jest również zajście zjawiska homologicznej rekombinacji pomiędzy egzo- i endogennymi homologicznymi sekwencjami. Wynikiem takiego procesu będzie integracja egzogenego DNA w to miejsce genomu, gdzie istniała homologia sekwencji. Stwarza to możliwość wprowadzania egzogenego DNA do genomów komórek w sposób kontrolowany i powtarzalny. Tego właśnie wymaga praca w systemach złożonych, jakimi niewątpliwie są genomy ssaków.

Zjawisko homologicznej rekombinacji wykorzystywano od dość dawna do kontrolowanego i powtarzalnego wprowadzania modyfikacji do genomu drożdży [4,60,70]. U drożdży praktycznie każda egzogenna, homologiczna, liniowa cząsteczka DNA integruje się w genom poprzez homologiczną rekombinację, a więc w sposób ukierunkowany.

Komórki ssaków okazały się być układem doświadczalnym, w którym wykorzystanie homologicznej rekombinacji do wprowadzania celowanych zmian genomu jest znacznie trudniejsze niż w drożdżach. Podstawową przeszkodą jest niska częstość zachodzenia zjawiska homologicznej rekombinacji pomiędzy egzogennymi fragmentami DNA a genomem komórek [4,8,39,60]. Inaczej niż u drożdży, w komórkach ssaków przypadkowa integracja dominuje nad celowaną integracją przez homologiczną rekombinację [4,8,39,60]. Mimo tych trudności udało się opracować sposoby wyławiania rzadkich zjawisk integracji egzogenego DNA do genomu przez homologiczną rekombinację w komórkach ssaków. Pierwsze dowody świadczące o wykonalności doświadczeń wykorzystujących celowane wprowadzanie obcego materiału genetycznego do genomu organizmów wyższych przez homologiczną rekombinację zostały dostarczone w połowie lat osiemdziesiątych [4]. Pierwsze dane uzyskano badając homologiczną rekombinację pomiędzy egzogennym DNA a sztucznie utworzonymi loci genomu [4]. Obydwie homologiczne sekwencje były genem markerowym, tj. takim, którego obecność można łatwo stwierdzić przez odpowiednią selekcję. Zarówno genomowa, jak i wprowadzana kopia były нефункционалне poprzez celowo zaplanowane mutacje. Tylko homologiczna rekombinacja mogła odtworzyć funkcjonalny gen markerowy i umożliwić komórkom przeżycie w warunkach selekcji. Homologiczna rekombinacja odtwarzająca gen

markerowy zachodzi z częstością  $10^{-3}$ – $10^{-7}$ . Stosunek homologicznej do niehomologicznej rekombinacji oszacowano na  $10^{-2}$ – $10^{-5}$ .

Udało się również pokazać, że egzogenny DNA może brać udział w homologicznej rekombinacji z sekwencjami genów naturalnie występujących w genomie [16,66,74]. Capecchi i Thomas przeprowadzili doświadczenia, w których wykazali zachodzenie homologicznej rekombinacji pomiędzy egzogennymi i naturalnymi endogennymi sekwencjami locus *hprt* w mysich zarodkowych komórkach macierzystych (*embryonic stem cells*, *ES cells*) [74]. Skonstruowali fragment DNA składający się z kilku tysięcy par zasad sekwencji homologicznej do genu fosforybozylotransferazy hipoksantyno-guanidynowej (HPRT). Enzym HPRT bierze udział w metabolizmie puryn. Jego brak może być korzystny dla komórek, jeśli w pożywce obecna jest 6-tioguanina (6-TG). Związek ten jest bowiem aktywowany przez HPRT do cytotoksycznej pochodnej. Sekwencja odcinka kodującego genu *hprt* zawarta w skonstruowanej cząsteczce DNA została zmodyfikowana. Wprowadzono mutację typu nonsensowego (*kodon stop*) przerywającą translację białka blisko punktu jej inicjacji. Jeżeli taki fragment DNA zostanie wprowadzony do komórek i ulegnie integracji z ich genomem drogą homologicznej rekombinacji, to do locus *hprt* zostanie wprowadzona mutacja nonsensowa. Uniemożliwia ona tworzenie aktywnego produktu genu. Gen *hprt* jest na chromosomie X. Jeżeli używa się komórek o kariotypie XY, wystarczy jedno zjawisko celowanej integracji wprowadzonego DNA o zmodyfikowanej sekwencji, żeby pozabawić komórkę aktywności HPRT. W warunkach selekcji z 6-TG tylko takie komórki będą w stanie przeżyć. W takim układzie doświadczalnym pokazano, że stosunek częstości integracji celowanej do przypadkowej w locus *hprt* komórek ES wynosi w optymalnych warunkach 1/950 [74].

## WEKTORY DO CELOWANEGO MODYFIKOWANIA GENOMU ZAWIERAJĄ SEKWENCJE HOMOLOGICZNE Z GENOMEM, SEKWENCJE MARKEROWE ORAZ SEKWENCJE MODYFIKUJĄCE

Egzogenne cząsteczki DNA, którymi chcemy wprowadzać modyfikacje do genomu przez homologiczną rekombinację ( w sposób celowany) muszą być odpowiednio zbudowane.

Takie wektory muszą zawierać sekwencje homologiczne do określonych miejsc genomu, które chcemy modyfikować. Te odcinki homologiczne służą jako jeden z substratów dla homologicznej rekombinacji. Decydują o tym, do jakiego miejsca w genomie dostarczone będą modyfikacje informacji genetycznej.

W ogromnej większości przypadków zastosowania techniki celowanego modyfikowania genomu niemożliwa jest bezpośrednia selekcja “wyławiająca” zjawiska homologicznej rekombinacji ( patrz pkt.2, s. 219). Zwykle wprowadzane modyfikacje nie przejawiają się jako cechy fenotypowe, które można wykorzystać do prowadzenia selekcji. Ze względu na wspomnianą powyżej rzadkość homologicznej rekombinacji, konieczne jest więc umieszczenie w wektorze sekwencji umożliwiających postępowanie selekcyjne. Tylko w ten sposób można odszukać klony komórkowe, w których zaszło pożądane zjawisko celowanej integracji wektora z genomem.

Wyżej wymienione elementy składowe wektora do celowanego modyfikowania genomu służą przekazaniu pod właściwy “adres” zmienionej informacji genetycznej oraz odszukanie



komórek, które odebrały taką “przesyłkę”. Każdy wektor będzie więc jeszcze zawierał sekwencje kodujące tę zmienioną informację, czyli sekwencje modyfikujące genom.

## WEKTORY DO CELOWANEGO MODYFIKOWANIA GENOMU MOGĄ ULEGAĆ INSERCJI W HOMOLOGICZNE LOCUS Z JEGO DUPLIKACJĄ LUB INTEGROWAĆ SIĘ W NIE PRZEZ ZASTĄPIENIE SEKWENCJI HOMOLOGICZNEJ W GENOMIE SWOJĄ SEKWENCJĄ

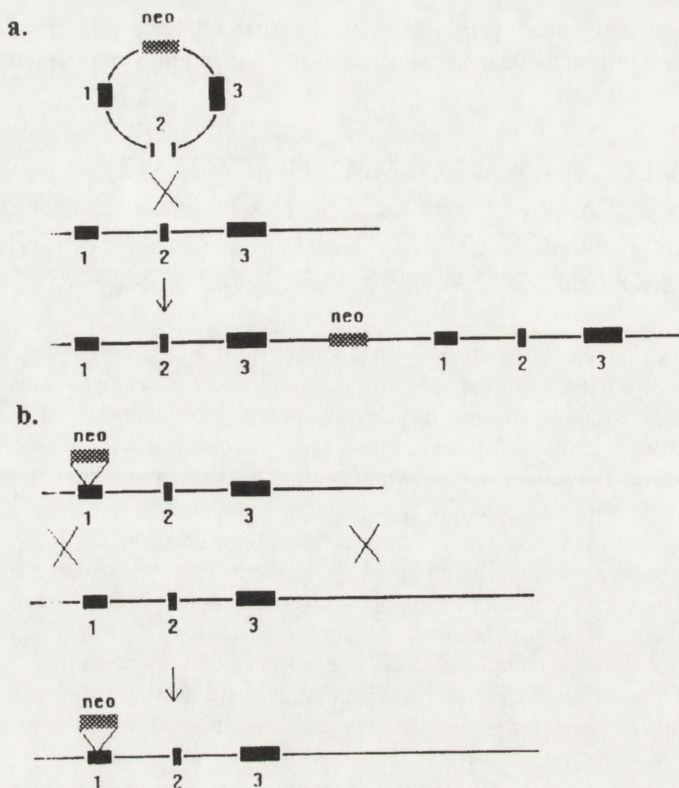
Istnieją dwa rodzaje wektorów do celowanego modyfikowania genomu: wektory insercyjne (*insertion targeting vector*) oraz wektory zastępujące (*replacement targeting vector*) [8,18,24,39,60,74]. Zasada budowy obu tych rodzajów wektorów została przedstawiona na rysunku 2. Wektory insercyjne są linearyzowane w obrębie sekwencji homologicznych. Pojedyncze zjawisko typu zwrotnego *crossover* (patrz wyżej) powoduje insercję takiego wektora w homologiczne locus genomu. Następuje przy tym duplikacja sekwencji homologicznych. Wektory typu zastępujących są linearyzowane poza obrębem homologii. Włączenie w homologiczne locus genomu następuje przez proces typu konwersji genu lub podwójnego zwrotnego *crossover*. Efektem jest zastąpienie sekwencji homologicznych genomu przez ich odpowiedniki zawarte w wektorze.

Obydwa typy wektorów miałyby działać z jednakową efektywnością w komórkach ES myszy [74,75]. Donoszono o istnieniu różnic na korzyść wektorów typu insercyjnego [24]. Wektory zastępujące są obecnie rutynowo używane. Decyduje o tym łatwiejsza konstrukcja cząsteczki wektora tego typu.

W warunkach stosowanych standardowo, integracja wektora jest najczęściej procesem prowadzącym do pojawienia się pożądanej zmiany w rekombinowanym locus [8,84]. Spora-dycznie tylko obserwuje się dodatkowe mutacje [84]. Jest to szczególnie ważne, jeśli mutacje nieinaktywujące mają być wprowadzone przez homologiczną rekombinację.

## WEKTORY DO CELOWANEGO MODYFIKOWANIA GENOMU REKOMBINUJĄ NAJWYDAJNIEJ W POSTACI LINIOWEJ

Wektory obydwu typów są wprowadzane do komórek jako liniowe cząsteczki DNA. W komórkach eukariotycznych, w tym komórkach ES, wolne końce DNA sprzyjają zachodzeniu homologicznej rekombinacji [4,23,60]. Jest to zgodne z modelem homologicznej rekombinacji przedstawionym powyżej. Zakłada on ścisły związek homologicznej rekombinacji z mechanizmami naprawy DNA [60,70,79]. Wolne końce w obrębie sekwencji homologicznych mają szczególnie pozytywny wpływ na częstość homologicznej rekombinacji [23,24].



Rys. 2. Dwa rodzaje wektorów do celowanego modyfikowania genomu: (a) wektor insercyjny jest przerwany w obszarze homologii, jego integracja z genomem w procesie homologicznej rekombinacji (pojedyncze zwrotne *crossover* lub konwersja genu) doprowadza do duplikacji homologicznych sekwencji w genomie i wprowadzenia sekwencji obcych (*neo* - bakteryjny gen oporności na neomycynę) do locus; (b) wektor zastępujący ma dwa nieprzerwane ciągi homologii (ramiona) rozdzielone sekwencjami niehomologicznymi (gen *neo*), w wyniku podwójnego zwrotnego *crossover* lub konwersji genu dochodzi do zaąpienia sekwencji locus sekwencjami homologicznymi wektora oraz insercji odcinka niehomologicznego (*neo*)

## PREFEROWANĄ METODĄ WPROWADZANIA WEKTORA DO KOMÓRKI JEST ELEKTROPORACJA

Spośród wielu dostępnych metod wprowadzania DNA do komórek w technice celowanego modyfikowania genomu stosuje się elektroporację. Elektroporacja wykorzystuje działanie impulsu prądu elektrycznego na komórki [57,76]. Pod jego wpływem do wnętrza komórek dostaje się egzogenny DNA. Elektroporacja pozwala na jednoczesne manipulowanie dużą liczbą komórek. Odpowiednio dobierając warunki elektroporacji można uzyskać integrację do genomu komórki tylko jednej cząsteczki wprowadzanego DNA [39,57,74]. Z tych powo-



dów elektroporacja jest metodą z wyboru w przypadku celowanego modyfikowania genomu. Warto wspomnieć o eksperymentach Zimmera i Grusa, którzy uzyskali bardzo wysoką efektywność homologicznej rekombinacji w locus genu *hox1.1* stosując mikroiniekcję DNA do komórek ES myszy [87]. 10–20% komórek poddanych mikroiniekcji zawierało celowane modyfikacje w locus *hox-1.1*. Trudności techniczne związane ze stosowaniem mikroiniekcji sprawiają jednak, że nie jest to metoda rutynowo używana w celowanym modyfikowaniu genomu.

## O EFEKTYWNOŚCI WEKTORA DECYDUJE JAKOŚĆ ORAZ ILOŚĆ SEKWENCJI HOMOLOGICZNYCH

Homologiczna rekombinacja egzogenego DNA z genomem jest procesem stosunkowo rzadkim. Tym bardziej ważnym jest więc zidentyfikowanie czynników, które mają wpływ na częstość homologicznej rekombinacji. Okazało się, że o częstości zachodzenia procesu homologicznej rekombinacji decyduje głównie jakość oraz liczba sekwencji homologicznych zawartych w wektorze. Częstość homologicznej rekombinacji bardzo różni się zależnie od locus. Przykładem takich rozbieżności może być różnica częstości osiągnięta przy celowanym modyfikowaniu locus *PrP* [7] i *Rb-1* [27] w komórkach ES myszy. Stosunek celowanych modyfikacji odpowiednich genów do przypadkowej integracji wektora wynosił 1/5000 [7] i 1/30 [27]. Powstanie takich różnic przypisuje się m.in. różnej aktywności transkrypcyjnej genów [8,18], różnej strukturze chromatyny [8,18] czy obecności sekwencji stymulujących proces homologicznej rekombinacji, takich jak nadzmiennie sekwencje minisatelitarne [82].

Duże różnice w częstości homologicznej rekombinacji powstają w wyniku zastosowania w wektorach sekwencji homologicznych pochodzących z różnych szczepów danego gatunku zwierząt doświadczalnych. Skonstruowano cząsteczki wektora oparte na DNA izogenicznym, czyli pochodzącego z tego samego szczepu, z którego pochodzą komórki, w których będzie użyty wektor. Częstość homologicznej rekombinacji z udziałem takiego wektora znacznie wzrastała w danych komórkach. Zostało to dobrze udokumentowane dla locus *Rb-1* i *hprt* w komórkach ES [15,71].

Innym, istotnym czynnikiem wpływającym na częstość homologicznej rekombinacji jest wielkość bloku homologii zawartego w wektorze. Zależność między tymi parametrami jest mniej więcej wykładnicza [15,22]. Nie tylko ilość, ale i rozmieszczenie homologicznych sekwencji może być ważne. Symetryczne rozmieszczenie bloków homologii w stosunku do elementów niehomologicznych sprzyja efektywnemu działaniu wektorów zastępujących [75].

Są pewne dane świadczące o tym, że długość odcinka sekwencji niehomologicznych, które chcemy wprowadzić przy pomocy wektora do genomu, nie wpływa na częstość zjawiska homologicznej rekombinacji w komórkach ES [41].

## CELOWANE MODYFIKACJE GENOMU NIE MUSZĄ MIEĆ ZNACZENIA SELEKCYJNEGO, ŻEBY MOĞŁY BYĆ ODNALEZIONE

W przypadku znakomitej większości zastosowań techniki celowanego modyfikowania genomu wprowadzane zmiany nie mają znaczenia selekcyjnego. Niemożliwa jest więc łatwa identyfikacja pożądanych zmian w genomie tak jak to opisano dla locus *hprt* (patrz pkt.2, s.

219). Opracowano metody pozwalające odnaleźć rzadkie zdarzenia homologicznej rekombinacji, które nie powodują zmian fenotypowych mogących łatwo służyć selekcji.

Obecnie istnieją trzy podstawowe strategie selekcyjne tego typu. • Pierwsza, o charakterze selekcji pozytywnej wyławia wszystkie zdarzenia stabilnej integracji wektora w genom (via przypadkowa integracja i via homologiczna rekombinacja). • Druga, również oparta o selekcję pozytywną identyfikuje tylko homologicznie rekombinowane klony. • Trzecia stanowi połączenie selekcji pozytywnej z negatywną i umożliwia wybiórcze selekcionowanie klonów zrekombinowanych.

- Strategia pierwsza zakłada wprowadzenie w wektorze genu markerowego, który może podlegać ekspresji w danych komórkach (gen ten ma własne elementy regulujące, rysunek 4). Komórki, które mają kopię markera włączoną w genom mogą przeżyć w warunkach bezwzględnie wymagających jego obecności. Najbardziej rozpowszechnionym genem markerowym w technice celowanego modyfikowania genomu jest bakteryjny gen kodujący fosfotransferazę neomycyny (gen warunkujący oporność na neomycynę, NeoR) wraz z elementami kontrolującymi umożliwiającymi ekspresję w komórkach ES (tak zbudowany jest popularny plasmid pMC1Neo) [74]. Produkt genu oporności neomycynowej inaktywuje neomycynę, a także jej analog G418, toksyczny dla komórek eukariotycznych. Stosując G418 można łatwo wyselekcjonować klony mające kopię genu oporności neomycynowej. Selekcja “wyławia” wszystkie zjawiska stabilnej integracji wektora, zawierającego ten gen, do genomu.

Obok genu oporności neomycynowej stosuje się również gen oporności na hygromycynę B (HygR) [49] oraz gen HPRT [80].

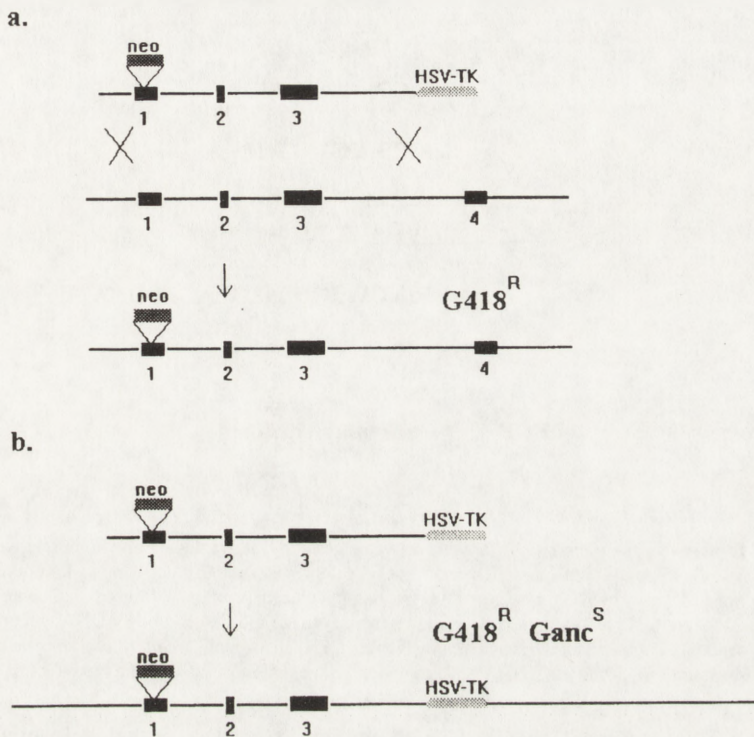
- Strategia druga wymaga użycia genu markerowego pozbawionego własnych sekwencji regulatorowych. Gen taki wbudowuje się w wektor w ten sposób, ażeby promotor locus, który ma być modyfikowany, mógł sterować jego transkrypcją. Promotor staje się dostępny dla genu markerowego dopiero po udanej integracji drogą homologicznej rekombinacji. Selekcja prowadzona na rzecz uzyskania markera prowadzi więc do izolacji klonów homologicznie rekombinowanych. Dzieje się tak dlatego, że “znalezienie” przez gen markerowy promotora poprzez przypadkową integrację jest mało prawdopodobne [72]. Ta bardzo efektywna strategia wymaga spełnienia trzech dodatkowych warunków, które powodują istotne ograniczenia w jej stosowaniu [72]. Po pierwsze ekspresja genu markerowego jest uzależniona od tego, czy promotor modyfikowanego locus jest aktywny w komórkach, w których prowadzimy selekcję. Jeżeli locus, które modyfikujemy, nie ulega ekspresji w selekcionowanych komórkach, metoda ta nie może być stosowana. Po drugie gen markerowy musi być umieszczony w odpowiedniej fazie ramki odczytu modyfikowanego locus tak, aby mógł podlegać translacji. Po trzecie gen markerowy, który korzysta z obcych sekwencji inicjujących transkrypcję i translację, tworzy produkt będący fuzją z produktem locus poddanego modyfikacjom. Produkt genu markerowego musi pozostać aktywny w tych warunkach.

Jako geny markerowe stosowano w tej strategii m.in. gen *NeoR* [28,72], gen *HygR*[72], gen *lacZ* [34] [41] oraz gen ludzkiego hormonu wzrostu [26].

- Strategia trzecia, zwana selekcją pozytywno-negatywną (*positive negative selection*) [8,39,40], wymaga użycia dwóch genów markerowych. Pierwszy umożliwia przeżycie komórkom w warunkach selekcji (selekcja pozytywna). Drugi powoduje śmierć komórek, które go nabyły (selekcja negatywna). Obydwa geny mają własne sekwencje regulatorowe umożliwiające ekspresję w danych komórkach. “Pozytywny” marker (np. *NeoR*) jest wbudowany w sekwencje homologiczne wektora (rysunek 3). W procesie homologicznej rekombinacji



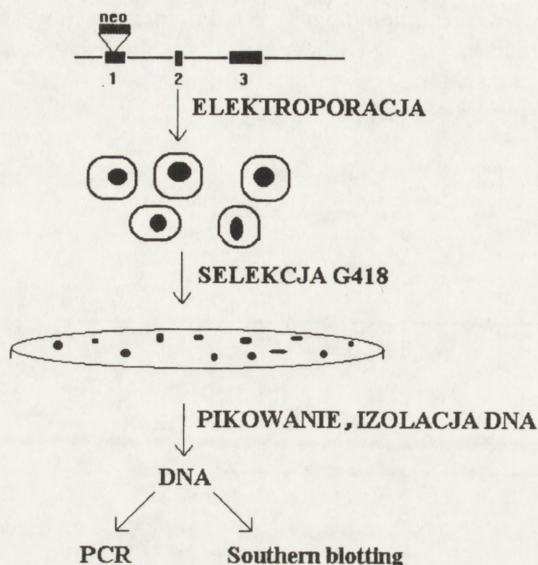
będzie więc integrowany do genomu. “Negatywny” marker jest dołączany do wektora w miejscu zakończenia sekwencji homologicznych. Po linearyzacji wektora marker “negatywny” jednym swym końcem przylega do sekwencji homologicznych, a drugim tworzy wolne zakończenie cząsteczki wektora.



Rys. 3. Strategia selekcji pozytywno-negatywnej, do końca obszaru homologii wektora zastępującego jest dołączony gen kinazy tymidynowej wirusa opryszczki (HSV-TK), w obszarze homologii znajduje się gen oporności neomycynowej bakterii (*neo*): (a) integracja wektora z genomem przez homologiczną rekombinację doprowadza do insercji genu *neo* do locus, sekwencje niehomologiczne poza obszarem homologii (gen *HSV-TK*) nie są integrowane do genomu, w efekcie komórki są odporne na pochodną neomycyny G418 i gancyklowir. (b) Przypadkowa integracja wektora do genomu wprowadza do niego zarówno gen *neo*, jak i HSV-TK, komórki są odporne na G418 i wrażliwe na Gancyklowir

Proces homologicznej rekombinacji nie umożliwia włączania brzeżnych sekwencji niehomologicznych do genomu. Mogą one dostać się do niego tylko przez proces przypadkowej integracji. Prowadząc selekcję, która z jednej strony pozwala przeżyć komórkom efektywnie integrującym DNA z genomem (pozytywna selekcja), z drugiej zaś eliminuje komórki mające negatywny marker włączony do genomu przez przypadkową integrację, można osiągnąć znaczne wzbogacenie populacji klonów homologicznie zrekombinowanych.

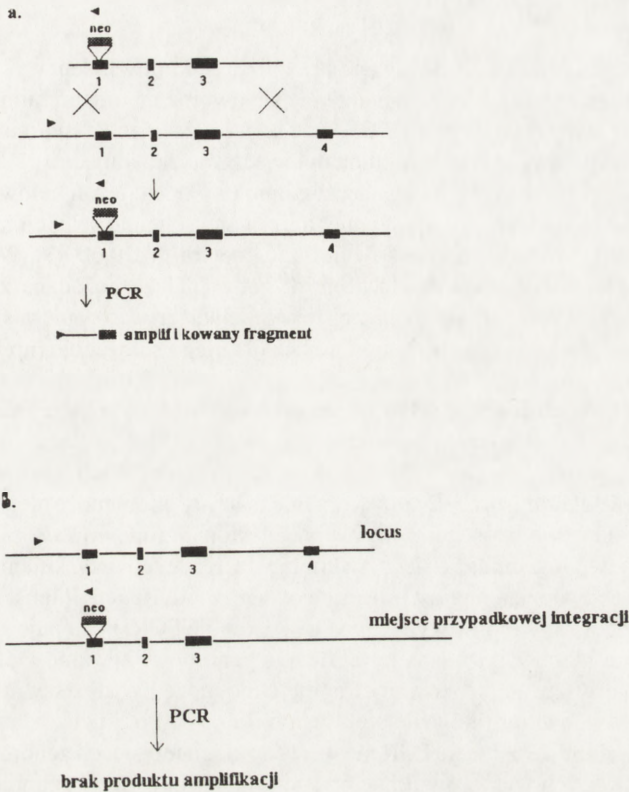
W przypadku locus *hprt*, zwiększenie częstotliwości pojawiania się homologicznych rekombinantów wśród komórek przeżywających selekcję było znaczne przy stosowaniu



Rys. 4. Często stosowana strategia doświadczalna celowanego modyfikowania genomu komórek; wektor jest wprowadzany do komórek drogą elektroporacji; selekcja z G418 doprowadza do izolacji klonów komórkowych zawierających stabilnie zintegrowany wektor w genomie (gen *neo* ma własny promotor), klony są izolowane i namnażane, część komórek zamraża się w płynnym azocie, a z pozostałych izoluje się genomowy DNA; genomowy DNA służy do analizy modyfikowanego locus przy pomocy technik PCR, a następnie *Southern blot*; można posłużyć się tylko metodą *Southern blot*; w ten sposób następuje identyfikacja klonów z pożądaną modyfikacją w genomie

jednego negatywnego markera [40]. 19 z 24 klonów, które przeżyły selekcję, miało celowaną modyfikację locus *hprt*. Dla locus *int-1* efektywność była znacznie gorsza: 1 klon z celowaną modyfikacją na 400 przeżywających podwójną selekcję [73]. Tak duży udział klonów o przypadkowej integracji wektora w populacji przeżywającej selekcję próbuje się wyjaśniać częstymi uszkodzeniami markerów negatywnych przed stabilną integracją wektora z genomem. Zastosowanie dwóch markerów negatywnych na obu końcach wektora znacznie podwyższa efektywność selekcji [10,11]. Ciągłe jednak nie osiąga się 100% wydajności. Odbiega ona też od tej, którą można by przewidywać z eksperymentów z jednym markerem negatywnym (kwadrat wzmocnienia z jednym markerem = wzmocnienie z dwoma) [39,73]. Nie są znane przyczyny tego zjawiska. Często stosowanym markerem negatywnym jest gen dla kinazy tymidynowej wirusa opryszczki (HSV-TK) [40]. Enzym ten aktywuje preparat przeciwwirusowy Gancyclovir, który blokuje syntezę DNA i prowadzi do śmierci komórki. Wygodnym markerem negatywnym, który nie wymaga stosowania żadnych środków selekcyjnych, jest gen łańcucha A toksyny błoniczej [34]. Strategia selekcji pozytywno-negatywnej była do niedawna bardzo rozpowszechniona. Obecnie odchodzi się od niej, ponieważ jej efektywność nie jest wysoka, a traktowanie komórek Gancyclovirem (czynnik selekcji negatywnej w przypadku najpopularniejszego markera negatywnego, genu HSV-TK), może pogarszać ich jakość [36].





Rys. 5. Zastosowanie techniki PCR do identyfikacji celowanych zmian w genomie, do amplifikowania *in vitro* genomowego DNA zastosowane są dwa oligonukleotydy starterowe; jeden ma sekwencję homologiczną z sekwencją endogenną, której nie ma w wektorze do celowanego modyfikowania genomu; drugi odpowiada sekwencji, która jest tylko w wektorze (gen *neo*): (a) homologiczna rekombinacja doprowadza do spotkania się miejsc hybrydyzacji obydwu starterów, tak że możliwa będzie amplifikacja sekwencji znajdujących się pomiędzy nimi; (b) przypadkowa integracja uniemożliwia powstawanie produktu reakcji PCR z użyciem powyższych starterów (sekwencje hybrydujące ze starterami są w różnych, odległych regionach genomu)

Bardzo dobre rezultaty można osiągnąć stosując prostą pozytywną selekcję i izogeniczne sekwencje homologiczne (czyli izolowane ze szczepu zwierząt laboratoryjnych, z którego pochodzą komórki do modyfikacji) [71]. Strategie wzbogacające mogą być jednak pomocne w modyfikowaniu loci szczególnie "opornych" na homologiczną rekombinację.

## BADANIE GENOMU UJAWNIA OBECNOŚĆ POŻĄDANYCH MODYFIKACJI

Klony, które przeszły selekcję, poddawane są analizie genomów celem wykazania obecności pożądanych zmian (rys. 4). Można posługiwać się dwoma metodami: amplifikacją DNA *in vitro* (*polymerase chain reaction, PCR*) [57] oraz hybrydyzacją molekularną (*Southern blot*) [57]. Należy podkreślić, że ta ostatnia metoda ma znaczenie decydujące.

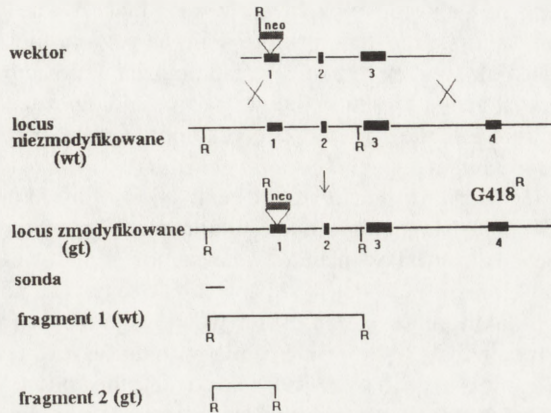
Amplifikacja DNA *in vitro* (PCR) jest szczególnie pomocna, jeżeli celowane modyfikowanie danego locus zachodzi mało efektywnie, a używany schemat selekcji nie prowadzi do skutecznej eliminacji klonów z przypadkowymi integracjami [8,39,60,83]. W takiej sytuacji konieczne jest zbadanie genomów wielu klonów, żeby znaleźć pożądaną zmianę. Zasada działania PCR w wykrywaniu homologicznej rekombinacji (rys. 5) opiera się na fakcie, iż celowana modyfikacja wprowadza do genomu obce dla niego sekwencje (np. geny markerowe). Amplifikacja fragmentu DNA przez PCR wymaga dwóch oligonukleotydów. Jeden z nich odpowiada sekwencji obecnej tylko w genomie komórki, w pobliżu miejsca integracji wektora. Drugi jest homologiczny do sekwencji obecnej tylko w wektorze i ulegającej wbudowaniu do genomu przez proces homologicznej rekombinacji. Tak więc celowana integracja wektora do genomu umożliwia stworzenie matrycy, która może ulegać amplifikacji. PCR jest metodą odpowiednio czułą, ażeby badać klony grupowo (*sib selection*). DNA izolowany z kilku klonów miesza się i wykonuje PCR. Jeżeli uzyskujemy amplifikację fragmentu DNA o przewidzianej przez proces celowanej modyfikacji długości, sporządza się mieszaninę DNA z połowy klonów wyjściowych i wykonuje PCR. Postępuje się w ten sposób aż do wyizolowania klonu z pożądaną modyfikacją genomu. Używanie PCR ma poważne ograniczenia. Po pierwsze, amplifikowany fragment nie może być dłuższy niż 2 kb (dłuższe fragmenty nie są zwykle amplifikowane efektywnie) [39,57]. Po drugie, zdarzają się wyniki fałszywie pozytywne [39]. Po trzecie PCR nie we wszystkich miejscach genomu działa dobrze [57]. Użycie efektywnych wektorów do celowanego modyfikowania genomu pozwala zrezygnować z użycia PCR.

Metodą o największym znaczeniu dla indentyfikowania celowanych modyfikacji w genomie jest analiza genomu metodą *Southern blot* [24,57]. Polega ona na hybrydyzacji znakowanych (np. radioaktywnie) cząsteczek DNA, zwanych sondami, z genomem strawionym odpowiednim enzymem restrykcyjnym. Można w ten sposób zidentyfikować fragmenty zawierające sekwencje homologiczne do sekwencji sondy. Obce dla genomu sekwencje zawarte w wektorze i podlegające wraz z nim celowanej integracji (geny markerowe) wprowadzają zawsze nowe miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne do modyfikowanego locus. Jeżeli DNA ze zrekombinowanego klonu zostanie strawiony enzymem restrykcyjnym, dla którego pojawiło się nowe miejsce cięcia (wraz ze zintegrowaną obcą sekwencją), powstanie fragment restrykcyjny o zredukowanej długości (rys. 6). Trawienie DNA enzymami, które nie rozpoznają żadnych nowych miejsc w obcych sekwencjach, spowoduje powstanie wydłużonego fragmentu restrykcyjnego (o obce sekwencje, normalnie nieobecne w genomie). Jeżeli zastosuje się odpowiednie sondy, te zmiany mogą zostać uwidocznione. Jako sondy stosuje się:

- 1) cząsteczki DNA homologiczne tylko z sekwencjami genomu niezawartymi w wektorze (obligatoryjnie), dzięki temu analizuje się tylko modyfikowane locus, a nie miejsca przypadkowej integracji,



2) cząsteczki DNA homologiczne z sekwencjami wektora – jako potwierdzenie celowanej modyfikacji oraz wykluczenie ewentualnych współistniejących przypadkowych integracji mogących niespecyficznie modyfikować fenotyp [24].



Ryb. 6. Zastosowanie metody *Southern blot* do identyfikacji celowanych zmian genomu; enzym restrykcyjny R tnie w dwóch miejscach w obrębie niezmienionego locus; integracja wektora do locus wprowadza dodatkowe miejsce rozpoznania i cięcia dla enzymu R; genomowy DNA pocięty enzymem R rozdzielono według wielkości fragmentów (przez elektroforezę na żelu agarozowym) i poddano hybrydyzacji ze znakowaną sondą, sonda odpowiada sekwencjom znajdującym się tylko w genomie (nie w wektorze); jeżeli mamy do czynienia z niezmodyfikowanym locus (*wt*), sonda wykrywa fragment o określonej długości; w przypadku locus zmodyfikowanego (*gt*) sonda będzie wykrywać fragment odpowiednio krótszy wskutek pojawienia się nowego miejsca cięcia enzymu R; ponieważ zwykle tylko jeden allel ulega modyfikacji, sonda wykryje w DNA ze zmodyfikowanych komórek obydwa fragmenty

Do trawienia DNA używa się takich enzymów restrykcyjnych, które rozpoznają przynajmniej jedno miejsce poza obszarem sekwencji homologicznych wektora (czyli miejsce występujące tylko w genomie) [24]. Zapewnia to specyficzną analizę modyfikowanego locus. Należy zastosować kilka enzymów i sond. Uzyskuje się w ten sposób potwierdzenie celowanego zmodyfikowania genomu [24]. Należy podkreślić, że diploidalna komórka ma dwie kopie locus, który ma być modyfikowany. Homologiczna rekombinacja jest zjawiskiem na tyle rzadkim, że identyfikowane klonów mają tylko jeden allel locus poddany rekombinacji z wektorem. Stąd analiza *Southern blotting* takich heterozygotycznych klonów wykaze obecność zarówno fragmentu restrykcyjnego charakterystycznego dla zrekombinowanego allelu locus, jak i fragmentu pochodzącego z drugiego allelu, bez modyfikacji (typ dziki). Stosunek intensywności hybrydyzacji obydwu fragmentów z sondą genomową powinien być jak 1/1 [24,74].

## TECHNIKĘ CELOWANEGO MODYFIKOWANIA GENOMU WYKORZYSTUJE SIĘ NAJCZĘŚCIEJ DO INAKTYWACJI GENÓW

Technika celowanego modyfikowania genomu znalazła dotychczas najszerze zastosowanie w bezpośrednim poznawaniu funkcji genów przez ich inaktywację [77,86]. Dzięki celowanym modyfikacjom stało się możliwe przeniesienie na poziom molekularny postulatów Claude'a Barnarda. Tak jak poprzez resekcję narządu można uzyskać bezpośredni wgląd w jego funkcję, tak resekcja genu i jej skutki mówią o jego fizjologicznej roli. Realizacja tego postulatu w genetyce molekularnej przyniosła bardzo obfite efekty i sprawiła, że mówi się coraz częściej o genetyce amputacyjnej (*knockout genetics*).

Modyfikację polegającą na inaktywacji genu jest stosunkowo łatwo wykonać [39,60,74,86]. W sekwencjach homologicznych wektora musi być zawarty odcinek kodujący genu (przynajmniej jeden ekson). Powinien to być ekson z początkowego odcinka genu, tak aby brak możliwości ekspresji sekwencji kodujących położonych za nim zapewniała wyłączenie aktywności produktu genu. W ten ekson wbudowuje się gen markerowy służący pozytywnej selekcji (rysunki 2, 3, 4, 5, 6). Spełnia on tutaj jeszcze jedno istotne zadanie: rozrywa otwartą ramkę odczytu genu wprowadzając do niej stop kodon. W procesie transkrypcji genu tworzy się więc mRNA, który zawiera insercję złożoną z genu markerowego. Poprzez wprowadzenie mutacji stop kodon proces translacji ulega zablokowaniu. Sekwencje kodujące locus położone 3' od stop kodonu nie mogą ulegać ekspresji.

Taka mutacja powinna być w stanie homozygotycznym, aby przejawić swe działanie (w rzadkich przypadkach już stan heterozygotyczny może się objawiać fenotypowo). Celowana modyfikacja zapewnia inaktywację tylko jednego allelu locus. Drugi allel można inaktywować posługując się wektorem, który zawiera inny gen markerowy (*double knockout*). W ten sposób inaktywano m.in. proto-onkogen *pim-1* [72] i gen hamującej podjednostki białka  $G\alpha_{i2}$  [49]. Posługując się komórkami ES myszy z modyfikacją tylko jednego allelu można przy pomocy technik embriologicznych i hodowlanych otrzymać zwierzęta homozygotyczne pod względem wprowadzonej mutacji [5,8,39,60,83,86](patrz pkt.13, s. 231)

## TECHNIKA CELOWANEGO MODYFIKOWANIA GENOMU UMOŻLIWIA WPROWADZANIE DROBNYCH MUTACJI TYPU PUNKTOWEGO

Celowane modyfikowanie genomu może również dotyczyć wprowadzania drobnych mutacji np. typu punktowego o charakterze substytucyjnym. Jest to jednak zadanie znacznie trudniejsze niż wprowadzanie insercji. Gen markerowy nie może znaleźć się w obrębie sekwencji kodujących. Jego obecność w odcinkach niekodujących jest również wysoce niewskazana ze względu na możliwość nieprzewidywalnego wpływania na ekspresję genu. Należy więc w ogóle zrezygnować z jego pojawienia się w zmodyfikowanym genie. Gen markerowy można wprowadzić do komórek obok wektora do celowanego modyfikowania genomu. DNA wprowadza się do komórek przez elektroporację. Komórki przeżywające pozytywną selekcję to komórki, w których doszło do stabilnej integracji genu markerowego do genomu. Niewielka część komórek wbudowuje obydwie cząsteczki DNA w ten sposób, że jedna z nich (wektor) jest integrowana przez homologiczną rekombinację. Przy pomocy tej



metody, zwanej koelektroporacją (ponieważ jednocześnie wprowadza się dwie cząsteczki DNA), udało się wprowadzić drobne mutacje do locus *hprt* [13]. Inne metody wprowadzania drobnych mutacji to np. strategie *hit and run* [21] oraz przeciwselekcja (*counterselection*) z użyciem genu markerowego *hprt* [80].

## TECHNIKĄ CELOWANEGO MODYFIKOWANIA GENOMU MOŻNA WPROWADZAĆ GEN REPORTEROWY W CELU ŚLEDZENIA WZORU EKSPRESJI MODYFIKOWANEGO LOCUS

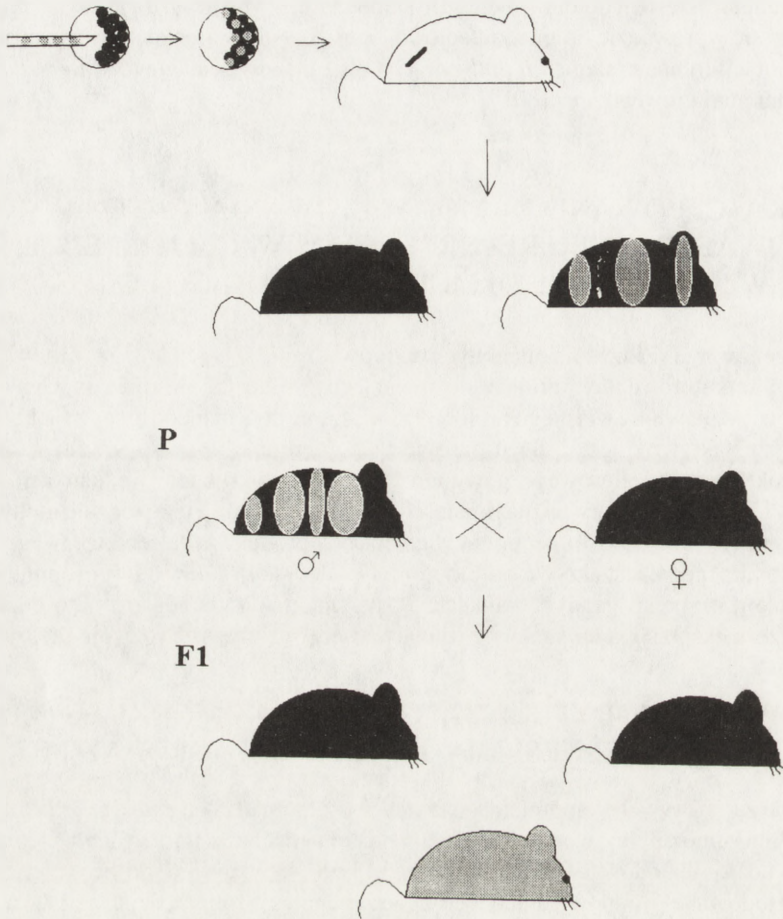
Oprócz genów markerowych potrzebnych do prowadzenie selekcji można wprowadzać do genomu geny reporterowe monitorujące ekspresję locus, w którym się znalazły. Gen reporterowy musi być pozbawiony własnego promotora, włączony do badanego locus z zachowaniem ramki odczytu i aktywny, jeżeli ulega translacji jako gen połączony z sekwencją kodującą locus. Produkt genu reporterowego powinien być łatwo wykrywalny w tkankach. Często stosuje się w tej roli gen bakteryjny dla  $\beta$ -galaktozydazy, *lacZ*. Jeżeli tego rodzaju modyfikację locus uda nam się przenieść do genomu zwierzęcia, to produkt genu reporterowego będzie obecny tylko tam, gdzie jest aktywny promotor locus. Uzyskuje się w ten sposób informację na temat wzoru ekspresji genu w tkankach. Postępując tak zademonstrowano odcinkowy charakter wzoru ekspresji genu *hox-3.1* z rodziny *homeobox* w czasie rozwoju myszy [34].

## CELOWANA MODYFIKACJA GENOMU KOMÓRKI ES MOŻE ZOSTAĆ PRZENIESIONA DO GENOMU ORGANIZMU

Używanie zarodkowych komórek macierzystych (komórek ES od *embryonic stem*) [8,18,-19,39,55,83,86] umożliwiło tworzenie zwierząt o celowanych modyfikacjach genetycznych. Dotychczas udało się hodować tylko mysie komórki ES [43,55]. Komórki ES są izolowane z zarodków. Hodowane w odpowiednich warunkach zachowują totipotencjalność. Oznacza to, że mogą zróżnicować się ku wszystkim tkankom organizmu, także komórkom rozrodczym. Zachowanie totipotencjalności komórek ES *in vitro* wymaga hodowli na fibroblastach zarodkowych [51] i/lub w obecności LIF (*leukemia inhibitory factor*) [65] w środowisku.

Komórki ES wprowadzone do blastocysty różnicują się w kierunku wszystkich tkanek zwierzęcia [5,8,18,19,39,83,86]. Powstają myszy hybrydowe złożone z komórek pochodzących z "rodzicielskiej blastocysty" oraz komórek o rodowodzie komórek ES (rys. 7). Gdy komórki ES dadzą początek komórkom rozrodczym, można wówczas poprzez hodowlę uzyskać pokolenie potomne ( $F_1$ ) hybrydy, w którym pojawią się osobniki całkowicie złożone z komórek o rodowodzie ES [6,8,18,19,39,83,86]. Identyczne manipulacje można wykonać z komórkami ES o zmodyfikowanym uprzednio genomie. Komórki takie są zwykle heterozygotyczne pod względem wprowadzanej mutacji (patrz wyżej) i dlatego ażeby uzyskać homozygoty, potrzebne jest jeszcze jedno krzyżowanie w obrębie  $F_1$ .

Zdolność komórek ES do wchodzenia do linii zarodkowej może ulec łatwo utracie w trakcie prowadzenia hodowli [55]. Dlatego komórki ES należy hodować w optymalnych warunkach zapewniających utrzymanie ich pełnego potencjału rozwojowego. Zdolność komórek ES do



Rys. 7. Wprowadzanie zmian genetycznych komórek ES do genomu myszy, ok. 10 komórek ES (szczerp o sierści agouti, dziedzicznej dominująco, płęć męska) o zmodyfikowanym genomie jest wstrzykiwanych do 3,5-dniowej blastocysty myszy szczepu C57Bl (czarne zabarwienie sierści, recesywne); blastocysta jest wprowadzana do macicy myszy w pseudocięży; potomstwo urodzone z reintrodukowanych blastocyst jest dwóch rodzajów: myszy czarne bez udziału komórek ES oraz myszy hybrydowe o sierści łaciastej (czarna i agouti); osobniki hybrydowe płci męskiej poddaje się analizie genetycznej w celu ustalenia rodowodu linii zarodkowej, w tym celu wykonuje się krzyżowanie z czarnymi samicami C57Bl; jeżeli komórki ES mają udział w tworzeniu plemników, to otrzymamy w F<sub>1</sub> potomstwo dwóch rodzajów : czarne i agouti (w całości z komórek ES); przy pomocy *Southern blot* identyfikuje się osobniki agouti, u których jest zmieniony allel locus; wzajemne skrzyżowanie takich osobników prowadzi do otrzymania myszy homozygotycznych pod względem modyfikacji

kolonizacji sznurów płciowych hybrydy wydaje się obecnie podstawowym “wąskim gardłem” na drodze do otrzymania szczepów myszy z celowanymi modyfikacjami genomu [18].

Celowane modyfikowanie genomu komórek ES myszy pozwala przenieść wprowadzone modyfikacje do genomu zwierzęcia i badać je in vivo. Sprawia to, że komórki ES są obecnie najczęstszym obiektem dla celowanego zmieniania informacji genetycznej [77,86].



## CELOWANE MODYFIKOWANIE GENOMU UMOŻLIWIŁO BADANIE UKŁADÓW ZŁOŻONYCH

Celowane modyfikowanie genomu myszy stworzyło możliwość bezpośredniego badania czynności genów w złożonych procesach zachodzących *in vivo*. Używając tej strategii eksperymentalnej uzyskano interesujące dane dotyczące układu immunologicznego, rozwoju, kontroli proliferacji i różnicowania, a ostatnio czynności ośrodkowego układu nerwowego.

**Układ immunologiczny.** Jako układ niezwykle złożony, a jednocześnie niekoniecznie niezbędny do życia w środowisku wolnym od patogenów był jednym z pierwszych obiektów dla celowanego modyfikowania w wydaniu "amputacyjnym" (*knockout genetics*).

Produkty genów RAG-1 i RAG-2 są odpowiedzialne za powstawanie zmienności przeciwciał i receptorów dla antygenów na limfocytach T. Myszy, u których wyłączono te geny drogą homologicznej rekombinacji, rozwijają fenotyp charakteryzujący się ostrym niedoborem odporności [48,62]. Limfocyty T i B są zablokowane w początkowych stadiach swojego rozwoju. Metodą genetyki "amputacyjnej" wyłączono u myszy kilka genów dla receptorów i markerów błonowych limfocytów. Wśród nich są geny łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  receptora antygeny limfocytów T (TCR) [47,52], ekson błonowy genu łańcucha ciężkiego  $\mu$  immunoglobulin [30], geny markerów błonowych CD4 i CD8 limfocytów T [38,54], gen  $\beta$ 2-mikroglobuliny [31,85], a także gen kinazy p59 *fyn*, elementu kaskady sygnałowej receptora TCR tymocytów [1,69]. U myszy pozbawionych łańcucha  $\beta$  TCR, ale nie  $\alpha$ , stwierdzono zablokowanie rozwoju tymocytów na poziomie komórek CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> [47]. Warto wspomnieć, że myszy pozbawione limfocytów CD4<sup>+</sup> w wyniku inaktywacji genu CD4 wykazywały defekt immunologiczny tylko w zakresie odpowiedzi humoralnej [54]. Celowane modyfikowanie posłużyło również inaktywacji genów dla limfokin, m.in. interleukiny 2 [59] i 4 [33].

**Mechanizmy rozwojowe.** Geny podejrzane o udział w kontroli rozwoju zarodkowego i płodowego zaczęto bardzo wcześnie badać przy pomocy celowanego modyfikowania genomu. Najwięcej uwagi poświęcono dotychczas genom należącym do rodziny *homeobox*. Uzyskano myszy pozbawione genów *en-2* [86], *hox 1.5* [10], *hox 1.6* [11], *hox 3.1* [34] oraz genu *wnt-1* [44,73], spoza rodziny *homeobox* (produkt genu jest glikoproteiną substancji międzykomórkowej). Myszy pozbawione produktu genu *hox 1.5* rozwijały fenotyp przypominający zespół DiGeorge'a, wrodzoną chorobę występującą u ludzi [10]. Fenotyp myszy bez produktu genu *hox 3.1* objawiał się zaburzeniami wykształcania się segmentów szkieletowych tułowia [34]. W przypadku tego genu uzyskano również obraz jego ekspresji *in vivo* przy pomocy genu reporterowego *lacZ* [34].

**Kontrola proliferacji i różnicowania.** Wśród genów biorących udział w kontroli proliferacji i różnicowania inaktywowano u myszy m.in. proto-onkogeny *c-src* [68], *c-myb* [50], *N-myc* [46], *c-abl* [58], *bmi-1* [3], *pim-1* [86], *c-fos* [29], geny przeciwnowotworowe *p53* [17] i *Rb-1* [12,20,27,35], gen czynnika transkrypcyjnego GATA-1 [9], geny mięśniowo-swoistych czynników transkrypcyjnych *MyoD* [56] i *Myf-5* [6], gen metylotransferazy DNA [37], geny czynników wzrostu IGF II [14] i  $\alpha$ -inhibiny [42], gen receptora p75 dla NGF [36]. Mutacje inaktywujące *c-myb*, *bmi-1*, *Rb-1* i gen metylotransferazy DNA są letalne zarodkowo w stanie homozygotycznym. Dużym zaskoczeniem był fakt, że nie ma takich skutków inaktywacja genu *p53*, który uważano za uniwersalny regulator proliferacji. Co więcej, myszy pozbawione *p53* rozwijają się normalnie, a jedynym odchyleniem od normy w ich fenotypie jest wysoka zapadalność na różne nowotwory. Gen *Rb-1*, którego rola wydawała się znacznie bardziej

zawężona, okazał się niezbędny w rozwoju. Płody mysie nie mające aktywnego genu *Rb-1* wykazują zaburzenia w obrębie układów nerwowego i krwiotwórczego. Heterozygoty pod względem mutacji *Rb-1* są narażone na rozwój nowotworów szyszynki. Taki genotyp u ludzi prowadzi do zachorowania na nowotwór siatkówki retinoblastoma.

**Ośrodkowy układ nerwowy.** Od niedawna zaczęto go badać metodą celowanego modyfikowania genomu. Są już jednak pierwsze, bardzo interesujące wyniki. Stworzono myszy pozbawione aktywnego genu  $\alpha$  podjednostki kinazy wapniowo kalmodulinowej typu II (kinaza CAM II, CAM II kinase) [2,63]. Ten brak objawiał się upośledzonym długotrwałym wzmocnieniem synaptycznym (*long term potentiation, LPT*) w badaniach elektrofizjologicznych neuronów hipokampa transgenicznych myszy [2,63]. Oprócz tego myszy wykazywały upośledzoną zdolność do uczenia się [2,64]. Podobny fenotyp obserwowano u myszy pozbawionych genu kinazy tyrozynowej *fyn* [2]. W ten sposób aktywność produktów poszczególnych genów została bezpośrednio powiązana z wyższą czynnością ośrodkowego układu nerwowego.

## CELOWANE MODYFIKOWANIE GENOMU UMOŻLIWIA TWORZENIE MODELI LUDZKICH CHOROÓB GENETYCZNYCH

Podejście "amputacyjne" w technice celowanego modyfikowania genomu sprawdza się w modelowaniu ludzkich chorób genetycznych u myszy. Czyni to tę technikę użyteczną nie tylko w badaniach czysto podstawowych, ale również na polu badań o bardziej bezpośrednim znaczeniu użytkowym. Pierwsze modele mysie stworzono dla choroby Gauchera [78] i mukowiscydozy (*cystic fibrosis*) [67]. W obu przypadkach istnieje wiele cech wspólnych z patologią człowieka. Modele te tworzą więc szansę na lepsze poznanie patologii obu chorób oraz opracowanie skutecznej terapii. Są już pierwsze efekty zastosowań celowanego modyfikowania genomu myszy w badaniach patogenetyki miażdżycy [53]. Nie wolno zapominać o tym, że niektóre odpowiedniki chorób genetycznych człowieka u myszy przebiegają całkiem inaczej. Dobrym przykładem jest deficyt enzymu Hprt manifestujący się u człowieka rozwojem zespołu Lesch-Nyhana. U myszy *hprt*<sup>-</sup> nie obserwuje się żadnych objawów chorobowych [25,32,86].

## CELOWANE MODYFIKOWANIE GENOMU JEST TECHNIKĄ ATRAKCYJNĄ DLA TERAPII GENOWEJ

Celowane modyfikowanie genomu byłoby dobrą metodą do leczniczego zmieniania informacji genetycznej w terapii genowej ludzi [81]. Można by w ten sposób uniknąć niebezpieczeństwa przypadkowych insercji nowo wprowadzanej informacji genetycznej w kodujące odcinki genów, zapewnić kontrolowaną, stabilną lub fizjologiczną ekspresję wprowadzanej informacji, korygować mutacje dominujące. Smithies i jego koledzy dokonali korekcji genu  $\beta^S$  globiny (mutacja powodująca anemię sierpowatą) w hybrydach komórek myszy i człowieka [61]. Jest jednak wiele problemów, które muszą zostać rozwiązane, zanim będzie można stosować homologiczną rekombinację w terapii genowej. Do najważniejszych należą stosunkowo niska wydajność homologicznej rekombinacji, konieczność prowadzenia selekcji in vitro oraz konieczność indywidualnego konstruowania wektorów dla każdego typu mutacji.



Pierwszy z nich uda się być może rozwiązać stosując enzymy katalizujące homologiczną rekombinację.

## CELOWANE MODYFIKOWANIE GENOMU OTWIERA NOWY ROZDZIAŁ W BADANIACH NAD CZYNNOSCIĄ GENOMU ORGANIZMÓW WYŻSZYCH

Znaczny postęp wiedzy na temat funkcjonowania homologicznej rekombinacji i metod selekcyjnych przyczyniają się do coraz efektywniejszego celowanego wprowadzania zmian do genomu komórek organizmów wyższych. Opracowanie metod hodowli komórek ES i ich reimplantacji do blastocyst doprowadziło do powstania strategii pozwalającej w sposób celowany zmieniać genom myszy. Strategia ta tworzy niepowtarzalną możliwość bezpośredniego wglądu w działanie genów *in vivo*. Jest to bardzo cenne zwłaszcza wobec ogromnej ilości informacji uzyskiwanych *in vitro*, których odniesienie do układu *in vivo* pozostaje nieznane. Nie należy zapominać o ograniczeniach systemów doświadczalnych powstających przez celowane modyfikowanie genomu: (1) Na razie można uzyskiwać tylko myszy z celowanymi modyfikacjami genów (ich biologia różni się od biologii innych ssaków, w tym człowieka). (2) Wczesna letalność charakteryzująca niektóre genotypy uniemożliwia badanie ich roli w dalszych fazach życia osobniczego.

Nadzieję na rozwiązanie pierwszego problemu tworzą intensywne prace nad izolacją i hodowlą totipotencjalnych komórek sznurów płciowych [43]. Prawdopodobnie komórki te będzie można łatwiej uzyskać dla różnych zwierząt doświadczalnych niż komórki ES. Drugi problem uda się być może rozwiązać poprzez użycie drożdżowego, bardzo wydajnego systemu miejscowo swoistej rekombinacji (enzym FLP i rozpoznawane przez niego sekwencje docelowe) [51]. Poddany tkankowo swoistej ekspresji u transgenicznych zwierząt mógłby tkankowo swoiście modyfikować genom.

Technika celowanego modyfikowania genomu, zwłaszcza myszy, jest ciągle bardzo droga i pracochłonna [77]. Informacje uzyskane dzięki tej technice sprawiają jednak, że coraz więcej laboratoriów decyduje się na jej stosowanie. Istnieją już nawet firmy podejmujące się szybko i efektywnie zmodyfikować żądane locus genomu myszy (np. BRL Basel).

12 lat temu Capecchi bezskutecznie występował o grant z NIH na badania dotyczące wykorzystania homologicznej rekombinacji do zmieniania genomu komórek ssaków. Projekt został odrzucony, gdyż poważni recenzenci byli przekonani, że przedsięwzięcie takie jest niewykonalne, a pomysł nadaje się tylko do tego, żeby o nim zapomnieć. Jednak Capecchi znalazł inne źródła finansowania badań i napewno kiedyś będzie kandydatem do nagrody Nobla.

## LITERATURA

- [1] APPLEBY MW, GROSS JA, COOKE MP et al. Defective T cell receptor signalling in mice lacking the thymic isoform of p59 fyn. *Cell* 1992; **70**: 751–763.
- [2] BARINAGA M. Knockouts shed light on learning. *Science* 1992; **257**: 162–163.
- [3] BERNS A. nieopublikowane
- [4] BOLLAG RJ, WALDMAN AS, LISKAY RM. Homologous recombination in mammalian cells. *Ann Rev Genet* 1989; **23**: 199–225.
- [5] BRADLEY A. Production and analysis of chimaeric mice. w *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach*. EJ Robertson red. IRL Press 1987; 113–150.

- [6] BRAUN T, RUDNICKI MA, ARNOLD HH, JAENISCH R. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene *Myf-5* results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* 1992; **71**: 369–382.
- [7] BELER H, FISCHER M, LANG Y et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 1992; **356**: 577–582.
- [8] CAPECCHI MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 1989; **5**: 70–76.
- [9] CELESTE SIMON M, PEVNY L, WILES MV, KELLER G, CONSTANTINI F, ORKIN SH. Rescue of erythroid development in gene targeted *GATA-1*- mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics* 1992; **1**: 92–98.
- [10] CHISAKA O, CAPECCHI MR. Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*. *Nature* 1991; **350**: 473–479.
- [11] CHISAKA O, MUSCI TS, CAPECCHI MR. Developmental defects of the ear, cranial nerves and hindbrain resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *Hox-1.6*. *Nature* 1992; **355**: 516–520.
- [12] CLARKE AR, MAANDAG ER, VAN ROON M, VAN DER LUGT NMT et al. Requirement for the functional *Rb-1* gene in murine development. *Nature* 1992; **359**: 328–330.
- [13] DAVIS AC, WIMS M, BRADLEY A. Investigation of coelectroporation as a method for introducing small mutations into embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 2769–2776.
- [14] DECHIARA TM, EFSTRATIADIS A, ROBERTSON EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 1990; **345**: 78–80.
- [15] DENG C, CAPECCHI MR. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 3365–3371.
- [16] DOETSCHMAN T, GREGG RG, MAEDA N, ML HOOPER et al. Targeted correction of a mutant *HPRT* gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 1987; **330**: 576–578.
- [17] DONEHOWER LA, HARVEY M, SLAGLE BL, MCARTHUR MJ et al. Mice deficient for *p53* are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; **356**: 215–221.
- [18] FROHMAN MA, MARTIN GA. Cut, paste and save: new approaches to altering specific genes in mice. *Cell* 1989; **56**: 145–147.
- [19] GRIDLEY T. Insertional versus targeted mutagenesis in mice. *The New Biologist* 1991; **3**: 1025–1034.
- [20] HARLOW E. For our eyes only. *Nature* 1992; **359**: 270–271.
- [21] HASTY P, RAMIREZ-SOLIS R, KRUMLAUF R, BRADLEY A. Introduction of a subtle mutation into *Hox-2.6* locus in embryonic stem cells. *Nature* 1991; **350**: 243–246.
- [22] HASTY P, RIVERA-PEREZ J, BRADLEY A. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 5586–5591.
- [23] HASTY P, RIVERA-PEREZ J, BRADLEY A. The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 2464–2474.
- [24] HASTY P, RIVERA-PEREZ J, CHANG C, BRADLEY A. Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 4509–4517.
- [25] HOOPER M, HARDY K, HANDYSIDE A, HUNTER S, MONK M. *HPRT*-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 1987; **326**: 292–295.
- [26] ITZHAKI JE, PORTER ACG. Targeted disruption of a human interferon-inducible gene detected by secretion of human growth hormone. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 3835–3842.
- [27] JACKS T, FAZELI A, SCHMITT EM, BRONSON RT et al. Effects of an *RB* mutation in the mouse. *Nature* 1992; **359**: 295–300.
- [28] JEANNOTTE L, RUIZ JC, ROBERTSON EJ. Low level of *Hox1.3* gene expression does not preclude the use of promoterless vectors to generate a targeted gene disruption. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 5578–5585.
- [29] JOHNSON RS, SPIEGELMAN BM, PAPAIOANNOU V. Pleiotropic effects of a null mutation in the *c-fos* proto-oncogene. *Cell* 1992; **71**: 577–586.
- [30] KITAMURA D, ROES J, KHN R, RAJEWSKY K. A B-cell deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin  $\mu$  chain gene. *Nature* 1991; **350**: 423–426.
- [31] KOLLER BH, MARRACK P, KAPPLER JW, SMIETHIES O. Normal development of mice deficient in  $\beta 2M$ , MHC class I, and CD8+ T cells. *Science* 1990; **248**: 1227–1230.
- [32] KUEHN MR, BRADLEY A, ROBERTSON EJ, EVANS MJ. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of *HPRT* mutations into mice. *Nature* 1987; **326**: 295–299.
- [33] KHN R, RAJEWSKY K, MLLER W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 1991; **254**: 707–710.
- [34] LE MOUËLLIC H, LALLEMAND Y, BRZLET P. Homeosis in the mouse induced by a null mutation in the *hox-3.1* gene. *Cell* 1992; **69**: 251–264.
- [35] LEE EYH, CHANG CY, HU N, WANG YCJ et al. Mice deficient for *Rb* are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 1992; **359**: 288–294.



- [36] LEE KF, LI E, HUBER LJ, LANDIS SC, CHAO MV, JAENISCH R. Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell* 1992; **69**: 737–749.
- [37] LI E, BESTOR TH, JAENISCH R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; **69**: 915–926.
- [38] MAK TW, RAHEMTULLA A, SCHILHAM M, KOH DR. Generation of mutant mice lacking surface expression of CD4 or CD8 by gene targeting. *J Autoimmunity* 1992; **5**: 55–59.
- [39] MANSOUR SL. Gene targeting in murine embryonic stem cells: introduction of specific alterations into the mammalian genome. *GATA* 1990; **7**: 219–227.
- [40] MANSOUR SL, THOMAS KR, CAPECCHI MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 1988; **336**: 348–352.
- [41] MANSOUR SL, THOMAS KR, DENG C, CAPECCHI MR. Introduction of a lacZ reporter gene into the mouse int-2 locus by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 7688–7692.
- [42] MATZUK MM, FINEGOLD MJ, SU JGJ, HSUEH AJW, BRADLEY A. a-Inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 1992; **360**: 313–319.
- [43] MCLAREN A. The quest for immortality. *Nature* 1992; **359**: 482–483.
- [44] MCMAHON AP, BRADLEY A. The Wnt-1(int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 1990; **62**: 1073–1085.
- [45] MESELSON MS, RADDING CM. A general model for genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 358–361.
- [46] MOENS CB, AUERBACH AB, CONLON RA, JOYNER AL, ROSSANT J. A targeted mutation reveals a role for N-myc in branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Genes Dev* 1992; **6**: 691–704.
- [47] MOMBAERTS P, CLARKE AR, RUDNICKI MA, IACOMINI J. et al. Mutations in T cell antigen receptor genes a and b block thymocyte development at different stages. *Nature* 1992; **360**: 225–230.
- [48] MOMBAERTS P, IACOMINI J, JOHNSON RS, HERRUP K. RAG-1 deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992; **68**: 869–877.
- [49] MORTENSEN RM, ZUBIAUR M, NEER EJ, SEIDMAN JG. Embryonic stem cells lacking a functional inhibitory G-protein (alpha i2) produced by gene targeting of both alleles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7036–7040.
- [50] MUCENSKI ML, MCLAIN K, KIER AB. et al. A functional c-myc gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 1991; **65**: 677–689.
- [51] O'GORMAN S, FOX DT, WAHL GM. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian genome. *Science* 1991; **251**: 1351–1354.
- [52] PHILPOTT KL, VINEY JL, KAY G et al. Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor ab-expressing cells. *Science* 1992; **256**: 1448–1450.
- [53] PLUMP AS, SMITH JD, HAYEK T et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992; **71**: 343–353.
- [54] RAHEMTULLA A, FUNG-LEUNG WP, SCHILHAM MW et al. Normal development and function of CD8<sup>+</sup> cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 1991; **353**: 180–184.
- [55] ROBERTSON EJ. Embryo-derived stem cell lines. w Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach. EJ Robertson red. IRL Press 1987; 71–112.
- [56] RUDNICKI MA, BRAUN T, HINUMA S, JAENISCH R. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 1992; **71**: 383–390.
- [57] SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory 1989;? .
- [58] SCHARTZENBERG PL, STALL AM, HARDIN JD et al. Mice homozygous for the abm1 mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell* 1991; **65**: 1165–1175.
- [59] SCHORLE H, HOLTSCHEKE T, HNIG T H, SCHIMPL A, HORAK I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 1991; **352**: 621–624.
- [60] SEDIVY JM, JOYNER AL. Gene targeting. W.H. Freeman and Company, San Francisco 1992 .
- [61] SHESELY EG, KIM H-S, SHEHEE WR, PAPAYANNOPOULOU T, SMITHIES O, POPOVICH BW. Correction of a human  $\beta^s$ -globin gene by gene targeting. *Pro Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 4294–4298.
- [62] SHINKANI Y, RATHBUN G, LAM K-P et al. RAG-2 deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992; **68**: 855–867.
- [63] SILVA AJ, STEVENS CF, TONEGAWA S, WANG Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in  $\alpha$ -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 1992; **257**: 201–206.

- [64] SII VA AJ, PAYLOR R, WEHNER JM, TONEGAWA S. Impaired spatial learning in  $\alpha$ -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 1992; **257**: 206–211.
- [65] SMITH AG, NICHOLS J, ROBERTSON M, RATHJEN PD. Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development. *Dev Biol* 1992; **151**: 339–351.
- [66] SMITHIES O, GREGG RG, BOGGS SS, KORALEWSKI MA, KUCHERLAPATI RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta globin locus by homologous recombination. *Nature* 1985; **317**: 230–234.
- [67] SNOUWAERT JN, BRIGMAN KK, LATOUR AM, MALOUF NN, BUOCHER RC, SMITHIES O, KOLLER BH. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* 1992; **257**: 1083–1088.
- [68] SORIANO P, MONTGOMERY C, GESKE R, BRADLEY A. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 1991; **64**: 693–702.
- [69] STEIN PL, LEE HM, RICH S, SORIANO P. pp59 fyn mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell* 1992; **70**: 741–750.
- [70] SZOSTAK JC, ORR-WEAVER TL, ROTHSTEIN RJ, STAHL FW. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 1983; **33**: 25–35.
- [71] TE RIELE H, MAANDAG ER, BERNIS A. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 5128–5132.
- [72] TE RIELE H, MAANDAG ER, CLARKE A, HOOPER M, BERNIS A. Consecutive inactivation of both alleles of the pim-1 proto-oncogene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 1990; **348**: 649–651.
- [73] THOMAS KR, CAPECCHI MR. Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* 1990; **346**: 847–850.
- [74] THOMAS KR, CAPECCHI MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; **51**: 503–512.
- [75] THOMAS KR, DENG C, CAPECCHI MR. High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 2919–2923.
- [76] TONEGUZZO F, HAYDAY AC, KAETING A. Electric field mediated DNA transfer: transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 1986; **6**: 703–706.
- [77] TRAVIS J. Scoring a technical knockout in mice. *Science* 1992; **256**: 1392–1394.
- [78] TYBULEWICZ VLJ, TREMBLAY ML, LAMARCA ME, WILLEMSEN R et al. Animal model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase gene. *Nature* 1992; **357**: 407–410.
- [79] VALANCIUS V, SMITHIES O. Double-strand gap repair in a mammalian gene targeting reaction. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 4389–4397.
- [80] VAN DER LUGT N, MAANDAG ER, TE RIELE H, LAIRD PW, BERNIS A. A pgk::hprt fusion as a selectable marker for targeting of genes in mouse embryonic stem cells: disruption of the T-cell receptor delta-chain-encoding-gene. *Gene* 1991; **105**: 263–267.
- [81] VEGA MA. Prospects for homologous recombination in human gene therapy. *Human Genetics* 1991; **87**: 245–253.
- [82] WAHLS WP, WALLACE LJ, MOORE PD. Hypervariable minisatellite is a hotspot for homologous recombination in human cells. *Cell* 1990; **60**: 95–103.
- [83] WILMUT I, HOOPER ML, SIMONS JP. Genetic manipulation of mammals and its application in reproductive biology. *J Repr Fertil* 1991; **92**: 245–279.
- [84] ZHENG H, HASTY P, BRENNEMAN MA. Fidelity of targeted recombination in human fibroblasts and murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8067–8071.
- [85] ZIJLSTRA M, BIX M, SIMISTER NE, LORING JM, RAULET DH, JAENISCH R. b2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+cytolytic T cells. *Nature* 1990; **344**: 742–746.
- [86] ZIMMER A. Manipulating the genome by homologous recombination in embryonic stem cells. *Annu Rev Neurosci* 1992; **15**: 115–137.
- [87] ZIMMER A, GRUSS P. Chimeric mice produced with embryonal stem (ES) cells carrying a homeobox Hox-1.1 allele mutated by homologous recombination. *Nature* 1989; **338**: 150–153.

Otrzymano: 24.01. 1993 r.

Przyjęto: 03.03. 1993 r.

Adres autora: ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa



## STATUT POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOLOGII KOMÓRKI

### I. Nazwa, siedziba, teren działalności i charakter prawny Towarzystwa

1. Stowarzyszenie nosi nazwę Polskie Towarzystwo Biologii Komórki (w dalszym ciągu oznaczone skrótem PTBK).

2. Terenem działalności PTBK jest obszar Rzeczypospolitej Polskiej, a siedzibą Zarządu Głównego miasto Kraków.

3. PTBK rozwija działalność za pośrednictwem Zarządu Głównego i Oddziałów zorganizowanych w poszczególnych miastach.

### II. Cele i środki działania

4. Celem PTBK jest popieranie rozwoju biologii komórki i popularyzowanie tej nauki.

5. Środki prowadzące do tego celu są następujące: a/ urządzenie posiedzeń naukowych i dyskusyjnych, odczytów, wykładów, wystaw, konkursów i ankiet oraz zjazdów naukowych i dydaktycznych,

b/ wydawanie i popieranie działalności wydawniczej z dziedziny biologii komórki i jej zastosowań,

c/ popieranie badań naukowych i przyznawanie stypendiów,

d/ utrzymywanie łączności z pokrewnymi stowarzyszeniami oraz organizowanie wymiany wydawnictw naukowych, członkostwo w innych pokrewnych międzynarodowych organizacjach,

e/ organizowanie wymiany naukowej z zagranicą przez zapraszanie uczonych zagranicznych do Polski i delegowanie za granicę przedstawicieli Towarzystwa,

f/ tworzenie spośród swoich członków sekcji i komisji do wykonywania poszczególnych zadań.

### III. Prawa i obowiązki członków

6. Członkowie Towarzystwa dzielą się na:

a/ zwyczajnych,

b/ honorowych

c/ wspierających.

7. Członkiem zwyczajnym Towarzystwa może zostać każda pełnoletnia osoba, mająca dorobek naukowy w dziedzinie biologii komórki lub nauk pokrewnych, czy też przyczyniająca się w wybitny sposób do popularyzacji tych nauk.

8. Godność członków honorowych nadaje Walne Zgromadzenie na wniosek Zarządu Głównego, osobom wybitnie zasłużonym na polu biologii komórki i nauk pokrewnych. Nabycie praw członka PTBK następuje z chwilą wyrażenia przez te osoby zgody na udział w pracach PTBK.

9. Członkiem wspierającym Towarzystwa może zostać każda osoba fizyczna lub prawna, okazująca gotowość współpracy z Towarzystwem w realizacji jego celów.

10. Osoba pragnąca zostać członkiem zwyczajnym lub wspierającym PTBK składa deklarację do Zarządu Oddziału, zaopiniowaną przez dwóch członków zwyczajnych lub honorowych Towarzystwa. Listę przyjętych Zarząd Oddziału przedstawia do zatwierdzenia

Zarządowi Głównemu. Zarząd Główny w razie decyzji odmownej zawiadamia o niej Oddział, w terminie 2 tygodni od jej podjęcia.

11. Członkowie zwyczajni i wspierający opłacają wpisowe oraz składki roczne, których wysokość ustala Walne Zgromadzenie.

12. Członkowie honorowi składek ani wpisowego nie opłacają i otrzymują bezpłatnie wydawnictwa Towarzystwa.

13. Wszyscy członkowie Towarzystwa mają prawo:

a/ czynnego udziału w zebraniach naukowych Towarzystwa,

b/ otrzymania wydawnictw Towarzystwa na warunkach ustalonych przez Zarząd główny.

Członkowie honorowi i zwyczajni mają ponadto prawo:

c/ głosowania na Walnych Zgromadzeniach Towarzystwa,

d/ wybieralności do wszystkich władz Towarzystwa.

14. Do obowiązków wszystkich członków Towarzystwa należy czynny udział w pracach Towarzystwa i popieranie jego zamierzeń wymienionych w pkt. 4.

15. Każdy członek ma prawo wystąpienia z PTBK, obowiązany jest jednak powiadomić o tym na piśmie Zarząd Oddziału i uregulować zaległe składki.

16. W razie nieopłacenia przez członka składek w ciągu dwóch lat, Zarząd Oddziału może podjąć uchwałę o skreśleniu z listy członków Towarzystwa, a po ich uregulowaniu powrócić go ponownie do jego praw.

17. Członek Towarzystwa może być wykluczony z listy członków, za czyny nie liczące z godnością członka lub za działalność na szkodę Towarzystwa. Wykluczenie następuje na mocy uchwały Zarządu Głównego większością 2/3 głosów, przy czym na żądanie wykluczonego, motywy powinny być zakomunikowane na piśmie. Wykluczonemu przysługuje prawo odwołania się do Walnego zgromadzenia.

#### IV. Władze Stowarzyszenia

18. Władzami PTBK są: Walne Zgromadzenie, Zarząd Główny, Prezydium Zarządu, Komisja Rewizyjna i Zarządy Oddziałów.

19. Walne Zgromadzenie PTBK jest naczelną władzą PTBK. Wytacza ono kierunki działania Towarzystwa i zasady gospodarki finansowej, przeprowadza wybory Zarządu Głównego i Komisji Rewizyjnej, udziela lub odmawia absolutorium ustępującemu Zarządowi Głównemu, rozstrzyga odwołania członków od uchwały Zarządu Głównego w sprawie wykluczenia ich z PTBK.

20. Walne Zgromadzenia dzielą się na zwyczajne i nadzwyczajne. Zwyczajne Walne Zgromadzenie PTBK zwołuje Zarząd Główny, w związku z zakończeniem kadencji Zarządu Głównego, co 3 lata. Nadzwyczajne Walne Zgromadzenie zwołuje Zarząd Główny z własnej inicjatywy, na pisemne żądanie Komisji Rewizyjnej PTBK lub na żądanie nie mniej niż 1/4 członków zwyczajnych i honorowych.

21. Na Walnym Zgromadzeniu PTBK przewodniczy wybrany przez zebranych członek honorowy lub zwyczajny, protokołuje Sekretarz z wyboru.

22. Zarząd Główny zobowiązany jest przestać zawiadomienia o zwołaniu Walnego Zgromadzenia wraz z porządkiem dziennym, wszystkim członkom Towarzystwa, przynajmniej na dwa tygodnie przed wyznaczonym terminem zgromadzenia.

23. Porządek dzienny zwyczajnego Walnego Zgromadzenia ustala Zarząd Główny. Porządek dzienny może być uzupełniony przez Walne Zgromadzenie, na życzenie Zarządu każdego



z Oddziałów, doręczone na piśmie Zarządowi Głównemu, najpóźniej na pięć dni przed terminem Walnego Zgromadzenia.

24. Porządek dzienny nadzwyczajnego Walnego Zgromadzenia musi obejmować punkty dotyczące spraw, celem załatwienia których nadzwyczajne Walne Zgromadzenie zostało zwołane.

25. Walne Zgromadzenie jest prawomocne w pierwszym zwołanym terminie jeżeli uczestniczy w nim co najmniej połowa członków zwyczajnych. Jeżeli to nie nastąpi, w drugim terminie wyznaczonym nie wcześniej niż 30 minut po upływie czasu pierwszego terminu do ważności uchwał Walnego Zgromadzenia wystarczy obecność co najmniej 1/4 członków zwykłych bez względu na liczbę zgromadzonych członków.

26. Uchwały zapadają zwykłą większością głosów, z wyjątkiem uchwał dotyczących zmian Statutu, wyboru członków honorowych i wykluczenia członków, którzy odwołali się do Walnego Zgromadzenia. Uchwały te wymagają 2/3 głosów obecnych na Walnym Zgromadzeniu. Wybory do Zarządu Głównego i udzielenie absolutorium odbywają się w głosowaniu tajnym. Inne uchwały mogą być podejmowane w głosowaniu jawnym, jeżeli obecni jednomyślnie zgodzą się na taką formę głosowania.

27. Walne Zgromadzenie Towarzystwa wybiera w tajnym głosowaniu:

a/ Prezesa

b/ sześciu członków Zarządu Głównego,

c/ 3-osobową Komisję Rewizyjną.

28. Kadencja Zarządu Głównego trwa trzy lata. Tej samej funkcji w Zarządzie członek nie może pełnić przez okres więcej niż dwóch kadencji.

29. Zarząd Główny PTBK kieruje działalnością Towarzystwa, wykonuje nadzór nad działalnością Oddziałów i zarządza majątkiem Towarzystwa, zgodnie z postanowieniami niniejszego Statutu i uchwałami Walnego Zgromadzenia.

30. Zarząd Główny PTBK składa się z Prezesa, Vice-prezesa, Przewodniczących Oddziałów oraz ponadto 5-ciu członków - w tej liczbie Sekretarza i Skarbnika oraz Prezesa uprzedniej kadencji.

Zarząd Główny ma prawo kooptacji w razie istotnej potrzeby – najwyżej dwóch członków, poza wymienionymi wyżej. W razie niemożności przybycia Przewodniczącego Oddziału na posiedzenie Zarządu Głównego, ma on prawo upoważnić jednego z członków Zarządu Oddziału do zastępowania siebie na tym posiedzeniu. Pełnomocnictwo to winno być wydane na piśmie i ważne jest tylko na jedno posiedzenie Zarządu Głównego.

Prezes, Vice-prezes, Sekretarz i Skarbnik tworzą Prezydium Zarządu Głównego PTBK. Bieżące sprawy PTBK są prowadzone przez Prezydium Zarządu Głównego.

31. Najpóźniej w 10 dni po wyborach winno się odbyć posiedzenie konstytucyjne Prezydium Zarządu Głównego, na którym członkowie wybrani przez Walne Zgromadzenie dokonują wyboru spośród siebie funkcji Vice-prezesa, Sekretarza, Skarbnika i ewentualnie inne.

32. W razie ustąpienia Prezesa Towarzystwa w czasie trwania kadencji, funkcje jego aż do najbliższego Walnego Zgromadzenia obejmuje Vice-prezes. Jeżeli zebranie to byłoby Nadzwyczajnym Walnym Zgromadzeniem, to w jego porządku dziennym winien znaleźć się punkt przewidujący wybory nowego Prezesa Towarzystwa.

33. Zarząd Główny organizuje przynajmniej raz na trzy lata zjazdy naukowe lub powierza ich organizację Zarządom Oddziałów.

34. Posiedzenia Prezydium Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki zwołuje Prezes lub Vice-prezes, w zasadzie raz na dwa miesiące.

35. Posiedzenie plenarne Zarządu Głównego PTBK zwołuje Prezes lub Vice-prezes, co najmniej jeden raz w roku. Zwołuje on ponadto posiedzenia plenarne na pisemny wniosek Komisji Rewizyjnej lub przynajmniej trzech członków Zarządu Głównego. Wszyscy członkowie Zarządu Głównego powinni otrzymać zawiadomienie o posiedzeniu, przynajmniej na tydzień przed terminem, wraz z proponowanym porządkiem dziennym.

36. Do prawomocności uchwał Zarządu Głównego wystarczy obecność co najmniej 2/3 członków tego Zarządu, w tym Prezesa lub Vice-prezesa. Uchwały Zarządu Głównego lub jego Prezydium zapadają zwykłą większością głosów. W razie równości głosów rozstrzyga głos przewodniczącego zebrania. Przebieg obrad jest protokołowany. Protokół podpisuje Przewodniczący i Sekretarz.

37. Prezes Zarządu Głównego przewodniczy z urzędu na posiedzeniach Zarządu. Reprezentuje PTBK we wszystkich jego stosunkach z władzami państwowymi i instytucjami naukowymi w kraju i za granicą. Do dokonywania czynności prawnych w imieniu PTBK upoważniony jest Prezes Zarządu Głównego oraz ustanowieni przez niego pełnomocnicy.

38. Sekretarz prowadzi biuro Zarządu Głównego, sporządza protokoły z obrad Zarządu Głównego i sprawozdania z działalności Towarzystwa.

39. Skarbnik prowadzi księgowość Zarządu Głównego, sporządza zestawienia i sprawozdania finansowe dla władz, Walnego Zgromadzenia oraz Komisji Rewizyjnej, prowadzi i podpisuje korespondencję dotyczącą zobowiązań materialnych.

40. Komisja Rewizyjna składa się z trzech osób, wybranych przez Walne Zgromadzenie na okres kadencji Zarządu Głównego. Komisja Rewizyjna konstituując się wybiera ze swojego składu Przewodniczącego.

41. Komisja Rewizyjna przeprowadza kontrolę działalności Towarzystwa i jest obowiązana przynajmniej raz w okresie kadencji przed Walnym Zgromadzeniem dokonać rewizji ksiąg, dokumentów kasowych, sprawdzić stan majątku i prawidłowość wydatków finansowych w oparciu o preliminarz oraz złożyć na piśmie sprawozdanie i wnioski Walnemu Zgromadzeniu. Wśród tych wniosków, Komisja Rewizyjna stawia również wniosek o udzielenie lub odmówienie absolutorium ustępującemu Zarządowi Głównemu.

42. Spory między członkami, dotyczące Towarzystwa rozstrzyga Sąd Koleżeński, w składzie trzech osób, wybranych przez Walne Zgromadzenie. Orzeczenia Sądu Koleżeńskiego są ostateczne.

## V.

43. W celu realizacji zadań PTBK mogą powstawać w poszczególnych miejscowościach Oddziały PTBK, z inicjatywy Zarządu Głównego albo z inicjatywy terenowej. Do powołania Oddziału wymagany jest udział przynajmniej pięciu osób.

44. Nowopowstający oddział wybiera tymczasowy Zarząd w składzie: Przewodniczący, Vice-przewodniczący i Sekretarz. Gdy liczba członków Oddziału wzrośnie do 20-tu, Zarząd Główny upoważnia Przewodniczącego Oddziału do zwołania Nadzwyczajnego Walnego Zgromadzenia członków Oddziału, celem dokonania wyboru Zarządu Oddziału w składzie: Przewodniczący, Vice-przewodniczący, Sekretarz i Skarbnik oraz 3-osobowej Komisji Rewizyjnej. Tryb powołania Zarządu Oddziału oraz czas trwania kadencji jest taki sam jak Zarządu Głównego. Pełnienie tej samej funkcji w Zarządzie Oddziału dopuszczalne jest przez okres dwóch kolejnych kadencji.

45. Na pokrycie kosztów związanych z działalnością – Oddziały otrzymują fundusze, których wielkość ustala Zarząd Główny.



46. Oddziały zobowiązane są składać raz do roku Zarządowi Głównemu sprawozdania z działalności naukowej, organizacyjnej i finansowej.

VI. 47. Majątek Towarzystwa powstaje z opłat: a/ wpisowych, b/ składek członkowskich, c/ subwencji państwowych, instytucji samorządowych, darowizn, spadków i zapisów.

48. Towarzystwo prowadzi księgi rachunkowe i inwentaryzacyjne, przygotowane do czynności i potrzeb, zgodnie z wymaganiami przepisów ogólnych.

49. Funduszami Towarzystwa dysponuje zgodnie z opracowanym i zatwierdzonym preliminarem Prezes lub Vice-prezes, wspólnie ze Skarbnikiem, albo osobą przez nich upoważnioną, zgodnie z obowiązującymi przepisami.

#### VII. Postanowienia końcowe

50. Zmiany statutu PTBK zapadają na mocy uchwały Walnego Zgromadzenia większością 2/3 głosów. Projekt zmiany Statutu powinien być przesłany członkom PTBK, co najmniej na trzy tygodnie przed Walnym Zgromadzeniem.

51. Rok gospodarczy Towarzystwa trwa od 1 stycznia do 31 grudnia.

52. Rozwiązanie Towarzystwa może nastąpić na mocy uchwały Walnego Zgromadzenia, powziętej większością 2/3 głosów członków obecnych na zebraniu. Walne Zgromadzenie, uchwalając rozwiązanie Towarzystwa, jednocześnie decyduje o sposobie likwidacji i o użyciu jego majątku.

*Kraków, 22 marca 1991*

## Z KRONIKI

W dniu 27 października 1992 r. powstało Polskie Towarzystwo Biologii Komórki (PTBK) z siedzibą w Krakowie. Zapytania o wszelkie informacje dotyczące przystąpienia do Towarzystwa prosimy kierować do prof. dr. hab. Wincentego Kilarskiego (ul. R. Ingardena 6, 30-060 Kraków)

Statut Towarzystwa zamieszczono wyżej.

## RECENZJA

Wydawnictwo TEXTUS w Krakowie wydało w 1992 r. "Kompedium histologii" autorstwa T. Cichockiego, J. Litwina i J. Mireckiej. Jak zanaczono w podtytule jest to skrypt przeznaczony dla studentów nauk medycznych i przyrodniczych. Obejmuje 344 strony tekstu wraz z ilustracjami. Autorzy starali się zwięźle przedstawić podstawowe informacje z zakresu cytologii i histologii, w zakresie, jaki wymagany jest od studentów pierwszych lat studiów medycyny. Łączą oni w sposób wyważony podstawowe wiadomości z najnowszymi osiągnięciami w zakresie biologii komórki. Opis struktur powiązany jest z wytłumaczeniem ich funkcji.

Układ treści jest analogiczny jak większości podręczników histologii. W pierwszej części przedstawione są wiadomości z cytologii i omówione są funkcje organelli. Druga poświęcona jest strukturze tkanek. Część trzecia zawiera opis budowy histologicznej narządów. Tekst uzupełniają liczne, czytelne i bardzo starannie wykonane schematy, co napewno ułatwi studentowi zrozumienie treści.

Jak w każdej zbiorowej publikacji obejmującej tak szeroki zakres tematów, poszczególne rozdziały różnią się nieco sposobem przedstawienia omawianego zagadnienia. Niektóre mogą być trudne dla początkującego studenta np. podrozdział 10.2. "Podstawowe pojęcia i mechanizmy w reakcjach immunologicznych" napisany w sposób hasłowy. Szkoda też, że Autorzy nie zastosowali się w pełni do Polskiego Mianownictwa Histologicznego (PZWL 1979) stosowanego w innych polskich publikacjach. Sądzę bowiem, że więcej można wywnioskować z mian opisujących położenie czy funkcję danej struktury niż z nazwiska autora, który ją opisał, np. z nazwy "przestrzeń okołozatokowa" niż przestrzeń Disse'a.

Mimo tych kilku uwag odnośnie redakcji tekstu, uważam Kompedium z Histologii za bardzo cenną i pożyteczną pomoc w nauce histologii dla studentów medycyny, ale także i innych studiów biologicznych.

*Zofia Bielańska-Osuchowska*



## 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 przysłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie 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 nadbitki, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona 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, a 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 zestawić 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*. *Expil 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 niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji.

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

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

## TREŚĆ

W tym zeszycie Postępów Biologii Komórki . . .	133
PIENKOWSKA A., ŚWITOŃSKI M.: Obszary jąderkotwórcze (NOR) u ssaków. Występowanie i polimorfizm	135
HÜBNER H., MORDALSKA A., BŁASZCZYK A: Genomowy <i>imprinting</i>	143
PORANKIEWICZ J., GWÓDŹ E. A.: Białka szoku termicznego i ich rola w komórkach roślinnych	155
WÓJCICKA-BARTEŁOMIEJCZYK B. I., WOJCIEROWSKI J.: Struktura i funkcja fibronektyny	171
HRYNIEWIECKA L.: Mitochondria ameby ( <i>Acanthamoeba castellanii</i> ) łączą energetyczne cechy mitochondriów roślin i zwierząt	181
OSTROWSKA H.: N-końcowe peptydazy komórkowe. I. Aminopeptydazy	201
HETMAN M.: Celowane modyfikowanie genomu ssaków	217
Statut Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki	239
Z Kroniki	244
Recenzja	244

**Warunki prenumeraty kwartalnika**  
**POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

**Prenumerata na rok 1993**

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1993 na konto:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;  
Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty) dla instytucji (bibliotek) wynosi 190 000 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 501132-40006576-2701-3-1110.  
*Price per year 20 dollars USA.*

**Indeks 369705**