

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

**TOM 20 NR-4'93**  
(353–464)

# Postępy Biologii Komórki

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*

---

Artykuły nadesłane do Redakcji i zamieszczone w roczniku 1993 Postępów  
Biologii Komórki recenzowali:

dr Andrzej Bacia  
prof. dr Zofia Bielańska-Osuchowska  
prof. dr Szczepan M. Biliński  
prof. dr Antoni Horst  
prof. dr Marek Jakóbsiak  
prof. dr Adam Jaworski  
prof. dr Zbigniew Kaniuga  
dr Maciej Kawalec  
prof. dr Jerzy Kawiak  
prof. dr Wincenty Kilariski  
prof. dr Jan Stanisław Knypl  
prof. dr Wanda Małgorzata Krajewska  
prof. dr Anna Lipińska  
prof. dr Jan Michejda  
prof. dr Maria Olszewska  
prof. dr Barbara Sztabert-Grzelakowska  
dr Cezary Wójcik  
prof. dr Maciej Zabel

Za tę społecznie wykonaną pracę i miłą współpracę serdecznie dziękujemy

## W tym Zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- O roli astrocytów w ośrodkowym układzie nerwowym można przeczytać na stronach 355–362.
- Hybrydyzacja in situ (ISH) jest nowoczesną techniką łączącą zalety histochemii i technik molekularnych (str.363)
- W artykule „Składanie kompleksu preinicjującego transkrypcję genów eukariotycznych” (s. 373) znajdują się najnowsze informacje dotyczące czynników transkrypcyjnych oraz inicjacji transkrypcji.
- Artykuł: N-końcowe peptydazy komórkowe. II peptydazy dipeptydylowe, tripeptydylowe i omega peptydazy (str. 389) jest kontynuacją artykułu z Postępów Biologii Komórki 20 (2) 201–216, 1993
- O metodzie mikroanalizy rentgenowskiej czytamy na str.403.
- Artykuł „Współzależności pomiędzy fotosyntetycznym i oksydacyjnym transportem elektronów u pro- i eukariontów” (s. 421) omawia wspólne ogniwa transportu elektronów u bakterii purpurowych, sinic oraz zielenic i roślin wyższych
- W artykule „Mutanty fitochromowe w badaniach mechanizmów fotomorfogenezы roślin” (s. 435) omówiono rolę chromoproteiny roślinnej – fitochromu – w regulacji morfogenezy na podstawie badania mutantów i roślin transgenicznych.
- Zbiór danych na temat gromadzenia czynników wzrostu w jądrach komórek docelowych znajdziemy na str.447.
- Tegoroczne nagrody Nobla z chemii, fizjologii i medycyny są omówione na str. 457.









## UDZIAŁ ASTROCYTÓW W REGULACJI NEURONALNEGO MIKROŚRODOWISKA

### CONTRIBUTION OF THE ASTROCYTES TO THE REGULATION OF THE NEURONAL MICROENVIRONMENT

Jadwiga JAWORSKA-ADAMU, Regina CYBULSKA, Agata WAWRZYNIAK-GACEK

Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Anatomii Zwierząt, Akademia Rolnicza, Lublin.

*Streszczenie.* Na podstawie literatury opisano współczesne poglądy dotyczące udziału astrocytów w regulacji neuronalnego mikrośrodowiska. Omówiono rolę astrocytów w utrzymaniu homeostazy potasu i wapnia, włączenie w metabolizm glutaminianu i GABA oraz występowanie receptorów dla niektórych neurotransmiterów lub neuromodulatorów. Wskazano na znaczenie wzajemnego oddziaływania pomiędzy neuronami i astrocytami oraz na regulujący wpływ astrogli na czynność neuronalną.

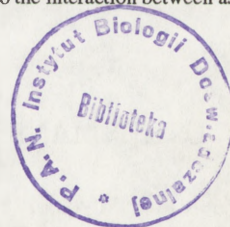
*Słowa kluczowe:* astrocyty, funkcja regulatorowa, receptory

*Summary.* On the basis of literature the current views on the contribution of the astrocytes to the regulation of the neuronal microenvironment have been described. The role of astrocytes in the homeostasis of potassium and calcium, their involvement into the metabolism of glutamate and GABA, and the presence of receptors for some neurotransmitters or neuromodulators have been discussed. There has been pointed to the interaction between astrocytes and neurones, and the regulative effect of astroglia on the neuronal function.

*Key words:* astrocytes, regulatory function, receptors.

### WPROWADZENIE

Pierwsze wiadomości o astrocytach datują się od badań Ramon y Cajala, który w 1913 r. zaobserwował je w mózgu człowieka. Opisał jako komórki gwiazdziste wyposażone w liczne wypustki często kończące się na naczyniach oraz zawierające granule w cytoplazmie zwane gliosomami. Później wyodrębnione zostały dwa typy astrocytów: protoplazmatyczne, charakterystyczne dla substancji szarej i włókniste dla substancji białej ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Badania te dały podstawę do pierwszych prób identyfikacji astrocytów w mikroskopie elektronowym (ME). Obydwa te typy scharakteryzowano początkowo jako



komórki o jasnej cytoplazmie i dużym kulistym jądrze, wyposażone w filamenty, ciała gęste i glikogen rozmieszczone w ciałach komórek i wypustkach. Dalsze badania w ME potwierdziły wcześniejsze obserwacje sugerujące jednak, że filamenty są raczej cechą astrocytów włóknistych aniżeli protoplazmatycznych. Pogląd ten potwierdziły niektóre obserwacje na poziomie ME astrocytów pochodzących z pierwotnej hodowli komórek glejowych. Więcej danych dostarczyły badania *in vitro* z użyciem przeciwciał monoklonalnych. Pozwoliły one na wyodrębnienie astrocytów typu-1 i typu-2. Obydwa typy zawierają filamenty glejowe zbudowane z glejowego, włóknikowego, kwaśnego białka (GFAP). Typ-1 rozwija się u ssaków przed urodzeniem, podczas gdy typ-2 po upływie pierwszego tygodnia życia postnatalnego. Obydwa typy wywodzą się z różnych komórek ukierunkowanych i nie są zdolne do przekształcania się z jednego typu w drugi. Uważa się, że typ-1 astrocytów koresponduje z astrocytami protoplazmatycznymi substancji szarej, a typ-2 odpowiada astrocytom włóknistym substancji białej OUN *in vivo*. Astrocyty przewyższają liczebnie neurony, stanowią ok. 1/4 objętości OUN ssaków, będąc jednocześnie środowiskiem dla neuronów [9, 21].

Doświadczenia ostatnich 30 lat prowadzone głównie na pierwotnych hodowlach komórek glejowych pozwoliły na głębszy wgląd w ich rolę fizjologiczną. Datują się one od badań Hydena (1959), który pierwszy poczynił próby izolacji komórek glejowych i neuronów, mogących być użyte jako żywe do badania ich funkcji. Dalsze badania pierwotnych hodowli astrocytów, jak też hodowli wspólnie z izolowanymi neuronami pozwoliły zgromadzić więcej wiadomości o wzajemnym oddziaływaniu między tymi dwoma typami komórek. Neurony metabolicznie wyspecjalizowane są w pewnych reakcjach, których ostatnim etapem jest synteza transmiterów. Astrocyty są komórkami metabolicznie bardzo aktywnymi, włączonymi w różne drogi metaboliczne. Najlepiej udokumentowanym wydaje się być udział astrocytów w regulacji pozakomórkowego stężenia jonów potasu i wapnia odgrywających ważną funkcję w neuronalnej pobudliwości, a także włączenie tych komórek w metabolizm takich neurotransmiterów, jak glutaminian i GABA (kwas  $\gamma$ -aminomasłowy). Wykazano również, że astrocyty mają receptory dla różnych neurotransmiterów i neuromodulatorów, których aktywacja wpływa na metabolizm astrocytów [8, 9].

## ROLA ASTROCYTÓW W UTRZYMANIU HOMEOSTAZY POTASU W MÓZGU

Jest ogólnie akceptowane, że astrocyty odgrywają kluczową rolę w homeostazie potasu na poziomie komórkowym w OUN. Podczas fizjologicznego pobudzenia neuronu stężenie potasu w przestrzeni pozakomórkowej wzrasta (z 3 do ok. 4 mM), a podczas apopleksji lub bezpośredniego pobudzenia dróg aferentnych wzrasta jeszcze bardziej (z 3 do 12 mM) i osiąga niezmiernie duże stężenie podczas niedotlenienia (80–100 mM). Wykazano, że po pobudzeniu, apopleksji i krótkotrwałym niedotlenieniu stężenie potasu powraca gwałtownie do poziomu spoczynkowego 3 mM [26]. Uważa się, że muszą istnieć mechanizmy dla usunięcia zwiększonego stężenia potasu z przestrzeni pozakomórkowej do naczyń krwionośnych lub płynu mózgowo-rdzeniowego albo też redystrybucja potasu odbywa się w obrębie OUN. Proces ten może odbywać się drogą dyfuzji w obrębie przestrzeni pozakomórkowej lub może obejmować przyległe komórki – neurony lub astrocyty. Proponowane są dwie różne hipotezy tłumaczące te procesy. Pierwsza z nich zakłada, że pozakomórkowy potas jest



gromadzony w astrocytach w drodze aktywnego wychwytu. Taki transport neuronalno-glejo- wy potasu wykazano u bezkręgowców. Jony potasu gromadzone w astrocytach przez aktywny wychwyty mogą być następnie reakumulowane w neuronach przez wychwyty wymagający energii. Druga hipoteza sugeruje, że miejscowy wzrost stężenia pozakomórkowego potasu jest usuwany poprzez astrocyty (połączone ze sobą) do innych regionów OUN. Proces ten określono jako bierny i nazwano przestrzennym mechanizmem buforowym (*spacial buffer mechanism*), w którym astrocyty działają jako elektrody potasowe. Utworzenie tej hipotezy zasugerowano na podstawie badań z izolowanymi astrocytami oraz badań immunohistochemicznych na skrawkach mózgu szczura, w których zaobserwowano specyficzne połączenia pomiędzy astrocytami w postaci złączy szczelinowych [7, 8, 28]. W OUN mogą odbywać się zarówno procesy aktywnego wychwytu nadmiaru jonów potasu, jak i poprzez przestrzenny mechanizm buforowy [26]. Dotychczas kwestią nie rozstrzygniętą jest, czy jony potasu mogą być transportowane przez astrocyty do różnych miejsc OUN i czy są one następnie uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej, czy też mogą być bezpośrednio transportowane z astrocytów do neuronów [7, 8].

## ROLA ASTROCYTÓW W PRZEPEŁYWIE JONÓW WAPNIA

Wapń odgrywa ważną rolę w regulacji czynności komórkowej OUN. Zwiększone stężenie pozakomórkowego potasu stymuluje wychwyty jonów wapnia do astrocytów i zwiększa ich poziom wewnątrzkomórkowy. Wolny wewnątrzkomórkowy wapń jest włączony w kontrolę takich procesów, jak: przepuszczalność błony, aktywacja drugich przekaźników i kinaz białkowych (np. kinazy C) oraz uwalnianie neurotransmiterów z neuronów [17]. Badania *in vitro* z użyciem hodowli komórek glejaka człowieka, izolowanych astrocytów i izolowanych neuronów, które umieszczano w medium o podwyższonym stężeniu potasu, pozwoliły wykazać, że wychwyty znakowanego wapnia przez komórki glejowe był wyższy aniżeli przez neurony. Sugeruje się, że podczas wzrostu neuronalnej aktywności duża ilość wapnia wchodzi do astrocytów, a neuronalnie uwolniony potas może zapoczątkować ten proces. Podwyższone stężenie potasu może także sprzyjać transportowi wapnia z komórek glejowych do przestrzeni pozakomórkowej. W badaniach pierwotnych hodowli astrocytów wykazano, że agoniści  $L_1$  i  $L_2$  receptorów adrenergicznych przyczyniają się do wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia w astrocytach. Dodanie do hodowli astrocytów glutamianu powoduje podobny efekt, który może rozprzestrzeniać się na połączone ze sobą astrocyty. Dane te wskazują, że proces gromadzenia wolnego wewnątrzkomórkowego wapnia w astrocytach może być regulowany przez niektóre neurotransmitery. Glej w ten sposób może być rezerwuarem wapnia zapobiegając nadmiernemu pobudzeniu neuronów [10, 20].

## UDZIAŁ ASTROCYTÓW W METABOLIZMIE GLUTAMIANU I GABA

Glutamian jest ważnym, pobudzającym neurotransmiterem uwalnianym w dużych ilościach z neuronów glutamatergicznych, jak wykazano to *in vivo*, jak też *in vitro* w skrawkach mózgu i hodowlach pierwotnych komórek ziarnistych mózdzku [7, 8, 10]. Neuronalnie



uwolniony glutaminian wychwytywany jest bardziej intensywnie do astrocytów aniżeli do neuronów. Wychwyt glejowy badano w tych komórkach otrzymanych gradientem wirowania i hodowlach pierwotnych astrocytów. Glutaminian jest przy udziale syntetazy glutaminowej (GS) przekształcany w glutaminę, która nie ma znaczenia transmitera, jest uwalniana do przestrzeni pozakomórkowej i powraca do neuronów glutamatergicznych. W obrębie neuronów jest metabolizowana do glutaminianu [7]. Neurony glutamatergiczne nie wykazują zdolności do przekształcania glutaminianu w glutaminę, gdyż syntetaza glutaminowa w mózgu nie występuje w neuronach, natomiast znajdowana była głównie w astrocytach i ostatnio w oligodendrocytach niektórych obszarów mózgu. Enzym zlokalizowany jest w cytoplazmie oligodendrocytów bezpośrednio otaczających neurony. W astrocytach natomiast występuje w wypustkach otaczających glutamatergiczne synapsy, co sugeruje, że astrocyty ograniczają możliwość działania glutaminianu jako transmitera [4]. Odmienna lokalizacja syntetazy glutaminowej w oligodendrocytach aniżeli w astrocytach jest łączona przez niektórych autorów z możliwością włączenia oligodendrogleju w metabolizm glutaminianu w odmienny sposób niż astrocytów [3, 18, 25].

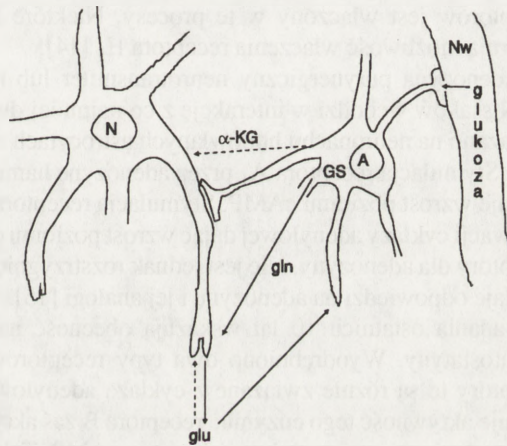
Glutamina tworzona w astrocytach jest nie tylko zużyta jako prekursor glutaminianu w neuronach, ponieważ duża część glutaminianu gromadzonego w astrocytach może być zużyta jako metaboliczny substrat, a jego grupa aminowa może być transaminowana do innych aminokwasów [7]. Uważa się, że przy nieuszkodzonej barierze krew-mózg zarówno glutaminian, jak i glutamina nie przenikają przez tę barierę i neurony muszą również być zdolne do wytwarzania glutaminianu z komponentów łatwo przenikających tę barierę, np. z glukozy. Tylko astrocyty (a nie neurony glutamatergiczne i GABA-ergiczne) mają aktywność karboksylazy pirogronianowej, enzymu pozwalającego na syntezę z glukozy szczawiooctanu i innych składników cyklu kwasów trójkarboksylowych m.in.  $\alpha$ -ketoglutaranu i jabłczanu. Te dwa ostatnie mogą być uwalniane z astrocytów, gromadzone w neuronach i użyte do tworzenia szkieletu węglowego dla glutaminianu. Wskazuje to na interakcję neuron – astrocyt – neuron regulującą zaopatrzenie, uwalnianie, wychwyt i metabolizm glutaminianu. Zależność neuronów glutamatergicznych od prekursorów glutaminianu pochodzących z astrocytów sugeruje, że te komórki glejowe mogą wywierać duży wpływ regulatorowy na transmisję glutamatergiczną. Z drugiej strony, neuronalnie uwolniony glutaminian jest ważny metabolicznie dla astrocytów [7, 8, 9, 10] (rys. 1.).

Innym ważnym neurotransmiterem jest kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA), który powstaje w neuronach GABA-ergicznych przez dekarboksylację glutaminianu. Uwalniany z tych neuronów GABA jest wychwytywany zarówno do neuronów, jak i astrocytów. Neuronalnie wychwycony GABA jest powtórnie zużyty jako transmitter. GABA wychwycony do astrocytów jest w obrębie tych komórek degradowany do składników cyklu kwasów trójkarboksylowych i stamtąd przez  $\alpha$ -ketoglutaran do glutaminianu i glutaminy. Wytworzona tą drogą glutamina może służyć do neuronalnej syntezy GABA. Uważa się, że neurony te nie są zdolne do normalnego funkcjonowania, jeżeli funkcja i metabolizm astrocytów są uszkodzone [7, 8].

## RECEPTORY ASTROCYTÓW

W hodowlach astrocytów oraz w hodowlach neuronów i astrocytów z różnych obszarów OUN za pomocą badań elektrofizjologicznych i autoradiograficznych wykazano obecność

licznych receptorów. Między innymi opisano receptory: adrenergiczne, dopaminowe, serotoninowe, histaminowe, adenyzynowe, somatostatynowe, muskarynowe i endotelinowe na astrocytach. Wśród receptorów adrenergicznych wyróżniono  $\alpha$  i  $\beta$ -adrenoceptory zarówno na neuronach, jak i na astrocytach. Receptory  $\alpha$ -adrenergiczne są zlokalizowane na niektórych astrocytach,  $\beta$ -adrenergiczne zaś na niemal wszystkich astrocytach [5, 6, 14, 22, 24]. Wykazano, że zarówno  $\alpha$ , jak i  $\beta$ -adrenoceptory mogą występować na błonach tych samych astrocytów [1, 14]. Aktywacja  $\beta$ -adrenoceptorów powoduje wzrost poziomu cAMP w astrocytach, a aktywacja  $\alpha$ -adrenoceptorów nie daje wzrostu poziomu cAMP, lecz może służyć do modulowania akumulacji cAMP w odpowiedzi na neurohumoralne substancje. Okazuje się, że różne podtypy  $\alpha$ -receptorów włączone są w różne procesy metaboliczne.  $\alpha_1$ -adrenoceptor włączony jest w metabolizm mleczanu, natomiast  $\alpha_1$ - i  $\alpha_2$ -adrenoceptory odgrywają ważną rolę w metabolizmie tlenowym. Wydaje się to być cechą tych receptorów, bowiem stymulacja receptora  $\beta$ -adrenergicznego nie daje takiego efektu [22, 24]. Receptory adrenergiczne są włączone również w metabolizm glikogenu, który jest prawie wyłącznie zlokalizowany w astrocytach. Aktywacja receptora  $\alpha_2$  przez agonistę (klonidynę) i aktywacja  $\beta$ -receptora przez noradrenalinę i izoproterenol wywołuje stymulację glikogenolizy. Sądzi się, że  $\alpha_1$ -receptor nie jest włączony w ten proces, bowiem użycie agonisty (fenylefryny) nie wywierało wpływu na glikogenolizę [23]. Aktywacja  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  adrenoceptorów przyczynia się do wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego wolnego wapnia w astrocytach [20].



Rysunek. Schemat udziału astrocytów w metabolizmie glutaminianu: A – astrocyt, N – neuron glutamatergiczny, Nw – naczynie włosowate; glutaminian (gln) uwalniany z neuronów glutamatergicznych jest wychwytywany do astrocytów, gdzie przy udziale syntazy glutaminowej (GS) jest przekształcany do glutaminy (glu); glutamina powraca do neuronów, gdzie przekształcana jest do glutaminianu; powstający w astrocytach i uwalniany z nich  $\alpha$ -ketoglutaran ( $\alpha$ -KG) może być gromadzony w neuronach i użyty do tworzenia szkieletu węglowego glutaminianu

W hodowlach neuronów i astrocytów prądkowia i rdzenia kręgowego szczura wykazano obecność receptorów dla dopaminy (DA). Wyróżniono dwa typy tych receptorów ( $D_1$  i  $D_2$ ) na astrocytach [14]. Sugeruje się, że astrocyty z różnych obszarów OUN mogą różnie odpowiadać na działanie dopaminy. W hodowli pierwotnej astrocytów pochodzących z prądkowia szczura (gdzie DA jest dominującym neurotransmiterem), DA powoduje zwiększenie poziomu cAMP, podczas gdy w astrogleju z pnia i kory mózgu nie przyczynia się do tworzenia cAMP [1].

Badaniami autoradiograficznymi w hodowlach astrocytów pochodzących z rdzenia kręgowego i pnia mózgu wykazano na tych komórkach podobnie jak i na neuronach obecność receptorów  $S_1$  (5-HT<sub>1</sub>) i  $S_2$  (5-HT<sub>2</sub>) dla serotoniny. Jednakże w porównaniu do neuronów z tych obszarów OUN astrocyty mają mniejszą liczbę miejsc wiążących dla serotoniny. Wiązanie serotoniny do miejsc receptorowych błon astrogleju powoduje wzrost poziomu cAMP, jak



również glikogenolizę w astrocytach otaczających perikariony neuronów, co może regulować dostarczenie glukozy do neuronów [11]. Wykazano przy użyciu hodowli astrogleju, że stymulacja receptora  $S_1$ -agonistą (ipzaperonem) przyczynia się do uwalniania z tych komórek specyficznego astroglejowego białka S-100, które dodane do hodowli neuronów płodu szczura powoduje ich wzrost. Sugeruje się na tej podstawie istnienie funkcjonalnej interakcji pomiędzy astrocytami i neuronami podczas rozwoju jako swoistej autoregulacji własnego wzrostu [27].

Astrocyty z mózdzku, pnia mózgu i rdzenia kręgowego mają miejsca wiążące w postaci receptorów  $H_1$  i  $H_2$  dla histaminy. Porównawcze badania autoradiograficzne z użyciem odpowiednich radioligandów ( $^3H$ ) histaminy i jej antagonistów) wykazały, że astrocyty mają znacznie mniejszą ilość receptorów dla histaminy aniżeli odpowiednie neurony. Tylko pewien typ populacji astrocytów ma receptory dla tej aminy. Uważa się, że obydwa typy receptorów dla histaminy występują na błonie tych samych astrocytów w obszarach OUN, w których ta amina jest neurotransmiterem lub neuromodelatorem. Histamina powoduje wzrost cAMP w komórkach astrogleju, a spadek lipidów inozytolu. Nie wiadomo jeszcze, który z typów receptorów jest włączony w te procesy. Niektóre badania na skrawkach mózgu szczura sugerują możliwość włączenia receptora  $H_1$  [14].

Adenozyna purynergiczny neurotransmitter lub neuromodulator w pewnych obszarach OUN ssaków wchodzi w interakcję z co najmniej dwoma typami receptorów  $A_1$  i  $A_2$ , które wykazano na neuronach i hodowlanych astrocytach z mózdzku i rdzenia kręgowego szczura [12]. Stymulacja receptora  $A_1$  przez adenozynę hamuje aktywność cykazy adenylowej oraz hamuje wzrost poziomu cAMP. Stymulacja receptora  $A_2$  przez adenozynę przyczynia się do aktywacji cykazy adenylowej dając wzrost poziomu cAMP. Tylko pewien typ astrocytów ma receptory dla adenozyny. Nie jest jednak rozstrzygnięta kwestia, jak duża ilość tych komórek nie daje odpowiedzi na adenozynę i jej analogi [15].

Badania ostatnich 10 lat wskazują obecność na astrocytach również receptorów dla somatostatyny. Wyodrębniono dwa typy receptorów: A ( $SS_A$ ) i B ( $SS_B$ ). Sądzi się, że receptory te są różnie związane z cyklazą adenylową, mianowicie stymulacja receptora A hamuje aktywność tego enzymu, receptora B zaś aktywuje cyklazę adenylową, a tym samym wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego cAMP. Takie obserwacje poczyniono w badaniach z użyciem hodowli astrocytów z kory mózgu i mózdzku szczura. Somatostatyna nie wywierała podobnego wpływu na astrocyty rdzenia kręgowego, co sugeruje, że receptory tego typu są charakterystyczne dla niektórych obszarów OUN [2, 16].

Podczas gdy obecność na astrocytach receptorów dla biogennych amin jest dobrze udokumentowana, to stosunkowo niewiele informacji zgromadzono na temat muskarynowych receptorów dla acetylocholiny. Badania ostatnich lat wydają się wskazywać na istnienie takich receptorów na astrogleju obszaru neostriatum [19].

Wykryta w 1988 roku przez Yanagisawa i wsp. endotelina, peptyd produkowany przez komórki śródbłonna naczyń, wywierający silne działanie obkurczające, ma miejsce receptorowe zarówno na neuronach, jak i na astrocytach. Ponadto astrocyty same produkują i wydzielają endotelinę, co łączone jest przez niektórych autorów z regionalną regulacją przepływu krwi w mózgu [13, 29].

Przedstawione dane wskazują na interakcję neuron-astrocyt-neuron oraz na pewną heterogenność astrocytów pod względem typu i gęstości miejsc receptorowych zlokalizowanych w błonie tych komórek. Astrocyty z poszczególnych obszarów OUN, w których dominuje jakiś neurotransmitter, mają więcej receptorów dla danego transmittera aniżeli w obszarach, w których danego transmittera jest mało. Regionalne różnice gęstości miejsc receptorowych



mogą wskazywać na specjalizację astrocytów, których udział w różnych procesach metabolicznych wywiera ważny wpływ regulatorowy na czynność neuronalną.

## LITERATURA

- [1] BAL-KLARA A, KAŁUŻA J. Współczesne poglądy na właściwości komórek nerwowych i glejowych hodowanych *in vitro*. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 71–82.
- [2] CHOLEWIŃSKI AJ, WILKIN GP. Astrocytes from forebrain, cerebellum, and spinal cord differ in their responses to vasoactive intestinal peptide. *J Neurochem* 1988; **51**: 1626–1633.
- [3] D'AMELIO F, ENG LF, GIBBS MA. Glutamine synthetase immunoreactivity is present in oligodendroglia of various regions of the central nervous system. *Glia* 1990; **3**: 335–341.
- [4] DERONICHE A, FROTSCHER M. Astroglial processes around unidentified glutamatergic synapses contain glutamine synthetase: evidence for transmitter degradation. *Brain Res* 1991; **552**: 346–350.
- [5] ERNSBERGER P, IACOVITTI L, REIS DJ. Astrocytes cultured from specific brain regions differ in their expression of adrenergic binding sites. *Brain Res* 1990; **517**: 202–208.
- [6] HANSSON E. Co-existence between receptors, carriers, and second messengers on astrocytes grown in primary cultures. *Neurochem Res* 1989; **14**: 811–819.
- [7] HERTZ L. Is Alzheimer's disease an anterograde degeneration, originating in the brainstem, and disrupting metabolic and functional interactions between neurons and glia cells? *Brain Res Rev* 1989; **14**: 335–353.
- [8] HERTZ L. Functional interactions between neurons and glial cells. Regulatory Mechanisms of Neuron to Vessel Communication in the Brain 1989; **33**: 271–305.
- [9] HERTZ L. Metabolism in rodent brain cell cultures – is it relevant for understanding of human inborn errors? *Int Pediatrics* 1991; **6**: 202–212.
- [10] HERTZ L. Neuronal – astrocytic interactions in brain development, brain function and brain disease. (w druku)
- [11] HÖSLI E, HÖSLI L. Autoradiographic localization of binding sites for  $H^3$ -serotonin and  $H^3$ -ketanserin on neurosomes and astrocytes of cultured rat brain stem and spinal cord. *Exp Brain Res* 1987; **65**: 486–490.
- [12] HÖSLI E, HÖSLI L. Autoradiographic studies on the uptake of adenosine and on binding of adenosine analogues in neurons and astrocytes of cultured rat cerebellum and spinal cord. *Neurosci* 1988; **24**: 621–628.
- [13] HÖSLI E, HÖSLI L. Autoradiographic evidence for endothelin receptors on astrocytes in cultures of rat cerebellum, brainstem and spinal cord. *Neurosci Lett* 1991; **129**: 55–58.
- [14] HÖSLI L, HÖSLI E. Electrophysiologic and autoradiographic evidence of receptors for biogenic amines on astrocytes in explant cultures of rat CNS. *Glial Cell Receptors*, Raven Press LTD, New York, 1988: 77–93.
- [15] HÖSLI L, HÖSLI E, UHR M, BRIOTTA GD. Electrophysiological evidence for adenosine receptors on astrocytes of cultured rat central nervous system. *Neurosci Lett* 1987; **79**: 108–112.
- [16] MENTLEIN R, BUCHHOLZ C, KRISCH B. Somatostatin – binding sites on rat telencephalic astrocytes; light – and electron microscopic studies *in vitro* and *in vivo*. *Cell Tissue Res* 1990; **262**: 431–443.
- [17] MILLER RJ. Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 1987; **235**: 46–52.
- [18] MIYAKE T, KITAMURA T. Glutamine synthetase immunoreactivity in two types mouse brain glial cells. *Brain Res* 1992; **586**: 53–60.
- [19] NISHI K, ATKINS PT, SURMEIER DJ, KITAI ST. Muscarinic regulation of cyclic AMP metabolism in rat neostriatal cultures. *Brain Res* 1990; **534**: 111–116.
- [20] SALM AK, MCCARTHY KD. Norepinephrine - evoked calcium transients in cultured cerebral type 1 astroglia. *Glia* 1990; **3**: 529–538.
- [21] SMITH GM, MILLER RII. Immature type - 1 astrocytes suppress glial scar formation, are motile and interact with blood vessels. *Brain Res* 1991; **543**: 111–122.
- [22] SUBBARAO KV, HERTZ L. Noradrenaline induced stimulation of oxidative metabolism in astrocytes but not in neurons in primary cultures. *Brain Res* 1990; **527**: 346–349.
- [23] SUBBARAO KV, HERTZ L. Effect of adrenergic agonists on glycogenolysis in primary cultures of astrocytes. *Brain Res* 1990; **536**: 220–226.
- [24] SUBBARAO KV, HERTZ L. Stimulation of energy metabolism by  $\alpha$ -adrenergic agonists in primary cultures of astrocytes. *J Neurosci* 1991; **28**: 399–405.
- [25] TANSEY FA, FAROOQ M, CAMMER W. Glutamine synthetase in oligodendrocytes and astrocytes; new biochemical and immunocytochemical evidence. *J Neurochem* 1991; **56**: 266–272.

- [26] WALZ W. Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Progress in Neurobiol* 1989; **33**: 309–333.
- [27] WHITAKER-AZMITIA PM, MURPHY R, AZMITIA EC. Stimulation of astroglial 5-HT<sub>1A</sub> receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* 1990; **528**: 155–158.
- [28] YAMAMOTO T, KARDAMI E, NAGY JI. Basic fibroblast growth factor in rat brain: localization to glial gap junctions correlates with connexin 43 distribution. *Brain Res* 1991; **554**: 336–343.
- [29] YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, TAMOBE Y, KOBAYASHI M, MITSUI Y, YAZAKI Y, GOTO K, MASAH T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; **332**: 411–415.

*Otrzymano: 15.02.1993*

*Przyjęto: 30.09.1993*

*Adres autora: ul. Akademicka 12, 20-934 Lublin*



# HYBRYDYZACJA IN SITU (ISH) W CYTOGENETYCE

## IN SITU HYBRIDIZATION (ISH) IN A CYTOGENETICS

M. Zawada<sup>1</sup>, A. Latos-Bieleńska<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań; <sup>2</sup>Zakład Genetyki Klinicznej, Instytut Pediatrii AM, Poznań

**Streszczenie.** Źródłem informacji genetycznej żywych organizmów są kwasy nukleinowe (DNA lub RNA). Zawierają one zespoły genów, warunkujące czynności życiowe roślin i zwierząt. Stosując technikę hybrydyzacji in situ, łączącą elementy biologii molekularnej i cytogenetyki, można wykryć specyficzne sekwencje kwasów nukleinowych na poziomie chromosomowym, komórkowym lub tkankowym. Metoda ISH jest obecnie szeroko stosowana zarówno w nauce eksperymentalnej (mapowanie i ekspresja genów, ewolucja genomu, układ przestrzenny jądra, mitozą i mejozą), jak również w badaniach klinicznych (cytogenetyka kliniczna, diagnostyka prenatalna, diagnostyka nowotworów).

**Summary.** Nucleic acids contain genetic information for structure and function of cell organism. The information-bearing sequences of DNA, known as genes, are spread along DNA molecule. ISH is one of the best and the most-direct techniques available for studies on gene localization, structure and expression. It combines technical achievements of molecular biology and cytogenetics. Application of ISH provides an opportunity to visualize specific DNA or RNA sequences in preparations of chromosomes, cells or tissue sections. It has been used widely both in research (genes mapping and expression, genome evolution, nuclear topography, mitosis, meiosis) as well as in clinical studies (clinical cytogenetics, prenatal diagnostics, cancer diagnostics).

**Wykaz skrótów:** AMCA – 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid-N-hydroxy-succinimide ester, BrdU – 5-bromo-dezoksyurydyna, analog tymidyny, cDNA – komplementarny DNA, CISS hybrydyzacja (ang. *chromosomal in situ suppression hybridization*) – hybrydyzacja przy użyciu złożonych sond hybrydyzacyjnych, komplementarnych do danego fragmentu chromosomu lub do całego chromosomu, DAB – 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate, FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*) – hybrydyzacja in situ, w której miejsce związania sondy uwidocznione jest przez zastosowanie fluorochromu, FITC – izotiocyanian fluoresceiny, FPG – technika fluorescencyjna połączona z barwieniem barwnikiem Giemsa, GTG – wzór prążkowy G uzyskany poprzez trawienie chromosomów trypsyną i barwienie barwnikiem Giemsa, ISH (ang. *in situ hybridization*) – metoda oparta na hybrydyzacji molekularnej umożliwiająca wykrywanie specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych w materiale biologicznym, *nick translation* – metoda znakowania sond molekularnych nukleotydami modyfikowanymi chemicznie lub radioizotopem z zastosowaniem DNazy I i polimerazy DNA I, PCR (ang. *polymerase chain reaction*) – synteza łańcuchowa fragmentów DNA z użyciem polimerazy i specyficznych primerów, płyn Denhardta – fikal + poliwinylolopiryrolidon + surowica bydłęca, QFH – fluoresceiny wzór prążkowy Q uzyskany przez zastosowanie związku Bisbenzimid (Hoechst 33258), *random priming technique* – metoda znakowania sond molekularnych nukleotydami modyfikowanymi chemicznie lub radioizotopem z zastosowaniem fragmentu Klenowa polimerazy DNA I, sekwencja "single copy" – sekwencja występująca w genomie w pojedynczej kopii, SSC – NaCl+ cytrynian sodu, SSCP – NaCl+ cytrynian sodu + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, TRITC – izotiocyanian tetrametylrodaminy



Jedną z technik umożliwiających badanie molekularnej organizacji genomu *Prokaryota* i *Eukaryota* stała się hybrydyzacja *in situ* (ISH). Po raz pierwszy hybrydyzację molekularną DNA/RNA przeprowadzono w późnych latach sześćdziesiątych na oocytach płazów. Użyto wówczas sond – 18S i 25S rRNA znakowanych trytem. Dzięki przeprowadzeniu badań u różnych przedstawicieli świata zwierząt, w tym również roślin, hybrydyzacja *in situ* stała się niezwykle ważnym narzędziem badawczym w cytogenetyce, cytologii i ewolucjonizmie.

Hybrydyzacja *in situ* pozwala na lokalizowanie specyficznych sekwencji DNA lub RNA bezpośrednio w materiale biologicznym (preparat cytogenetyczny, komórki, skrawki tkanki) znajdującym się na szkiełku podstawowym lub, rzadziej, w zawieszynie. Często jest ona stosowana do badania ekspresji genów przez wykrywanie informacyjnego RNA (mRNA) [41A,45A]. ISH służy również do identyfikacji wirusowych kwasów nukleinowych zintegrowanych z genomem komórki [41A]. W cytogenetyce hybrydyzacja sondy molekularnej następuje do DNA chromosomów mitotycznych lub mejotycznych, uzyskanych standardową metodą, niekiedy także bezpośrednio do DNA jąder interfazowych. ISH jest procesem wieloetapowym, na który składają się:

- przygotowanie sondy molekularnej,
- przygotowanie preparatów cytogenetycznych,
- hybrydyzacja,
- usunięcie niespecyficznie związanej sondy,
- detekcja sondy.

## 1. PRZYGOTOWANIE SONDY MOLEKULARNEJ

Sondami molekularnymi stosowanymi w ISH jest cDNA, fragmenty genomowego DNA, a także syntetyczne oligonukleotydy. Opisano metodę tworzenia repetytywnych sond DNA za pomocą PCR (*polymerase chain reaction*) [11]. W tzw. CISS hybrydyzacji (*chromosomal in situ suppression*) stosuje się złożone sondy hybrydyzacyjne, stanowiące heterogenną mieszaninę sekwencji komplementarnych dla danego fragmentu chromosomu lub nawet dla całego chromosomu.

Sonda molekularna powinna być odpowiednio przygotowana, aby mogła być następnie wykryta w miejscu hybrydyzacji. Osiąga się to przez wprowadzenie do niej zwykle w drodze *nick translation* [37], *random priming technique* [12] lub PCR [30] nukleotydów radioaktywnych lub modyfikowanych chemicznie.

### a. SONDY RADIOAKTYWNE

Ogólną zaletą sond radioaktywnych jest wysoka czułość, umożliwiająca stosowanie do hybrydyzacji samego insertu. Radioizotopem najczęściej stosowanym w ISH jest  $^3\text{H}$ , który daje najlepszą rozdzielczość i małe tło, jego wadą natomiast jest długi okres ekspozycji podczas autoradiografii (1–4 tygodnie). Z tych względów do znakowania sond molekularnych stosuje się niekiedy  $^{125}\text{I}$ , wówczas autoradiografia trwa krócej, jednak powstaje silniejsze tło, a także większe sygnały, na czym traci rozdzielczość metody. Innym radioizotopem stosowanym do znakowania sond molekularnych do ISH jest  $^{35}\text{S}$ .

Rozdzielczość ISH z zastosowaniem sond radioaktywnych jest jednak ograniczona długością emitowanego promieniowania oraz wielkością ziaren emulsji fotograficznej. W celu zwiększenia rozdzielczości metody niektórzy autorzy zastosowali do obserwacji sygnałów mikroskop elektronowy [27].

#### b. SONDY MODYFIKOWANE CHEMICZNIE

W ostatnich latach obserwuje się szerokie zastosowanie sond molekularnych modyfikowanych chemicznie. Ich popularność stale wzrasta i wypierają one stopniowo sondy radioaktywne. W przeciwieństwie do sond radioaktywnych, ulegających radiolizie, sondy modyfikowane chemicznie są trwałe (ok. 1 roku w  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Zaletą sond modyfikowanych chemicznie jest także, oprócz wyeliminowania izotopów radioaktywnych, wysoka rozdzielczość metody, a przez to możliwość precyzyjnego określenia miejsca hybrydyzacji sondy. Ocenia się, że lokalizacja sekwencji z zastosowaniem sond nieizotopowych jest 20-krotnie dokładniejsza w porównaniu z ISH z użyciem sond izotopowych [26]. Następną zaletą sond modyfikowanych chemicznie jest możliwość bardzo szybkiej detekcji sondy (2–3 godziny) po przeprowadzonej hybrydyzacji. Ma to szczególne znaczenie w sytuacjach, gdy wynik musi być wydany szybko (diagnostyka prenatalna). Ponadto, można na tym samym preparacie cytogenetycznym prowadzić hybrydyzację *in situ* równocześnie z kilkoma sondami, z których każda jest znakowana w inny sposób [35,41A]. ISH z użyciem sond modyfikowanych chemicznie była stosowana początkowo do wykrywania sekwencji powtarzalnych. Uważano, że nie jest wystarczająco czuła dla detekcji sekwencji *single copy*. Ostatnio dzięki wprowadzeniu wieloetapowych reakcji immunocytochemicznych, sondy modyfikowane chemicznie stosuje się z powodzeniem do wykrywania sekwencji występujących nawet w jednej kopii w genomie.

Substancjami stosowanymi do przygotowania sond modyfikowanych chemicznie są biotyna [6,24,36,41A], fotobiotyna będąca fotoaktywnym analogiem biotyny [45], digoksygenina [19, 41A,46], acetylaminofluoren [23,41,41A], Brdu [13], rtęć [35, 41A] i inne. Do tej pory najczęściej stosowana była biotyna, jednak obecnie coraz większą popularność zdobywa digoksygenina.

Sondy zawieszają się w mieszaninie hybrydyzacyjnej, zawierającej nośnikowy DNA (i/lub RNA), SSCP, siarczan dekstranu, formamid, ew. płyn Denhardta. Stężenie sondy w mieszaninie hybrydyzacyjnej i skład mieszaniny hybrydyzacyjnej można modyfikować w szerokim zakresie. Zwykle stosuje się 1–20 ng sondy w 20–50  $\mu\text{l}$  mieszaniny hybrydyzacyjnej na preparat. Formamid i sole zawarte w mieszaninie hybrydyzacyjnej obniżają temperaturę topnienia DNA. Nośnikowy DNA (RNA) i płyn Denhardta zapobiegają nieswoistej hybrydyzacji. Siarczan dekstranu zwiększa efektywność hybrydyzacji [18] poprzez ułatwienie tworzenia konglomeratów (sieci – *network*) sondy w miejscu hybrydyzacji, co wzmacnia sygnał. Bezpośrednio przed nałożeniem na preparat sondę denaturuje się poprzez ogrzanie w temp. 80–100 $^{\circ}\text{C}$  i następnie gwałtownie oziębia.

W CISS hybrydyzacji, w której stosuje się złożone sondy zawierające heterogenną mieszaninę sekwencji *single copy* oraz sekwencji średnio i wysoko powtarzalnych, konieczna jest nieco odmienna strategia, mająca na celu zapobieżenie nieswoistemu wiązaniu się sondy do wielu chromosomów, co jest spowodowane występowaniem sekwencji wysoko powtarzalnych w wielu miejscach w genomie. Do sondy dodaje się całkowity ludzki DNA i po denaturacji sondy pozwała na hybrydyzację sekwencji wysoko powtarzalnych jeszcze w



próbówce. Dopiero po tym wstępnym etapie nakłada się sondę hybrydazyjną na preparat [28].

## 2. PRZYGOTOWANIE PREPARATÓW

Hybrydycję *in situ* można prowadzić zarówno do DNA chromosomów mitotycznych lub mejotycznych, jak również do jąder interfazowych. Jeśli ISH następuje do chromosomów metafazowych, preparaty są sporządzane zasadniczo w sposób standardowy, należy jednak podkreślić, że muszą one być bardzo dobrej jakości. Z tych względów do uzyskania preparatów dla ISH najczęściej stosuje się hodowlę limfocytów. Korzystnie jest hodowlę limfocytów zsynchronizować dla uzyskania wysokiego indeksu mitotycznego.

Sposób przygotowania szkiełek podstawowych ma wpływ na stopień niespecyficznego wiązania sondy. Niektórzy autorzy powlekają szkiełka podstawowe substancjami mającymi wyeliminować nieswoiste wiązanie sondy [14], zasadniczo jednak wystarcza wytrawienie szkiełek podstawowych w chromianie.

Przed ISH [18] preparaty trawi się RNazą, która usuwa RNA mogący konkurować z sondą o miejsce na chromosomie i hybrydować z sondą zwiększając tło. Po trawieniu RNazą preparaty cytogenetyczne płucze się w 2xSSC i przeprowadza przez wzrastający szereg alkoholi. Niektórzy autorzy trawią preparaty także proteinazą K [17, 36]. Przed nałożeniem sondy hybrydazyjnej należy zdenaturować chromosomowy DNA. Do denaturacji stosuje się 70% formamid (temp. 70°C) [38] lub 0,07 N NaOH (temp. pokojowa). Dla sekwencji powtarzalnych zaleca się 0,2 N HCl, który wprowadzie denaturuje chromosomowy DNA w mniejszym stopniu, jednak pozwala zachować bardzo dobrą strukturę chromosomów. Po denaturacji, płukaniu w 2xSSC i przeprowadzeniu przez szereg alkoholi, preparaty są gotowe do hybrydycacji.

Niektórzy autorzy denaturują równocześnie sondę i chromosomowy DNA przez ogrzanie szkiełka podstawowego już po nałożeniu sondy na preparat.

## 3. HYBRYDYZACJA

Hybrydycję przeprowadza się pod szkiełkiem nakrywkowym w komorze wilgotnej lub po uszczelnieniu brzegów szkiełka nakrywkowego (np. guma arabska lub olej parafinowy). Warunki hybrydycacji powinny być tak dobrane, aby umożliwić precyzyjne formowanie dupleksu. Temperatura ISH wynosi 37–45°C, zwykle ok. 42°C, czas – 2–24 godzin, w zależności od rodzaju i stężenia sondy.

## 4. USUNIĘCIE NIESPECYFICZNIE ZWIĄZANEJ SONDY

Nadmiar niezhybrydowanej sondy i niespecyficznie związaną sondę usuwa się po hybrydycacji poprzez wieloetapowe płukania preparatów w roztworze formamidu oraz w

SSC, modyfikując stężenie soli, liczbę kąpieli płuczących i temperaturę w zależności od rodzaju sondy.

## 5. DETEKCJA SONDY ZWIĄZANEJ Z PREPARATEM

Sondy radioaktywne wykrywa się autoradiograficznie stosując płynne emulsje fotograficzne. Po autoradiografii chromosomy barwi się barwnikiem Giemsy [3,5] i stosuje rozmaite techniki prążkowe, odpowiednio zmodyfikowane, np.: FPG [3,5,25], G z barwnikiem Wrighta [21]. Sondy modyfikowane chemicznie wykrywa się reakcją immunocytochemiczną lub reakcją powinowactwa, stosując przeciwciała lub białka wykazujące duże powinowactwo do modyfikowanych chemicznie nukleotydów [41A]. Bardzo rzadko mikroskopowo wykrywalne znakowanie jest kowalencyjnie związane z sondą molekularną, np. opisano RNA znakowane fluorochromem [1]. Sondy dla sekwencji powtarzalnych można wykryć w jednoetapowej reakcji, np. w przypadku sondy biotynowanej mogłaby to być awidyna sprzężona z fluorochromem [26].

Do wykrycia sond dla sekwencji *single copy* należy stosować wieloetapową reakcję immunocytochemiczną. Dobranie warunków reakcji immunocytochemicznej zmierza do maksymalnego wzmocnienia sygnału, jednak bez zwiększenia tła. Przyjmuje się, że każdy kolejny etap reakcji immunocytochemicznej wzmacnia 6-krotnie sygnał [36]. Ostatnie przeciwciało jest sprzężone z substancją, która powoduje reakcję możliwą do zaobserwowania w zwykłym mikroskopie świetlnym, fluorescencyjnym lub w mikroskopie ze światłem spolaryzowanym. Substancjami tymi są zazwyczaj enzymy (peroksydaza, alkaliczna fosfataza) lub fluorochromy (izotiocyanian fluoresceiny i in.). Dla sondy biotynowanej można zastosować np. następującą reakcję immunocytochemiczną:

– przeciwciało królicze przeciwko biotynie – przeciwciało świni przeciwko króliczej Ig sprzężone z biotyną – kompleks streptawidyna-peroksydaza – reakcja z DAB.

W przypadku, gdy przeciwciała są sprzężone z fluorochromem, otrzymujemy fluorescencyjną hybrydyzację in situ (FISH). Stosując odpowiednie fluorochromy lub ich kombinacje można uzyskać: barwę zieloną (FITC – izotiocyanian fluoresceiny), czerwoną (TRITC – izotiocyanian tetrametylodaminy), pomarańczową (FITC+TRITC) lub niebieską (AMCA – *7-amino-methyl-coumarin-3-acetic acid-N-hydroxysuccinimide ester*) [41A,43].

W mikroskopii fluorescencyjnej obraz może być poddany analizie komputerowej (*digital imaging microscopy*) [42]. Mikroskopia ta pozwala na wzmocnienie sygnału w miejscu związania sondy hybrydyzacyjnej oraz podnosi rozdzielczość metody, umożliwiając precyzyjną lokalizację nawet pojedynczych sekwencji *single copy*.

Rozpoznanie chromosomu i dokładne określenie miejsca, do którego nastąpiło przyłączenie sondy w hybrydyzacji nieizotopowej, można przeprowadzić w następujący sposób:

- Przed hybrydyzacją preparat należy poddać trawieniu trypsyną i wybarwić barwnikiem Giemsy, a następnie wybrane mitozy ze wzorem prążkowym GTG sфотографować.
- Po hybrydyzacji enzymatycznej lub fluorescencyjnej należy wykonać zdjęcia tych samych mitoz i porównać z wcześniej otrzymanymi [39]. Po hybrydyzacji można również zastosować inne typy prążków np. QFH [40].



## 6. WYKORZYSTANIE HYBRYDYZACJI IN SITU

Hybrydyzacja in situ znalazła szerokie zastosowanie zarówno w cytogenetyce klinicznej, jak i eksperymentalnej [27, 28, 29]. ISH stosuje się w pre- i postnatalnej diagnostyce aberracji chromosomowych do identyfikacji materiału genetycznego niemożliwego do identyfikacji tradycyjnymi technikami cytogenetycznymi. Na przykład w zespole Pallister-Killian izochromosom 12p jest przy zastosowaniu wyłącznie klasycznych metod cytogenetycznych często błędnie określany jako duplikacja 21q i dopiero ISH umożliwia właściwe rozpoznanie cytogenetyczne [2]. Za pomocą ISH można określić punkty pęknięć chromosomów i wykryć submikroskopowe aberracje chromosomowe. Drogą tą wykryto m.in. niewielką translokację t(4;10), która w następnym pokoleniu przyczyniła się do powstania monosomii 4p16-pter, związanej z zespołem Wolf-Hirschhorna [16]. Wymienione zastosowania hybrydyzacji dotyczą również cytogenetyki onkologicznej, w której ISH może być wykorzystywana także do wykrywania amplifikacji onkogenów, np. ERBB2 w nowotworach piersi i jajnika lub też N-myc w neuroblastoma [22, 27]. ISH można również stosować do wykrywania delecji genowych.

Rosnące zainteresowanie budzi obecnie CISS hybrydyzacja, zwana także *chromosome painting technique*. Z powodzeniem została ona już zastosowana w wielu przypadkach i coraz chętniej badacze sięgają po nią w zakresie: identyfikacji ludzkich chromosomów w różnych hybrydach komórkowych oraz detekcji indukowanych uszkodzeń chromosomowych. Dzięki badaniom z użyciem CISS hybrydyzacji pogłębiono wiedzę na temat przebiegu męskiej mejozy. Za jej pośrednictwem prześledzono losy chromosomów Y w zdekondensowanym męskim materiale genetycznym, a także przeprowadzono analizę częstości chiasm i pierwszej mejotycznej segregacji u nosicieli translokacji [15].

Metoda ta okazała się również niezwykle przydatna w identyfikacji chromosomów markerowych, a także w wykrywaniu złożonych aberracji struktury chromosomów. Umożliwiła ona m.in. scharakteryzowanie 10 markerów chromosomowych w raku prostaty [4].

Inną modyfikacją ISH jest prowadzenie hybrydyzacji z różnie wyznakowanymi sondami równocześnie. Opisano zastosowanie ISH z trzema sondami hybrydyzacyjnymi do wykrycia liczbowych aberracji chromosomowych w komórkach guza jajnika [35].

ISH stanowi niezastąpioną metodę mapowania chromosomów człowieka. Pierwszym genem, który tą metodą został zmapowany, był gen łańcuchów lekkich kappa immunoglobuliny w krótkim ramieniu chromosomu 2 [31]. Ostatnio coraz częściej stosowane są w tym celu sondy niezotopowe, co wybitnie podnosi rozdzielczość metody.

Hybrydyzacja in situ znalazła także zastosowanie w badaniach w dziedzinie ewolucjonizmu porównawczego. Badania dotyczące podobieństw morfologii chromosomów człowieka, naczelnych i innych ssaków są obecnie uzupełniane przez ISH [20,44]. Doskonałym przykładem jest zastosowanie FISH do analizy sekwencji telomerowej u człowieka i innych ssaków, a także u przedstawicieli ryb, płazów, gadów i ptaków. Na podstawie badań obejmujących ponad 100 gatunków wysunięto wniosek o silnej stabilności ewolucyjnej DNA w regionie telomerów [34].

W ostatnich latach intensywnie rozwinęła się cytogenetyka interfazowa [9]. Stwierdzono, że DNA poszczególnego chromosomu zajmuje w jądrze interfazowym ograniczone terytorium [8,32]. Wykorzystując to zjawisko można drogą hybrydyzacji sondy bezpośrednio do jąder interfazowych szybko wykryć aberracje liczby, np. trisomię 18 w amniocytach [7] i

struktury chromosomów, jak wspomniany już izochromosom 12p w leukocytach krwi obwodowej [33]. Metodę tę zastosowano w diagnostyce prenatalnej, a także do cytogenetycznej diagnostyki onkologicznej [10]. ISH stosowano także do badania przestrzennej organizacji sprzężonych genów [28].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] BAUMAN JG, WIEGANT J, van DUIJN P. Cytochemical hybridization with fluorochrome-labelled RNA. III. Increased sensitivity by the use of anti-fluorescein antibodies. *Histochemistry* 1981; **73**: 181–193.
- [2] BLANCATO JK, HUNT M, GEORGE J, KATZ J, MECK JM. Prenatal diagnosis of tetrasomy 12p by in situ hybridization: varying levels of mosaicism in different fetal tissues. *Prenatal Diagnosis* 1992; **12**: 979–983.
- [3] BLANQUET V, TURLEAU C, GOOSSENS M, BESMOND C. Assignment of the human recombination activating gene 1 (RAG1) to the 14q21.3-q22.2 region. *Genomics* 1992; **13**: 488–489.
- [4] BROTHMAN AR, PATEL AM. Characterization of 10 marker chromosomes in a prostatic cancer cell line by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1992; **60**: 8–11.
- [5] CASTELLA-ESCOLA J, MATTEI MG, OJCIUS DM, PASSAGE E, VALENTIN C, COHEN-SOLAL M. In situ mapping of the muscle-specific form of phosphoglycerate mutase gene to human chromosome 7p12–7p13. *Hum Genet* 1990; **84**: 210–212.
- [6] CHERIF D, BERNARD O, BERGER R. Detection of single-copy genes by nonisotopic in situ hybridization on human chromosomes. *Hum Genet* 1989; **81**: 358–362.
- [7] CHRISTENSEN B, BRYNDORF T, PHILIP J, LUNDSTEEN C, HANSEN W. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 18 and triploidy in interphase nuclei of uncultured amniocytes by non-radioactive in situ hybridization. *Prenatal Diagnosis* 1992; **12**: 241–250.
- [8] CREMER T, CREMER C, SCHNEIDER T, BAUMANN H, HENS L, KIRSCH-VOLDERS M. Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of chinese hamster cells by laser-uv-microirradiation experiments. *Hum Genet* 1982; **62**: 201–209.
- [9] CREMER T, LANDEGENT J, BRUECKNER A, SCHOLL HP, SCHARDIN M, HAGER HD, DEVILEE P, PEARSON P, VAN DER PLOEG M. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet* 1986; **74**: 346–352.
- [10] CREMER T, TESIN D, HOPMAN AHN, MANUELIDIS L. Rapid interphase and metaphase assessment of specific chromosomal changes in neuroectodermal tumor cells by in situ hybridization with chemically modified DNA probes. *Exp Cell Res* 1988; **176**: 199–220.
- [11] DUNHAM I, LENGAUER CH, CREMER T, FEATHERSTONE T. Rapid generation of chromosome-specific aliphoid DNA probes using the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1992; **88**: 457–462.
- [12] FEINBERG AP, VOGELSTEIN B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; **132**: 6–13.
- [13] FROMMER M, PAUL C, VINCENT PC. Localisation of satellite DNA sequences on human metaphase chromosomes using bromodeoxyuridine-labelled probes. *Chromosoma* 1988; **97**: 11–18.
- [14] GERHARD DS, KAWASAKI ES, BANCROFT FC, SZABO P. Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 3755–3759.
- [15] GOLDMAN ASH, HULTÉN MA. Chromosome in situ suppression hybridisation in human male meiosis. *J Med Genet* 1992; **29**: 98–102.
- [16] GOODSHIP J, CURTIS A, CROSS I, BROWN J, EMSLIE J, WOLSTENHOLME J, BHATTACHARYA S, BURN J. A submicroscopic translocation, t(4;10), responsible for recurrent Wolf-Hirschhorn syndrome identified by allele loss and fluorescent in situ hybridisation. *J Med Genet* 1992; **29**: 451–454.
- [17] GRIFFIN DK, WILTON LJ, HANDYSIDE AH, WINSTON RML, DELHANTY JDA. Dual fluorescent in situ hybridisation for simultaneous detection of X and Y chromosome-specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Hum Genet* 1992; **89**: 18–22.
- [18] HARPER ME, SAUNDERS GF. Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* 1981; **83**: 431–439.



- [19] HEILES HBJ, GENERSCH E, KESSLER C, NEUMANN R, EGGERS HJ. In situ hybridization with digoxigenin-labeled DNA of human papillomaviruses (HPV 16/18) in HeLa and SiHa cells. *Biotechniques* 1988; **10**: 978–981.
- [20] JAUCH A, WIENBERG J, STANYON R, ARNOLD N, TOFANELLI S, ISHIDA T, CREMER T. Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 8611–8615.
- [21] JONES TA, BARKER HM, da CRUZ e SILVA EF, MAYER-JAEKEL RE, HEMMINGS BA, SPURR NK, SHEER D, COHEN PTW. Localization of the genes encoding the catalytic subunits of protein phosphatase 2A to human chromosome bands. *Cytogenet Cell Genet* 1993; **63**: 35–41.
- [22] KALLIONIEMI OP, KALLIONIEMI A, KURISU W, THOR A, CHEN LC, SMITH HS, WALDMAN FM, PINKEL D, GRAY JW. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 5321–5325.
- [23] LANDEGENT JE, JANSEN in de WAL N, PLOEM JS, van der PLOEG M. Sensitive detection of hybridocytochemical results by means of reflection-contrast microscopy. *J Histochem Cytochem* 1985; **33**: 1241–1246.
- [24] LANGER PR, WALDROP AA, WARD DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 6633–6637.
- [25] LAUTNER-RIESKE A, HAMEISTER H, BARBI G, ZACHAU HG. Mapping immunoglobulin gene-related DNA probes to the central region of normal and pericentrically inverted human chromosome 2. *Genomics* 1993; **16**: 497–502.
- [26] LAWRENCE JB, VILLNAVE CA, SINGER RH. Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 1988; **52**: 51–61.
- [27] LI C, WU M, MARGITICH IS, DAVIDSON N. Gene mapping on human metaphase chromosomes by in situ hybridization with  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ , and  $^{32}\text{P}$  labeled probes and transmission electron microscopy. *Chromosoma* 1986; **93**: 305–312.
- [28] LICHTER P, CREMER T, BORDEN J, MANUELIDIS L, WARD DC. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 1988; **80**: 224–234.
- [29] LICHTER P, WARD DC. Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age?. *Nature* 1990; **345**: 93–94.
- [30] LION T, HAAS OA. Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction. Tagung der Gesellschaft für Humangenetik 1990, Bonn 28–31.03.
- [31] MALCOLM S, BARTON P, MURPHY C. Localization of human immunoglobulin kappa light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 4957–4961.
- [32] MANUELIDIS L. Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. *Hum Genet* 1985; **71**: 288–293.
- [33] McLEANS, STANLEY W, STERN H, FONDA-ALLEN J, DEVINE G, ELLINGHAM T, ROSENBAUM K. Prenatal diagnosis of Pallister-Killian syndrome: resolution of cytogenetic ambiguity by use of fluorescent in situ hybridization. *Prenatal Diagnosis* 1992; **12**: 985–991.
- [34] MOYZIS RK. The human telomere. *Scientific American* 1991; **2**: 34–41.
- [35] NEDERLOF PM, ROBINSON D, ABUKNESHA R, WIEGANT J, HOPMAN AHN, TANKE HJ, RAAP AK. Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* 1989; **10**: 20–27.
- [36] PINKEL D, STRAUME T, GRAY JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 2934–2938.
- [37] RIED T, MAHLER V, VOGT P, BLONDEN L, van OMMEN GJB, CREMER T, CREMER M. Direct carrier detection by in situ suppression hybridization with cosmid clones of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. *Hum Genet* 1990; **85**: 581–586.
- [38] SCHUBERT I, SCHRIEVER-SCHWEMMER G, WERNER T, ADLER I-D. Telomeric signals in Robertsonian fusion and fission chromosomes: implications for the origin of pseudoaneuploidy. *Cytogenet Cell Genet* 1992; **59**: 6–9.
- [39] SPELEMAN F, van der AUWERA B, MANGELSCHOTS K, VERCRUYSSSEN M, RAAP T, WIEGANT J, CRAEN M, LEROY J. Identification and characterization of normal length nonfluorescent Y chromosomes: cytogenetic analysis, Southern hybridization and non-isotopic in situ hybridization. *Hum Genet* 1990; **85**: 569–575.
- [40] TORY K, LATIF F, MODI W, SCHMIDT L, WEI MH, LI H, COBLER P, ORCUTT ML, DELISIO J, GEIL L J. A genetic linkage map of 96 loci on the short arm of human chromosome 3. *Genomics* 1992; **13**: 275–286.

- [41] TCHEN P, FUCHS RPP, SAGE E, LENG M. Chemically modified nucleic acids as immunodetectable probes in hybridization experiments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 3466–3470.
- [41A] Van der PLOEG M. Hybridocytochemistry – state of the art. *PBK* 1989; **16**: 349–363.
- [42] VIEGAS-PEQUIGNOT E, DUTRILLAUX B, MAGDELENAT H, COPPEY-MOISAN M. Mapping of single-copy DNA sequences on human chromosomes by in situ hybridization with biotinylated probes: Enhancement of detection sensitivity by intensified-fluorescence digital-imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 582–586.
- [43] WIEGANT J, WIESMEIJER CC, HOOVERS JMN, SCHUURING E, d'AZZO A, VROLIJK J, TANKE HJ, RAAP AK. Multiple and sensitive fluorescence in situ hybridization with rhodamine-, fluorescein-, and coumarin-labeled DNAs. *Cytogenet Cell Genet* 1993; **63**: 73–76.
- [44] WIENBERG J, JAUCH A, STANYON R, CREMER T. Molecular cytogenetics of primates by chromosomal in situ suppression hybridization. Tagung der Gesellschaft für Humangenetik 1990, Bonn 28–31.03.
- [45] ZABEL M. Immunocytochemia. Praca zbiorowa, PWN 1990; 197–213.
- [45A] ZABEL M. Hybridocytochemia w badaniach nad regulacją genu kalcytoninowego w komórkach parafolikularnych tarczycy. *PBK* 1991; **18**: 47–53.
- [46] ZISCHLER H, NANDA I, SCHÄFER R, SCHMID M, EPPLEN JT. Digoxigenated oligonucleotide probes specific for simple repeats in DNA fingerprinting and hybridization in situ. *Hum Genet* 1989; **82**: 227–233.

Otrzymano: 08.09.1993 r.

Przyjęto 26.10.1993 r.

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





# SKŁADANIE KOMPLEKSU PREINICJUJĄCEGO TRANSKRYPCJĘ GENÓW EUKARIOTYCZNYCH

## FORMING PREINITIATION TRANSCRIPTION COMPLEX OF EUKARYOTIC GENES

Anna GOŹDZICKA-JÓZEPIAK

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM w Poznaniu

**Streszczenie.** Inicjacja transkrypcji genów eukariotycznych jest procesem złożonym, w którym biorą udział specyficzne polimerazy RNA (pol I, pol II, pol III), jak również liczne wspomagające je czynniki transkrypcyjne. Znany jest szereg czynników białkowych specyficznie współdziałających z jądrowymi polimerazami RNA. W inicjacji transkrypcji przy udziale polimerazy RNA II biorą udział dwie grupy czynników transkrypcyjnych. Do grupy I należą czynniki zwane generalnymi lub podstawowymi, których obecność jest niezbędna do transkrypcji wszystkich genów transkrybowanych przy udziale polimerazy RNA II, natomiast do grupy drugiej zaliczane są czynniki specyficzne dla poszczególnych genów. Podstawowe czynniki transkrypcyjne tworzą kompleks z polimerazą RNA II w pobliżu miejsca startu transkrypcji. Oddziałują one z głównymi elementami promotora stannowiacymi jego rdzeń. Jednym z takich elementów jest *TATA box* zlokalizowany w odległości 25–30 par zasad (pz) od miejsca startu transkrypcji. Liczne z promotorów mają także element inicjatorowy. Oddziaływanie czynników podstawowych z promotorem doprowadza do formowania kompleksu transkrypcyjnego zdolnego do prowadzenia podstawowego procesu transkrypcji, przy braku specyficznych czynników transkrypcyjnych. W komórkach ssaków w procesie transkrypcji bierze udział co najmniej sześć czynników podstawowych (TFII, A, B, D, E, F, I, H). Najważniejszą rolę w tym procesie odgrywa TBP wiążący się z elementem promotorowym *TATA box* i czynnik TF II D. Wszystkie czynniki transkrypcyjne wiążą się z promotorem w określonej kolejności tworząc stabilny kompleks preinicjujący (PIC). Transkrypcja przy udziale polimerazy RNA jest regulowana przez specyficzne białka aktywnie oddziałujące z podstawowymi czynnikami transkrypcyjnymi. Czynniki białkowe wiążące się *TATA box* bierze również udział w transkrypcji genów rybosomalnego RNA przy udziale polimerazy RNA I. Liczne geny eukariotyczne są transkrybowane przy udziale polimerazy RNA III. Niektóre z tych genów (tRNA i 5S RNA) mają wewnątrzgenowy rejon kontrolny, inne natomiast zawierają elementy regulatorowe podobne do tych, jakie znajdowano w promotorach genów transkrybowanych przy udziale polimerazy RNA II. W transkrypcji genów przy udziale polimerazy RNA III ważną rolę odgrywają czynniki: TF III B, TF III C, TF III A, jak również może brać w niej udział czynnik TF II D. Większość czynników transkrypcyjnych to białka zawierające specyficzne sekwencje wiążące się z DNA typu: palców cynkowych, zamka leucynowego oraz heliks-skret-heliks.

**Summary.** Initiation of transcription of eucaryotic genes is a complex process which requires 3 types specific RNA pol (pol I, pol II and pol III) as well as a number of other auxiliary transcription factors. Multiple transcription factors specific for each form of nuclear RNA polymerase were identified. Transcription initiation by RNA pol II involves two distinct classes of transcriptions factors: the general factors that are required for transcription of all genes specific for RNA pol II, and sequence specific (or promotor selective) factors, that are required for optimal transcription – the



general transcription factors are thought to form a complex with RNA pol II near the transcription start site by interaction with core promoter elements. The most common core element is TATA box which is typically located 25 to 30 base pairs (bp) upstream of the start site or initiator element in many, but not all RNA pol II promoters. Interaction of general factors with a promoter lead to the formation of a complex capable of the basal level transcription in the absence of promoter specific stimulation factors. At least 6 general factors (TF II A,B,D,E,F,I,H) are required for an accurate in vivo transcription in mammalian system. The TATA binding proteins (TBP) and TF II D play a central role in it. These factors, along with RNA pol II, are associated with the promoter in a specific order to form a stable preinitiation complex (PIC). The TATA binding protein is also part of a factor that is critical for transcription of the ribosomal RNA genes by RNA pol I. Many eucaryotic genes are transcribed by RNA Pol III. The tRNA, and 5S RNA genes have intragenic control region. However transcription of some classes of these genes are controlled by regulatory elements that lie upstream of the structural gene and that are similar to those found in class II gene transcribed by RNA pol II. Factors TF IIIB, TF IIIC, and TF IIIA play the central role in transcription by RNA pol III. The factor TF IID is also involved in transcription by RNA polymerase II. Most of transcription factors are sequence specific DNA binding protein with the special binding motifs: termend the "zinc finger", leucine zipper, or helix turn helix.

## I. WPROWADZENIE

Procesy różnicowania warunkujące rozwój organizmów eukariotycznych są kontrolowane w dużym stopniu na poziomie transkrypcji. Od jej przebiegu często uzależnione są liczne zmiany fenotypowe, zachodzące w komórkach lub organizmach. Nic też dziwnego, że rozszyfrowaniu molekularnych mechanizmów rządzących tymi zjawiskami poświęcono już wiele prac. Szczególne zainteresowanie budzą odgrywające istotną rolę w regulacji transkrypcji liczne czynniki białkowe, których identyfikacją, strukturą i funkcją zajmuje się wiele pracowni na świecie. W komórkach prokariotycznych, jak wiadomo, wszystkie geny są transkrybowane przy udziale jednej polimerazy RNA. W przeciwieństwie do tego transkrypcja genów eukariotycznych jest bardziej skomplikowana i uczestniczą w niej trzy polimerazy RNA oraz polimerazy organellowe transkrybujące geny kodowane przez organellowe DNA. Jądrowe polimerazy RNA są odpowiedzialne selektywnie za transkrypcję: genów rRNA – polimeraza RNA I, mRNA – polimeraza RNA II oraz tRNA, małych jądrowych cząsteczek RNA i niektórych wirusów – polimeraza RNA III. Chociaż polimerazy te są zbudowane z pojedynostek o sekwencjach bardzo podobnych, to każda z nich zawiera własne podjednostki, tzw. unikatowe, wykazujące różną wrażliwość na inhibitory i wchodzi w reakcję z innymi składnikami transkrypcji, jak również czynnikami aktywującymi transkrypcję.

Eukariotyczne polimerazy RNA oddziałują z promotorami, które różnią się znacznie sekwencją nukleotydową oraz zawierają sekwencje specyficzne, szczególnie ważne dla funkcji każdego z nich [2–9, 18–20, 44, 49]. Różne promotory wymagają także odmiennych promotorowo, specyficznych czynników białkowych [5, 32, 63, 65]. Wykazano jednak, że niektóre z czynników mimo dużej specyficzności promotorowej mogą brać udział w rozpoznawaniu różnych promotorów, jak na przykład czynnik TF II D [10,36,69,73].

Istotną różnicą pomiędzy prokariotyczną polimerazą RNA a polimerazami eukariotycznymi jest sposób ich oddziaływania z promotorem. Polimeraza prokariotyczna może wiązać się wprost z sekwencją promotorową, natomiast polimerazy eukariotyczne wymagają dodatkowych, promotorowo specyficznych czynników białkowych. Czynniki te tworzą przypuszczalnie odpowiednie struktury przestrzenne, ułatwiające łączenie się określonej, jądrowej polimerazy RNA do odpowiedniego promotora. Możemy podzielić je na dwie grupy. Do grupy pierwszej należą czynniki podstawowe, zwane także generalnymi (ang. *general transcription factors* – GTFs), oddziałujące ze stałymi strukturami promotora stanowiącymi jego rdzeń,

takimi jak np. element zwany *TATA box* zlokalizowany w pozycji ok. -30 promotora od miejsca startu transkrypcji i element inicjatorowy, zwany INR w miejscu +1 transkrypcji. Czynniki te zwane są odpowiednio TF I dla polimerazy RNA I, TF II dla polimerazy RNA II i TF III dla polimerazy RNA III. Do grupy drugiej należą czynniki, które są ich aktywatorami. Poszczególne czynniki wiążą się z różnymi elementami promotora zlokalizowanymi w bliższej lub dalszej odległości od miejsca startu transkrypcji. Zarówno polimeraza RNA I, jak i II wiążą się w rejonach promotora przylegających do końca 5' genu, natomiast polimeraza RNA III może tworzyć również kompleksy białkowe z sekwencjami regulatorowymi DNA zlokalizowanymi wewnątrz genu

Większość promotorów dla polimerazy RNA II zawiera element *TATA box*, z którym wiąże się białko TBP (ang. *TATA binding protein*) stanowiące część czynnika TFII D [20]. Białko to jest niezbędne do inicjacji transkrypcji przy udziale wszystkich trzech klas polimeraz eukariotycznych bez względu na to, czy w rejonie promotora znajduje się sekwencja *TATA box*, czy też nie. TBP jest podstawowym czynnikiem transkrypcyjnym wiążącym się bezpośrednio z sekwencją promotora, jak również oddziałującym z różnymi białkami uczestniczącymi w transkrypcji.

W prezentowanej pracy opisane jest tworzenie kompleksu preinicjującego transkrypcję (PIC) dla trzech jądrowych polimeraz eukariotycznych. Tworzenie się tego kompleksu jest jednym z etapów regulacji inicjacji transkrypcji [60].

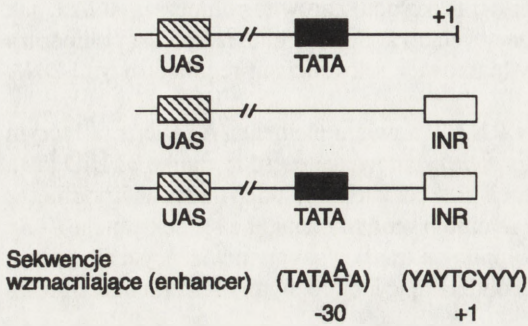
## II. TWORZENIE KOMPLEKSU PREINICJUJĄCEGO TRANSKRYPCJĘ (PIC) PRZY UDZIALE POLIMERAZY RNA II

Poprawne składanie kompleksu preinicjującego umożliwiające rozpoczęcie transkrypcji przy udziale polimerazy RNA II wymaga współdziałania szeregu czynników oddziałujących z rejonem promotorowym. Sekwencje promotorowe biorące udział w wiązaniu tych czynników są stosunkowo dobrze poznane. W strukturze promotora dla pol II możemy wyróżnić kilka miejsc wiążących specyficzne czynniki białkowe, które wymagane są dla poprawnej inicjacji transkrypcji większości, a może nawet wszystkich genów transkrybowanych przez polimerazę RNA II. Jak już wspomniano, czynniki te zwane są podstawowymi i utrzymują zasadniczy poziom inicjacji transkrypcji w nieobecności czynników dodatkowych wiążących się z sekwencjami regulatorowymi promotora (znajdującymi się w pobliżu genu lub w dużej od niego odległości dochodzącej do przeszło 50 000 par zasad od miejsca startu).

Większość promotorów dla polimerazy RNA II zawiera sekwencję *TATA* (tzw. *TATA box*) w rejonie ok. -30 nukleotydów od miejsca startu transkrypcji oraz mniej znany element inicjatorowy INR (ang. *initiator elements at the start site*) w miejscu startu, jak również sekwencje UAS (ang. *upstream activating sequence elements*) zlokalizowane w różnej odległości od genu, pełniące rolę sekwencji zwiększających aktywność transkrypcji (tzw. sekwencje wzmacniające lub enhancerowe) [56, 57]. Schematy najczęściej spotykanych promotorów genów transkrybowanych przy udziale polimerazy RNA II są przedstawione na rysunku 1. Generalnie możemy podzielić je na trzy grupy: promotory zawierające wszystkie wymienione elementy promotorowe oraz takie, które są pozbawione *TATA box* lub elementu INR. W komórkach eukariotycznych co najmniej 6 czynników podstawowych jest niezbędnych do rozpoczęcia inicjacji transkrypcji. Czynniki te są dołączane do promotora w określonym



porządku tworząc stabilny kompleks preinicjujący (PIC). Jako pierwszy wiąże się z sekwencją *TATA box* TF II D, co umożliwia kolejne dołączanie do promotora następnych czynników transkrypcyjnych oraz polimerazy RNA II [38,39,53,55 57].



Rys. 1. Schemat organizacji najczęściej spotykanych promotorów eukariotycznych dla polimerazy RNA II [53]; na rysunku zaznaczono specyficzne sekwencje promotorowe: *TATA box*, element inicjatorowy INR oraz element UAS mogący zmieniać aktywność pozostałych elementów promotorowych

Znane są sekwencje aminokwasowe czynnika TF II D z komórek człowieka, *Drosophila*, *Arabidopsis* oraz drożdży (*Saccharomyces pombe* i *S. cerevisiae*) określone na podstawie analizy sekwencji ich genów [14,23]. Czynniki te mają bardzo zachowawczą sekwencję aminokwasową na odcinku obejmującym 180 reszt w rejonie C końca cząsteczki (rys. 2). Homologia sekwencji wynosi przeszło 80%. W obrębie tego fragmentu cząsteczki znajdują się odcinki: krótki odcinek powtórzony, odcinek o sekwencji homologicznej do bakteryjnej podjednostki sigma oraz rejon bogaty w aminokwasy zasadowe (rys. 2). Taka struktura czynnika umożliwia mu zarówno wiązanie się z promotorową sekwencją DNA, jak również oddziaływanie z szeregiem aktywatorów.

W przeciwieństwie do końca C koniec N cząsteczki TF II D jest bardzo zróżnicowany i niejednorodny i tak np. u *Drosophila* jest zbudowany ze 173 aminokwasów, a u *Arabidopsis* z 19. Sekwencja aminokwasowa czynnika TF II D pochodzącego z drożdży różni się tym od sekwencji u wspomnianych organizmów, że zawiera dodatkowy odcinek zbudowany z 34 reszt glutaminy, otoczony fragmentami bogatymi w serynę i treoninę.

W genomie *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano 2 geny kodujące 2 różne TF II D. Białka te mają 93,5% homologii sekwencji aminokwasowej i mogą tworzyć dimery w wyniku oddziaływania ich amfipatycznych heliksów [24,28]. Dimery takie inaczej wiążą się z DNA jak ich monomery, co jak się przypuszcza, może być jednym z możliwych sposobów mechanizmu regulacji transkrypcji [37,38]. Te dwa czynniki wykazują przypuszczalnie także inne powinowactwo i oddziaływanie z promotorem.

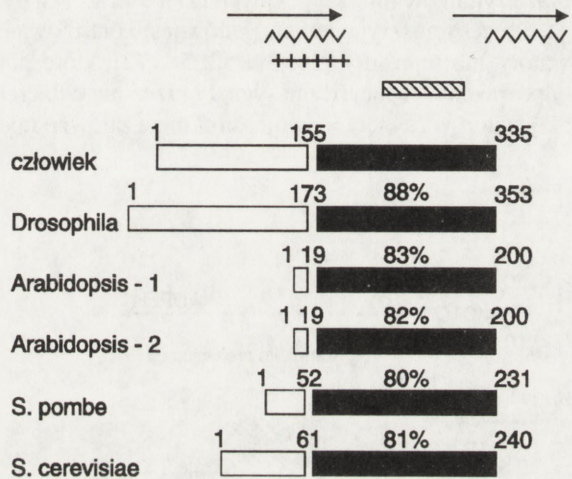
Z czynnikiem TF II D łączy się szereg innych białek bliżej nieokreślonych, generalnie zwanych TBP i TAF (ang. *TATA binding protein* – TBP i *transcription associated factors* – TAFs) [4,16,45,51,70]. W komórkach *Drosophila* zidentyfikowano 6 takich czynników o masie 150, 110, 80, 60, 40 i 31 kDa, natomiast 10 o masie od 10 do 200 kDa w komórkach ssaków [48]. Rola ich nie jest poznana. Przypuszcza się, że mogą się one przyłączać do DNA na odcinku od –10 do –45 po jednej stronie heliksy tworząc specyficzne płaszczyzny ułatwiające wiązanie polimerazy i innych czynników transkrypcyjnych po drugiej jego stronie [54]. Odpowiedzialne są one także za rozpoznanie określonej sekwencji promotorowej przez polimerazę.

Wykazano, że wiązanie TF II D z promotorem ułatwia również czynnik TF II A, natomiast TF II B tworzy pomost pomiędzy TF II D i pol RNA II. Reakcje te moduluje TF II E. Właściwości tych czynników są zebrane w tabeli 1.

Składanie zatem kompleksu preinicjującego odbywa się w wyniku szeregu interakcji prowadzących do określonego ułożenia czynników względem polimerazy (rys. 3). Takie oddziaływania licznych czynników umożliwia tworzenie kompleksów pośrednich różniących się kinetyką asocjowania z matrycą DNA lub inhibitorem transkrypcji. Niewiele wiadomo o innych białkach biorących udział na poszczególnych etapach tworzenia się kompleksu preinicjującego. Na pewno proces ten wymaga hydrolizy ATP, co sugeruje udział w nim ATP-azy lub kinazy. Aktywność ATP-azy i helikazy przypisywano odpowiednio czynnikom TF II E i TF II F. Ostatnio stwierdzono, że czynnik TF II H z komórek człowieka ma aktywność kinazową zdolną do fosforylacji dużej podjednostki polimerazy RNA II [37]. Nie wiadomo także, który z czynników jest zasocjowany z polimerazą, a który odryso-cjowuje podczas jej przesuwania się wzdłuż matrycy. Stwierdzono, że większość składników peptydowych czynników podstawowych, takich jak: TF II B, TF II D, TF II E oraz mała podjednostka czynnika TF II F wyizolowanego z komórek ludzkich wykazują niewielką homologię sekwencji do bakteryjnej podjednostki sigma, która bierze udział w specyficznym rozpoznawaniu promotora bakteryjnego. Sugeruje to ich powiązania ewolucyjne oraz wskazuje na możliwość zastąpienia funkcji bakteryjnej podjednostki sigma w układzie eukariotycznym przez kilka białek [77].

Wiązanie czynnika TF II D z elementem promotorowym TATA odgrywa kluczową rolę w składaniu kompleksu preinicjującego i jest najlepiej poznane. Promotory licznych genów nie mają jednak tego elementu. W promotorach takich element inicjatorowy INR może odgrywać

istotną rolę w wiązaniu polimerazy z promotorem, jak również określać miejsce inicjacji transkrypcji [54,66,78]. Wśród różnych promotorów identyfikowano czynnik, który wiąże się specyficznie z elementem INR. Znajdowano go zarówno w promotorze adenowirusa Ad M1 zawierającym sekwencję TATA, jak również w promotorze jej pozbawionym, np. w terminalnej transferazie deoksynukleotydylowej. Czynnikiem ten jest określany jako TF II-I i można go zastąpić TF II A w transkrypcji adenowirusa Ad M1, w obecności czynników podstawowych. Wskazuje to na możliwość alternatywnego sposobu tworzenia PIC. W obecności TF II D mogą tworzyć się kompleksy: TF II D : TF II-I, TF II D : TF II A :TF II-I oraz TF II D : TF II A i TF II D : TF II B : TF II A, tempo tworzenia tych kompleksów i ich stabilność jest różna. Czynnikiem TF II-I może odgrywać dominującą rolę w tworzeniu PIC. Oddziałuje on z elementem INR promotora, jak również *TATA box*, stabilizując wiązanie TF II D. TF II-I przedstawia



Rys.2. Schemat struktury I-rzędowej czynnika TF II D z drożdży, *Arabidopsis* i człowieka [23]; na rysunku zaznaczono rejony C końca cząsteczek różnych czynników wykazujące wysoki stopień homologii sekwencji; oznaczono: √√√√√ – fragmenty homologiczne do białka Myc, +++++ – fragmenty zawierające aminokwasy zasadowe, → – odcinki powtórzone, ⇔ – fragmenty homologiczne do bakteryjnej jednostki sigma; czynniki te zbudowane są z 200–335 aminokwasów

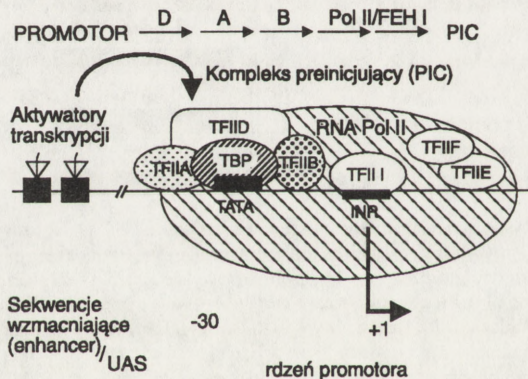


nowy typ czynnika transkrypcyjnego współdziałającego z innymi czynnikami transkrypcyjnymi oraz oddziałującego z różnymi elementami promotorowymi ułatwiając wzajemny kontakt poszczególnych składników w kompleksie PIC.

TF II-I ma masę cząsteczkową 120 kDa i strukturę wykazującą homologię do struktury białek typu heliks-pętla-heliks [54]. Innym białkiem wiążącym się z INR jest CBF (ang. *cap binding factor*). Przypuszcza się, że białko to o masie 90 kDa może być produktem powstałym w wyniku proteolizy TF II-I [13].

Mechanizm inicjacji transkrypcji w promotorach pozbawionych elementu TATA jest słabo poznany. Na pewno rolę dominującą odgrywa w nim element INR, z którym wiążą się odpowiednie białka, co w rezultacie ułatwia dołączenie do tego kompleksu białek TBP, TBF oraz czynników transkrypcyjnych [71].

Proces transkrypcji wielu genów jest kontrolowany przez komórkowo specyficzne aktywatory lub represory [20, 39, 52, 58, 72], które pojawiają się najczęściej w komórce w odpowiedzi na specyficzne sygnały przez nią odbierane [20, 39, 72]. Większość poznanych aktywatorów zawiera w swojej strukturze zarówno miejsca wiązania się z DNA, tzw. domeny



Rys.3. Struktura kompleksu preinicjującego transkrypcję przy udziale RNA polimerazy II [53]; w górze rysunku oznaczono kolejność dołączania poszczególnych czynników do promotora

Wiążąca, jak również domeny aktywująca, która wprost lub jak się przypuszcza za pośrednictwem specyficznych koaktywatorów oddziałuje z kompleksem inicjującym transkrypcję. Znane aktywatory mają różne domeny aktywujące. Najczęściej spotykane to: aktywatory zawierające domenę kwaśną, jak np. w białku GAL 4 drożdży, bogatą w prolinę (jak CTF) oraz glutaminę (białko Spl) [2, 25, 27, 32, 34, 35, 38–45, 47–49, 61–63, 67, 68, 72, 74]. Analiza struktury i funkcji ludzkiego czynnika transkrypcyjnego Spl wykazała, że białko to oprócz domeny bogatej w glutaminę zawiera także inne domeny, np. o charakterze słabo zasadowym czy strukturze palców cynkowych zaangażowanych w wiązanie z DNA [44, 50, 61].

Występowanie różnych domen sugeruje możliwość oddziaływania z różnymi rejonami promotora, jak również współdziałanie z szeregiem dodatkowych czynników kompleksu transkrypcyjnego [64]. Jednym z aktywatorów transkrypcji są białka wirusowe [8, 22, 31, 33, 42]. Białko adenowirusa E1A może aktywować transkrypcję w licznych promotorach wykorzystując różny mechanizm, np. przez aktywację czynników podstawowych, jak również oddysocjując czynniki transkrypcyjne z nieaktywnych transkrypcyjnie heterodimerycznych kompleksów. In vitro E1A wiąże się wprost do TF II D, jak również do białka

związanego z sekwencją oktamerową promotora, pełniąc rolę czynnika łączącego odległe miejsca promotorowe [31, 66].

Z czynnikami TF II D i TF II B może oddziaływać także białko wirusa Herpes V16 zawierające kwaśną domenę aktywującą. Oba czynniki mają w strukturze rejony helikalne mogące oddziaływać z domeną kwaśną innych czynników. W aktywację transkrypcji włącza się także szereg białek, których właściwości nie są bliżej poznane. Nie wiadomo również, czy wszystkie białka wchodzące w skład tych kompleksów są istotne dla aktywacji procesu transkrypcji, czy poszczególne składniki są specyficzne dla różnych typów aktywatora oraz nie jest znany sposób ich funkcjonowania. Jedną z możliwości jest pełnienie przez nie roli pośredników w przenoszeniu sygnałów z aktywatora do innych składników kompleksu transkrypcyjnego. Mogą także wpływać na wiązanie TF II A do promotora.

TABELA 1. Charakterystyka podstawowych czynników transkrypcyjnych biorących udział w transkrypcji przy udziale polimerazy RNA II [20]

Czynnik	Składniki polipeptydowe czynnika	Funkcje
TF II A	drożdży: zbudowany z 2 podjednostek: 32 i 13,5 kDa; ludzki zawierający trzy podjednostki: 34,19 i 14 kDa;	stabilizuje wiązanie TBP z <i>TATA box</i> , nie wiąże się z wszystkimi promotorami
TF II B	drożdży – 38 kDa, ludzki – 33 kDa	wiązanie pol RNA II z promotorem, udział w selekcji miejsca startu
TF II D	wieloskładnikowy kompleks białek 100 kDa zawierający czynniki TAF oraz białka TBP	TBP wiąże się z <i>TATA box</i>
TF II E	ludzki: zbudowany z 4 podjednostek – dwóch podjednostek o masie 57 kDa i dwóch o masie 34 kDa każda	czynniki asocjujące z RNA polimerazą (zwane RAP)
TF II F	ludzki: zbudowany z 4 podjednostek – dwóch podjednostek o masie 74 kDa i dwóch o masie 30 kDa każda	integracja z RNA polimerazą
TF II I	ludzki: 120 kDa	wiąże się z elementem INR, ułatwia wiązanie białek TBP

Istotną rolę w oddziaływaniu z aktywatorami transkrypcji odgrywa N koniec czynnika TF II D [23]. Delecja N końcowej domeny TF II D człowieka eliminuje aktywację transkrypcji w odpowiedzi na kwaśny aktywator Spl. Podobnie drożdżowy TF II D może brać udział tylko w podstawowej, lecz nie GAL aktywowanej transkrypcji w układzie HeLa. Ostatnio wykazano jednak, że N koniec czynnika TF II D z komórki człowieka oraz drożdży wystarczają do utrzymania tempa transkrypcji podstawowej, jak również aktywowanej przy udziale kwaśnego aktywatora. Taka funkcjonalna zdolność do wymiany obu czynników przeczy wcześniej opisywanej specyficzności gatunkowej [26]. Stwierdzono również, że inne białka izolowane z komórek człowieka i drożdży, które pośredniczą w oddziaływaniach pomiędzy TF II D i kwaśnymi aktywatorami mają w swojej strukturze sekwencje konserwatywne [26].

Białka aktywujące oraz czynniki podstawowe mogą stymulować proces transkrypcji, jak również go limitować czy wręcz hamować. Transkrypcja tym samym może być kontrolowana przez pozytywny lub negatywny mechanizm regulatorowy, a współdziałanie obu jest często odpowiedzialne za prawidłowy przebieg tego procesu [52, 58]. Jednym z czynników ograniczających transkrypcję są histony. Połączenie DNA z histonami, jak również rozmieszczenie nukleosomów decyduje o odpowiedniej strukturze przestrzennej chromatyny umożliwiającej



oddziaływanie DNA z czynnikami transkrypcyjnymi [1, 11, 21]. Ścisła asocjacja elementów regulatorowych w DNA promotora z histonami utrudnia ich rozpoznanie przez odpowiednie czynniki transkrypcyjne. Z drugiej strony stwierdzono, że szereg receptorów dla glukokortykoidów może aktywować transkrypcję przez bezpośrednie oddziaływanie z chromatyną. Receptory te są białkami zawierającymi w domenie wiązania DNA dwa moduły o strukturze palców cynkowych. Jeden z palców cynkowych wiąże się z krótkim odcinkiem DNA (zawierającym 6 par zasad) zlokalizowanym w dużej bruzdzie cząsteczki DNA, drugi natomiast jest zaangażowany w oddziaływanie z inną cząsteczką białka. Receptory hormonów glukokortykoidowych wiążą się z DNA jako dimery. Wiązanie to powoduje zmianę struktury DNA umożliwiającą oddziaływanie czynników transkrypcyjnych z elementem *TATA box* odpowiedniego promotora [46].

Stwierdzono także, że czynniki transkrypcyjne mogą wiązać się z DNA pomiędzy dwoma nukleosomami (jak np. czynnik PHO5 drożdży biorący udział w regulacji transkrypcji genu kwaśnej fosfatazy). Prowadzi to do zmiany pozycji nukleosomu i zahamowania procesu transkrypcji [21].

Aktywacja transkrypcji może być także ograniczona przez występowanie niejednoznacznych miejsc wiązania dla poszczególnych czynników, kompetycyjne ich działanie pomiędzy poszczególnymi genami, czy ograniczoną ich liczbę w komórce [17]. W komórkach człowieka zidentyfikowano czynnik białkowy odgrywający ważną rolę nie tylko w transkrypcji zależnej od aktywatora, lecz także od poziomu w komórce czynników specyficznych promotorowo [54]. Białko to nazywa się USA i pełni inną funkcję niż białka ściśle zasocjowane z TF II D. USA w obecności aktywatorów znacznie zwiększa ich aktywność (nawet 100 x) w stosunku do promotora, natomiast podczas ich nieobecności powoduje represję podstawowej aktywności transkrypcyjnej. Czynnik ten jest zbudowany z dwóch składników, które rozdzielone wywierają przeciwny efekt na tempo transkrypcji podstawowej. Jeden ze składników, zwany negatywnym Nc1, powoduje represję transkrypcji podstawowej przez kompetycyjne wiązanie się do miejsca czynnika TF II A w DNA kompleksu PIC. Pozytywny składnik Pc1 razem z aktywatorem może znieść działanie Nc1 i spowodować wzrost aktywności transkrypcyjnej. Mechanizm tego działania nie jest jednak poznany. Na pewno czynnik ten może stabilizować lub destabilizować składanie kompleksu PIC, chociaż nie można wykluczyć, że jest on koaktywatorem ułatwiającym oddziaływanie aktywatora z podstawowym kompleksem transkrypcyjnym. Mechanizm oddziaływania białko : białko w układzie koaktywator : aktywator nie jest poznany, nie wiadomo również, czy dla każdej inicjacji transkrypcji jest to konieczne oraz jakie są funkcjonalne różnice pomiędzy aktywnym PIC wytworzonym w obecności i nieobecności USA [40].

Znane są dwa modele opisujące mechanizm działania koaktywatorów oraz ich rolę w składaniu kompleksu preinicjującego transkrypcję [16].

Model I zakłada, że koaktywator stanowi pomost łączący aktywator z pozostałymi składnikami kompleksu transkrypcyjnego (rys. 4).

Drugi natomiast z proponowanych modeli uważa, że koaktywator nie oddziałuje wprost z aktywatorem, lecz powoduje zmiany konformacyjne w podstawowym kompleksie transkrypcyjnym, które wpływają na pozostały układ transkrypcyjny. Białkami mogącymi oddziaływać wprost z czynnikami kompleksu PIC są białka wirusowe, takie jak VP16 i E1A. Uważa się, że białka te mogą być swoiście wyspecjalizowanymi koaktywatorami. Warto zaznaczyć, że nie są znane czynniki komórkowe, które oddziaływałyby wprost z jakimś czynnikiem podstawowym.

### III. TWORZENIE KOMPLEKSU PREINICJUJĄCEGO TRANSKRYPCJĘ PRZY UDZIALE POLIMERAZY RNA I

Tworzenie kompleksu preinicjującego transkrypcję przy udziale polimerazy RNA I jest stosunkowo słabo poznane [16, 30, 75, 76]. Kompleks TBP-TAF I różny od TF II D kompleksu dla polimerazy II identyfikowano jako integralny składnik kompleksu transkrypcyjnego dla pol RNA I [56]. Trzy różne czynniki TAF o masie: 110, 63 i 48 kDa są jego składnikami.

Wykazano, że transkrypcja genów rRNA człowieka wymaga obecności promotorowo selektywnego białka SL1 (ang. *selectivity factor*) oraz białka stymulującego UBF (ang. *upstream binding factor*). SL1 bierze udział w rozpoznawaniu promotora i jest jednym z czynników odróżniających promotor genu rRNA człowieka i myszy. Stosując specyficzne przeciwciała dla białka TBP wykazano, że SL1 składa się z czynnika TBP i trzech czynników TAF [8]. Czynniki TBP ma aktywność SL1 tylko w kompleksie TBP:TAF. Czynniki TAF mają również wpływ na wiązanie czynnika TBP ze specyficzną sekwencją promotorową. Dlatego uważa się czynniki TAF mogą pełnić rolę koaktywatorów oddziałujących ze specyficzną sekwencją promotorową (SSE), czynnikami transkrypcyjnymi, białkiem stymulującym transkrypcję (UBF) oraz polimerazą RNA I.

Schemat kompleksu PIC dla polimerazy RNA I jest przedstawiony na rysunku 5. Szereg promotorów genów transkrybowanych przy udziale polimerazy RNA I w rejonie przylegającym do końca 5' genu na odcinku od -10 do -150 par zasad zawiera rejony bogate w sekwencje G-C, brak jest natomiast elementu *TATA box*.

### IV. TWORZENIE KOMPLEKSU PREINICJUJĄCEGO TRANSKRYPCJĘ PRZY UDZIALE POLIMERAZY RNA III

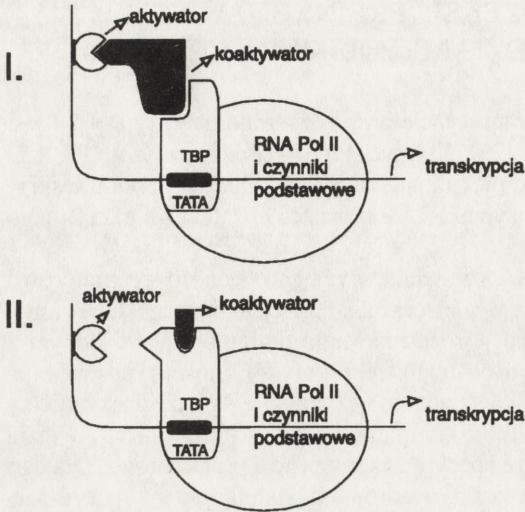
Polimeraza RNA III bierze udział w transkrypcji określonej grupy genów małych jądrowych RNA, 5S RNA, tRNA oraz RNA niektórych wirusów.

Obserwuje się ogromną różnorodność organizacji promotorów genów transkrybowanych przez polimerazę RNA III. Występują w nich zarówno elementy promotorowe zewnątrzgenowe, jak również wewnątrzgenowe [12, 15].

Promotory te generalnie możemy podzielić na cztery grupy: zewnątrzgenowe, wewnątrzgenowe, mieszane oraz tzw. minimalne [9].

Promotor wewnątrzgenowy znajdowano głównie w genach kodujących tRNA. Geny tRNA są pod kontrolą wewnątrzgenowych elementów promotorowych zwanych *box A* i *box B*. (rys. 6A). Sekwencja *box A* może znajdować się w różnej odległości od sekwencji *box B*. Sekwencje przylegające do końca 5' genu mogą wpływać na tempo transkrypcji zarówno w sposób negatywny, jak i pozytywny. Promotor zewnątrzgenowy ma wszystkie elementy promotorowe zlokalizowane w rejonie przylegającym do końca 5' genu, np. gen U6 RNA człowieka (rys. 6B). W rejonie 5' genów zidentyfikowano trzy ważne dla transkrypcji elementy promotorowe: *TATA box* umieszczony w pozycji podobnej, jak w genach kodujących mRNA (o sekwencji CTTATAAG w rejonie -31 -24), element PSE (ang. *proximal*





Rys. 4. Dwa modele przedstawiające interakcję czynników białkowych ze składnikami kompleksu preinicjującego dla polimerazy RNA II [16]: model I zakłada, że koaktywator stanowi pomost pomiędzy aktywatorem a pozostałymi składnikami kompleksu; model II – koaktywator nie oddziałuje wprost z aktywatorem, lecz z innymi składnikami kompleksu PIC powodując zmiany konformacyjne, które są przenoszone przez cały układ transkrypcyjny

promotora rozpoznawania przez polimerazę RNA III oraz polimerazę RNA II. Wykazano również, że dla poprawności odczytu ważna jest odległość pomiędzy *TATA box* a innymi elementami promotorowymi.

Stosunkowo dobrze jest poznane tworzenie kompleksu transkrypcyjnego dla genu 5S RNA. Rozpoczyna się ono od wiązania z rejonem wewnątrzgenowym czynnika TF III A o masie ok. 38 kDa i strukturze palców cynkowych (rys.7). Czynniki te wiążą się tzw. sekwencją *box C*. Powstały kompleks jest stabilizowany przez wiązanie innych białek, jakimi są: TF III C i TF III C1.

Tworzenie kompleksu preinicjującego przebiega w określonym porządku i jest podobne jak dla polimerazy RNA II. Klonowanie cDNA czynników transkrypcyjnych drożdży i człowieka w celu poznania ich struktury wykazało, że białka te mają bardzo zachowawczą strukturę I-rzędową.

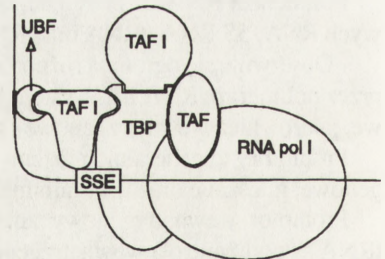
Transkrypcja genów tRNA jest dobrze poznana u drożdży. Pierwszy etap składania kompleksu preinicjującego polega na wiązaniu czynnika TF III C z wewnątrzgenowym elementem promotorowym genu (rys. 6A.). W genach tRNA drożdży czynniki te wiążą się z

*sequence element*), w pozycji ok. -60 oraz DSE (ang. *distal sequence element*) w pozycji ok. -250 od genu.

Gen tRNA selenocysteinowego ma promotor mieszany. Zawiera on zarówno zewnątrzgenowe, jak i wewnątrzgenowe elementy promotorowe. W rejonie 5' genu jest zlokalizowany element TATA, PSE i nie poznany bliżej element DSE. Wymienione elementy promotorowe działają synergistycznie zwiększając wydajność transkrypcji.

Odrębną klasę promotorów stanowią promotory minimalne. Do transkrypcji genów zawierających tego typu promotor jest wymagany krótki odcinek od 40 do 150 par zasad zlokalizowany w rejonie 5' genu. Charakterystycznym elementem promotorowym jest sekwencja podobna do TATA w rejonie -25 par zasad, przypuszczalnie zawiera on również inne jeszcze nie poznane elementy regulatorowe.

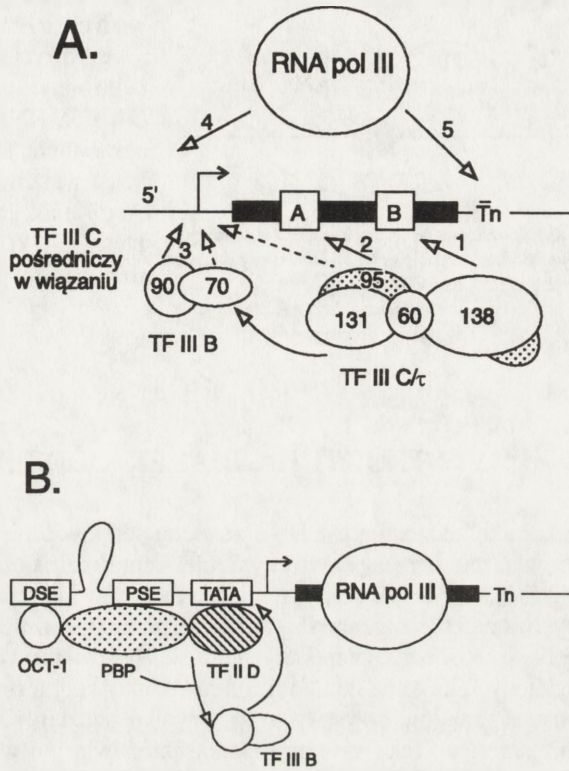
Stwierdzono, że zmiana pozycji różnych elementów promotorowych może prowadzić do zmiany specyficzności



Rys. 5. Schemat kompleksu preinicjującego transkrypcję przy udziale polimerazy RNA I [16]: na rysunku zaznaczono czynniki uczestniczące w tworzeniu kompleksu, specyficzny element sekwencyjny (SSE) o sekwencji charakterystycznej dla promotora określonego genu oraz czynniki UBF stymulujący transkrypcję

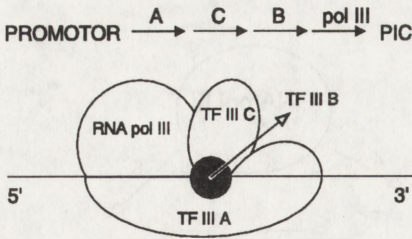
*box A* i *box B*. Jest to duże białko o masie ok. 600 kDa, zbudowane z wielu podjednostek z dwiema domenami wiążącymi się z DNA: domeną A i domeną B po ok. 300 kDa każda, odpowiadają one TF III C 1 i TF III C 2 człowieka. Domena B czynnika TF III C wiąże się najpierw z *box B*, co umożliwia wiązanie domeny A z *box A*. Składnikiem omawianego kompleksu jest także czynnik TF III B. Czynnik ten sam nie wiąże się ze specyficzną sekwencją promotorową, lecz oddziałuje z kompleksem TF III C : DNA lub TF III A : TF III C 5S DNA kompleksem. Wiązanie TF III B z kompleksem jest niezbędne do właściwego umiejscowienia polimerazy RNA III względem promotora. Białko TF III B pełni zatem rolę czynnika inicjacyjnego. W drożdżach i komórkach ludzkich jego masę cząsteczkową oceniano na ok. 60 kDa, chociaż ostatnio wykazano, że w miejscu inicjacji drożdży znajdują się białka o masie 90 i 70 kDa.

Obecność elementu TATA w rejonie promotorowym dla polimerazy RNA III sugerowała, że również w systemie transkrypcyjnym polimerazy RNA III mogą brać udział białka specyficznym oddziałujące z tą sekwencją i tak np. wykazano, że transkrypcja genu U6 RNA wymaga obecności czynnika TF II D [59]. Stwierdzono również, że dodanie białek wiążących się z *TATA box* do układu transkrypcyjnego zawierającego gen U6 RNA zwiększa tempo jego transkrypcji. Przypuszcza się jednak, że inny kompleks białek TBP i TAF bierze udział w transkrypcji przy udziale polimerazy RNA II, jak i polimerazy RNA III. Czynnik TF II D współdziała z białkami i PBP wiążącymi się ze specyficznym elementem promotorowym PSE (ang. *PSE binding proteins*). Stwierdzono, że białka te są niezbędne w transkrypcji *in vitro* genu U6 RNA myszy i człowieka. Aktywność transkrypcyjna zależy także od obecności białek specyficznym wiążących się z elementem promotorowym DSE (rys. 6B). Jednym z takich białek jest czynnik OBTF (ang. *octamer*



Rys. 6. Składanie kompleksu preinicjującego dla polimerazy RNA III [28]: A – gen transkrybowany przy udziale polimerazy RNA III zawierający wewnątrzgenowe elementy promotorowe, strzałkami oznaczono miejsca interakcji poszczególnych czynników z promotorem oraz kolejność ich dołączania do kompleksu preinicjującego, na rysunku podane są masy cząsteczkowe w kDa niektórych z polipeptydów wchodzących w skład kompleksu preinicjującego, Tn – miejsce terminacji; B – gen zawierający zewnętrzne elementy promotorowe: DSE, PSE i TATA. Oct-1, PBP i TF II D – czynniki oddziałujące z poszczególnymi elementami tego promotora, strzałkami oznaczono możliwość wzajemnego oddziaływania poszczególnych składników kompleksu





Rys.7. Schemat struktury kompleksu preinicjującego transkrypcję genu 5S RNA przy udziale polimerazy RNA III, w górze rysunku zaznaczono kolejność dołączania poszczególnych czynników do promotora

*binding transcription factor*). Białko to znajdowano też w układzie transkrypcyjnym genów transkrybowanych przy udziale polimerazy RNA III.

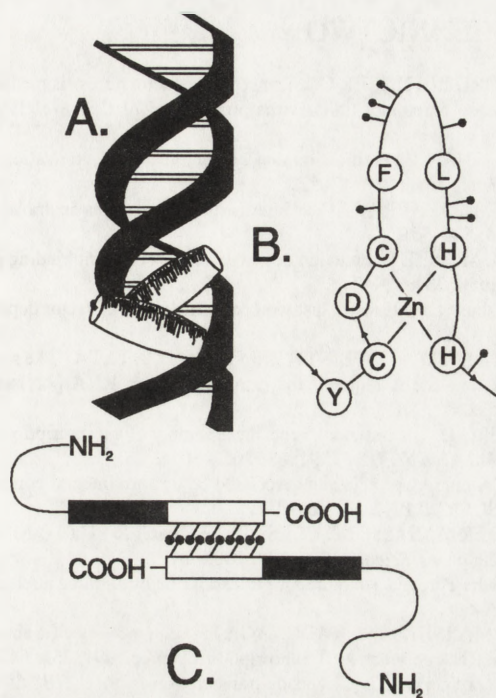
Bardzo ciekawym czynnikiem transkrypcyjnym izolowanym z układu transkrypcyjnego genów tRNA i 5S RNA jest czynnik TF III R odporny na ogrzewanie, detergenty, proteazę, DN-azę, natomiast wrażliwy na alkalia i RN-azę A. Wykazano, że czynnik ten zawiera w swoim składzie RNA o masie 54 kDa mogące specyficznie aktywować transkrypcję [67].

## V. STRUKTURA BIAŁEK ODDZIAŁUJĄCYCH Z DNA

Białka oddziałujące z DNA zawierają odpowiednie moduły strukturalne, umożliwiające im wiązanie się ze specyficznym miejscem w cząsteczce DNA. Najlepiej poznane są białka wiążące się z DNA, pełniące rolę aktywatorów lub represorów transkrypcji genów bakteryjnych. Analiza rentgenowska wykazała, że modułem wiążącym się z DNA jest struktura typu heliks-skręt-heliks, charakteryzująca się ustawieniem dwóch heliksów pod kątem  $90^\circ$ , przedzielonych kilkoma aminokwasami. W aktywnej formie białka te występują najczęściej w postaci dimerów powstałych w wyniku oddziaływania dwóch heliksów odpowiednich monomerów. Taka struktura białka umożliwia mu wiązanie się z dużą bruzdą DNA nie powodując istotnych zmian w jego strukturze przestrzennej (rys. 8A)

Białka zawierające w swojej strukturze moduł palców cynkowych są drugim typem struktury, znajdowanym wśród białek wiążących się z DNA. Strukturę taką ma np. TF III A (rys. 8B). Zawierają one powtarzający się moduł bogaty w cysteinę i histydynę zdolne do wiązania jonów cynku. Jon cynku jest wiązany przez dwie reszty cysteiny i dwie reszty histydyny. Czasami reszty histydyny mogą być zastąpione resztami cysteiny. Pojedyncze rejony zdolne do chelatowania jonów cynku są oddzielone przez ok. 12 różnych aminokwasów. W wyniku wiązania jonów cynku przez 4 aminokwasy tworzą się charakterystyczne pętle zdolne do wiązania się z dużą bruzdą w cząsteczce DNA.

Trzecią grupą białek wiążących się z DNA są białka zawierające w swojej strukturze moduł zamka leucynowego (ang. bZIP). Strukturę taką zidentyfikowano po raz pierwszy w C końcowej sekwencji białka wiążącego się z sekwencją CCAATC (EBP) enhancera [29]. Zamki leucynowe są tworzone w rejonach heliksu zawierającego co najmniej 4 leucyny. Każda z leucyn jest oddzielona od poprzedniej 6 innymi aminokwasami. Strukturę taką można przedstawić:  $\text{Leu-X}_6\text{-Leu-X}_6\text{-Leu-X}_6\text{-Leu-X}_6$  (X oznacza inny aminokwas). W takich miejscach struktury tworzy się heliks zdolny do oddziaływania z heliksem innej cząsteczki białka na wzór zamka błyskawicznego (stąd BZIP). Taki moduł nie oddziałuje wprost z DNA, lecz ułatwia dimeryzację białek wiążących się z DNA. Mutacje w rejonach zawierających moduł wykazały, że białka takie nie mogą tworzyć dimerów, jak również wiązać się z DNA. Liczne



Rys. 8. Elementy strukturalne białek wiążących się z DNA [29,41]: A – struktura typu heliks-skręt-heliks; heliksy umiejscowione są w dużej bruzdzie na powierzchni cząsteczki DNA; B – struktura palców cynkowych z zaznaczonymi resztami aminokwasów: C, H odp. reszty cysteiny i histydyny mające zdolność wiązania jonów cynku, \* – zaznaczono przypuszczalne miejsca wiązania z DNA; C – struktura zamka leucynowego przedstawiająca dwie cząsteczki białka zawierające reszty leucynowe \* – umożliwiające im wzajemne oddziaływanie

białka zawierające moduł zamka leucynowego są produktami onkogenów, np. Myc, Jun, Fos. Fos może tworzyć heterodimer z Jun przez ten moduł, a powstały dimer wiąże się z odpowiednim miejscem promotorowym w strukturze DNA. Wśród białek wiążących się z DNA są również takie, które nie zawierają opisanych modułów strukturalnych, a mogą tworzyć dimery oraz takie, które mają więcej jak jedną powierzchnię dimeryzacji. Powierzchnie te są miejscami oddziaływania z różnymi czynnikami transkrypcyjnymi biorącymi udział w regulacji takich procesów komórkowych, jak: wzrost, proliferacja, przekazywanie sygnałów pomiędzy komórkami, czy różnicowanie i rozwój komórek eukariotycznych. Uważa się, że białka regulatorowe pojawiły się w ewolucji stosunkowo wcześniej i odgrywają ważną rolę w specjalizacji komórek [19, 23].

## VI. UWAGI KOŃCOWE

Proces transkrypcji genów eukariotycznych jest regulowany przez białka wiążące się ze specyficznymi elementami regulatorowymi promo-

tora, jak również przez inne białka z nimi oddziałujące, uczestniczące w formowaniu kompleksu preinicjującego. Czynniki te są zasocjowane z promotorem w specyficznym porządku, tworzą stabilny kompleks preinicjujący. One także decydują o specyficzności rozpoznawania promotora przez odpowiednią polimerazę. Wyjaśnienie mechanizmu regulacji aktywacji tego kompleksu oraz wzajemnego oddziaływania pomiędzy poszczególnymi jego składnikami jest niezbędne dla zrozumienia kontroli tego procesu.

## PODZIĘKOWANIE

Panom: Profesorowi doktorowi habilitowanemu Jerzemu B. Warchołowi i doktorowi Włodzimierzowi M. Stolzmannowi serdecznie dziękuję za krytyczne uwagi do manuskryptu pracy. Lekarzowi medycyny Dariuszowi Iżykiemu dziękuję za pomoc techniczną przy jej pisaniu.



## PIŚMIENNICTWO

- [ 1 ] ARCHER TK, CORDINGLEY MG, WOLFORD RG, HAGER GL. Transcription factor access is mediated by accurately positioned nucleosomes on the mouse mammary tumor virus promoter. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 688–698.
- [2] BRIGGS MR, KADONAGA JT, BELL SP, TIJAN R. Purification and biochemical characterization of the promoter specific transcription factor SP I. *Science* 1986; **234**: 47–52.
- [3] BURATOWSKI S, HAHN S, GUARENTE L, SHARP PA. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 1989; **56**: 549–561.
- [4] BURATOWSKI S, HAHN S, SHARP PA, GUARENTE L. Function of a yeast TATA element binding protein in a mammalian transcription system. *Nature* 1988; **334**: 37–42.
- [5] CELADA A, MAKI R. DNA binding of the mouse class II major histocompatibility CCAAT factor depends on two components. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 3097–3100.
- [6] CARCAMO J, MALDONADO E, AHN M, HA I, KASAI Y, FLINT J, REINBERG D. A TATA – like sequence located downstream of the transcription initiation site is required for expression of an RNA polymerase II transcribed gene. *Genes Dev* 1990; **4**: 1611–1622.
- [7] CARACAMO J, BUCKBINDER L, REINBERG D. The initiator directs the assembly of a transcription factor II D – dependent transcription complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8052–8056.
- [8] COMAI L, TANESE N, TIJAN R. The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor SL1. *Cell* 1992; **68**: 965–976.
- [9] CORDEN J, WASYLYK B, BUCHWALDER A, SASSONE-CORSI P, KEDINGER C, CHAMBON P. Promoter sequence of eukaryotic protein coding genes. *Science* 1980; **209**: 1405–1414.
- [10] CORMACK BP, STRUHL K. The TATA- binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells. *Cell* 1992; **69**: 685–696.
- [11] CROSTON GE, KERRIGAN LA, LIRA LM, MARSHAK DR, KADONAGA JT. Sequence-specific antirepression of histone H1 mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription. *Science* 1991; **251**: 643–649.
- [12] GABRIELSEN OS, SENTENAC A. RNA polymerase III (C) and its transcription factors. *TIBS* 1991; **16**: 412–416.
- [13] GARFINKEL S, THOMPSON JA, JACOB WF, COHEN R, SAFER B. Identification and characterization of adenovirus 2 major late promoter CAP sequence DNA-binding protein. *J Biol Chem* 1990; **265**: 10309–10319.
- [14] GASH A, HOFFMANN A, HORIKOSHI M, ROEDER RG, CHUA NH. *Arabidopsis thaliana* contains two genes for TF II D. *Nature* 1990; **346**: 390–394.
- [15] GEIDUSCHEK EP, TOCCHINI-VALENTINI GP. Transcription by RNA pol. III. *Annu Rev Biochem* 1988; **57**: 873–914.
- [16] GILL G, TIJAN R. Eukaryotic coactivators associated with the TATA box binding protein. *Current Opinion in Genetics and Development* 1992; **2**: 236–242.
- [17] GOODBOURN S. Negative regulation of transcriptional initiation in Eukaryotes. *Biochem Biophys Acta* 1990; **1032**: 53–77.
- [18] GREENBLATT J. Roles of TF II D in transcriptional initiation by RNA polymerase II. *Cell* 1991; **66**: 1067–1070.
- [19] GUARENTE L. Regulatory proteins in yeast. *Ann Rev Genet* 1987; **21**: 425–452.
- [20] HAM J, STEGER G, YANIV M. How do eucaryotic activator proteins stimulate the rate of transcription by RNA polymerase II. *FEBS Letter* 1992; **307**: 81–86.
- [21] HAYES JJ, WOLFFE AP. The interaction of transcription factors with nucleosomal DNA. *BIOEssays* 1992; **14**: 597–609.
- [22] HORIKOSHI M, MAGUIRE K, KRALLI A, MALDONADO E, REINBERG D, WEINMANN R. Direct interaction between adenovirus E1A protein and the TATA box binding transcription factor II D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 5124–5128.
- [23] HOFFMANN A, SINN E, YAMAMOTO T, WANG J, ROY A, HORIKOSHI M, ROEDER RG. Highly conserve core domain and unique N terminus with presumptive regulatory motifs in a human TATA factor (TF II D). *Nature* 1990; **346**: 387–390.
- [24] JONES N. Transcriptional regulation by dimerization two sides to an incestuous relationship. *Cell* 1990; **61**: 9–11.
- [25] JONES KA, KADONAGA J, ROSENFELD PJ, KELLY TJ, TIJAN R. A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* 1987; **48**: 78–89.
- [26] KELLEHER RJ III, FLANAGAN PM, CHASMAN DI, PONTICELLI AS, STRUHL K, KORNBERG RD. Yeast and human TF II D are interchangeable for the response to acidic transcriptional activators in vitro. *Genes Dev* 1992; **6**: 296–303.

- [27] KIMMERLY W, BUCHMAN A, KORNBERG R, RINO J. Role of two DNA binding factors in replication, segregation and transcriptional repression mediated by a yeast silencer. *EMBO J* 1988; **7**: 2241–2253.
- [28] LAMB P, McKNIGHT SL. Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *TIBS* 1991; **16**: 417–422.
- [29] LANDSCHULZ WH, JOHNSON PF, McKNIGHT SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 1988; **240**: 1759–1764.
- [30] LEARNED RM, LEARNED TK, HALTNER MM, TIJAN RT. Human rRNA transcription is modulated by the coordinate binding of two factors to an upstream control element. *Cell* 1986; **45**: 847–857.
- [31] LEE WS, KOA CC, BRYANT GO, LIUX, BERK AJ. Adenovirus E 1a activation domain binds the basic repeat in the TATA box transcription factor. *Cell* 1991; **67**: 365–376.
- [32] LETOVSKY J, DYNAN WS. Measurement of the binding of transcription factor SP1 to a single GC box recognition sequence. *Nucl Aci Res* 1989; **17**: 2639–2653.
- [33] LIEBERMAN PM, BERK AJ. The Zta trans-activator protein stabilizes TF II D association with promoter DNA by direct protein-protein interaction. *Genes Dev* 1991; **5**: 2441–2454.
- [34] LIN YS, GREEN MR. Mechanisms of action of an acidic transcriptional activator in vitro. *Cell* 1991; **64**: 971–981.
- [35] LIN YS, HA I, MALDONADO E, REINBERG D, GREEN MR. Binding of general transcription factor TF II B to an acidic activating region. *Nature* 1991; **353**: 569–571.
- [36] LOBO SM, LISTER J, SULLIVAN M, HERNANDEZ N. The cloned RNA pol II transcription factor IID selects RNA polymerase III to transcribe the human U6 gene in vitro. *Genes Dev* 1992; **5**: 1477–1489.
- [37] LU H, ZA WEL L, FISHER L, EGLY MJ, REINBERG D. Human general transcription factor II H phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* 1992; **358**: 641–645.
- [38] MALDONADO E, HA I, CORTES P, WEISS L, REINBERG D. Factor involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: role of transcription factors II A, II D, and II B during formation of transcription competent complex. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 6335–6347.
- [39] MEISTERERNST M, ROEDER RG. Family of proteins that interact with TF II D and regulate promoter activity. *Cell* 1991; **67**: 557–567.
- [40] MEISTERERNST M, ROY AL, LIEU HM, ROEDER G. Activation of classe II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Cell* 1991; **66**: 981–993.
- [41] MILLER J, McLACHLAN AD, KLUG A. Repetitive zinc binding domains in the protein transcription factor III A from *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 1985; **4**: 1609–1614.
- [42] NEVINS JR. Transcriptional activation by viral regulatory proteins. *TIBS* 1991; **16**: 435–439.
- [43] PASCAL E, TIJAN R. Different activation domains of SP 1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev* 1991; **5**: 1646–1654.
- [44] PARKER CS, TOPOJ J. A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor contains a promoter - region specific DNA binding activity. *Cell* 1984; **36**: 357–369.
- [45] PETERSON MG, TANESE N, PUGH BF, TIJAN R. Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding proteins. *Science* 1990; **248**: 1625–1630.
- [46] PERLMAN T, WRANGE O. Specific glucocorticoid receptor binding to DNA reconstituted in a nucleosome. *EMBO J* 1988; **7**: 3073–3083.
- [47] PINTO I, WARE DE, HAMPSEY M. The yeast SUA 7 gene encodes a homolog of human transcription factor TF II B and is required for normal start site selection in vivo. *Cell* 1992; **68**: 977–988.
- [48] PTASHNE M. How eucaryotic transcriptional activators work? *Nature* 1988; **335**: 683–689.
- [49] PTASHNE M, GANN AF. Activators and targets. *Nature* 1990; **346**: 329–331.
- [50] PUGH BF, TIJAN R. Mechanism of transcriptional activation by SP 1: evidence for coactivators. *Cell* 1990; **61**: 1187–1197.
- [51] PUGH BF, TIJAN R. Transcription from a TATA less promoter requires a multisubunit TF II D complex. *Genes Dev* 1991; **5**: 1935–1945.
- [52] RENKAWITZ R. Transcriptional repression in eukaryotes. *TIBS* 1990; **6**: 192–196.
- [53] ROEDER RG. The complexities of eucaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *TIBS* 1991; **16**: 402–408.
- [54] ROY AL, MEISTERERNST M, POGNUONEC P, ROEDER RG. Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor RNA and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* 1991; **354**: 248–249.
- [55] SAWADOGO M, SENTENAC A. RNA polymerase B (II) and general transcription factors. *Annu Rev Biochem* 1990; **59**: 711–754.
- [56] SCHULZ MC, REEDER RH, HAHN S. Variants of the TATA binding protein can distinguish subsets of RNA polymerase I, II and III promoters. *Cell* 1992; **69**: 697–702.



- [57] SHARP PA. TATA binding protein is a classless factor. *Cell* 1992; **68**: 819–821.
- [58] SHORE D, NASMYTH K. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* 1987; **51**: 721–732.
- [59] SIMMEN KA, BERNUERS I, PARRY HD, STUNNENBERG HG, BERKENSTAM A, CAVALLINI B, EGLY JM, MATTAJ JW. TF IID is required for in vitro transcription of the human V6 gene by RNA polymerase III. *EMBO J* 1991; **10**: 1853–1862.
- [60] SMALE ST, BALTIMORE D. The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 1989; **57**: 103–113.
- [61] SMALE ST, SCHMIDT MC, BERK AJ, BALTIMORE D. Transcriptional activation by SP1 as directed through TATA or initiator a specific requirement for mammalian transcription TF II D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4509–4513.
- [62] STRINGER KF, INGLES CJ, GREENBLAT J. Direct and selective binding of an acid transcriptional activation domain to the TATA box factor TF II D. *Nature* 1990; **345**, 783–786.
- [63] STRUHL K. Promoters activator proteins and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. *Cell* 1987; **49**: 295–297.
- [64] SU W, JACKSON S, TJIAN R, ECHOLS H. DNA looping between sites for transcription activation, self association of DNA bound SP1. *Genes Dev* 1991; **5**: 820–826.
- [65] SUMIMOTO H, OHKUMA Y, YAMAMOTO F, HORIKOSHI M, ROEDER RG. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Identification of general transcription factor TF II G. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 9158–9162.
- [66] TANAKA M, HERR W. Differential transcriptional activation by OCT1 and OCT2. Intendependent activation domains induce OCT2 phosphorylation. *Cell* 1990; **60**: 375–386.
- [67] TASSET D, TORAL, FORMENTAL C, SCHEER R, CHAMBON P. Distinct classes of transcriptional activating domains functions by different mechanisms. *Cell* 1990; **62**, 1177–1187.
- [68] TENESE N, PUGH BF, TJIAN R. Coactivators for a proline rich activator purified from the multisubunit human TF II D complex. *Genes Dev* 1991; **5**: 2212–2224.
- [69] TIMMERS HTHM, SHARP PA. The mammalian TF IID protein in present in two functionally distinct complexes. *Genes Dev* 1991; **5**: 1946–1956.
- [70] WEIMANN R. The basic RNA polymerase II transcriptional machinery. *Gene Expression* 1992; **2**: 81–91.
- [71] WEIS L, REINBERG D. Transcription by RNA polymerase II initiator directed formation of transcription-competent complexes. *FASEB J* 1991; **6**: 3301–3309.
- [72] WHITE JH, BROU C, WU J, BURTON J, EGLY JM, CHAMBON P. Evidence for a factor required for transcriptional stimulation by the chimeric acidic activator Gal-VP16 in the HeLA cell extracts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7674–7678.
- [73] WHITE RJ, JACKSON SP, RIGBY PWJ. A role for the TATA box binding protein component of transcription factor IID complex as a general RNA polymerase III transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 1949–1953.
- [74] WILLIAMS T, TJIAN R. Analysis of the DNA binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev* 1991; **5**: 670–682.
- [75] WOUTD LP, SMITH AB, MAGER HW, PLANTA RJ. Conserve sequence elements upstream of the gene encoding yeast ribosomal protein L-25 are involved in transcription activation. *EMBO J* 1986; **5**: 1037–1040.
- [76] VIGNAIS ML, WOUTD LP, VASSENAAR GM, MAGER HW, SENTENAC A, PLANTA RJ. Specific binding of TUF factor to upstream activation sites of yeast ribosomal protein genes. *EMBO J* 1987; **6**: 1451–1457.
- [77] YOUNG RA. RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* 1991; **60**: 689–715.
- [78] ZENZIE-GREGORY B, O'SHEA-GREENFIELD A, SMALE ST. Similar mechanisms for transcription initiation mediated through a TATA box or an initiation element. *J Biol Chem* 1992; **267**: 2823–2830.

Otrzymano: 03.07.1993 r.

Przyjęto: 02.11.1993 r.

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

# N-KOŃCOWE PEPTYDAZY KOMÓRKOWE. II. PEPTYDAZY DIPEPTYDYLOWE, TRIPEPTYDYLOWE I OMEGA PEPTYDAZY\*

## N-TERMINAL PEPTIDASES OF CELLS. II. DIPEPTIDYL PEPTIDASES, TRIPEPTIDYL PEPTIDASES AND OMEGA PEPTIDASES

Halina OSTROWSKA

Zakład Analizy Instrumentalnej, Akademia Medyczna w Białymstoku

*Streszczenie.* Do N-końcowych peptydaz należą: aminopeptydazy, peptydazy dipeptydylowe, peptydazy tripeptydylowe i omega peptydazy. Aminopeptydazy omówiono w części I pracy. Część II zawiera przegląd literatury dotyczącej pozostałych peptydaz z uwzględnieniem ich właściwości fizykochemicznych i biochemicznych oraz roli biologicznej.

*Słowa kluczowe:* peptydazy dipeptydylowe, tripeptydylowe, "omega peptydazy"

*Summary.* N-terminal peptidases include aminopeptidases, dipeptidyl peptidases, tripeptidyl peptidases and "omega peptidases". Aminopeptidases were described in part I of the article. The review of literature on remaining peptidases: their subcellular localization, physico-chemical and biochemical properties, and biological significance are discussed in part II of this paper.

*Key words:* dipeptidyl peptidases, tripeptidyl peptidases, "omega peptidases"

### 1. WSTĘP

Peptydazy dipeptydylowe (hydrolazy dipeptydylopeptydowe, EC 3.4.14.-) i peptydazy tripeptydylowe (hydrolazy tripeptydylopeptydowe, EC 3.4.-) uwalniają z N-końca peptydów odpowiednio dipeptydy i tripeptydy. "Omega peptydazy" są nową klasą egzopeptydaz [36]. Do N-końcowych "omega peptydaz" należą enzymy, które odszczepiają od substratów aminokwasy nie mające wolnej grupy  $\alpha$ -aminowej (peptydaza pyroglutamylowa I i II, peptydaza

\*Praca jest finansowana z budżetu Uczelni.



acyloaminoacylowa i peptydaza  $\beta$ -aspartylowa) oraz aminokwasy tworzące wiązanie peptydowe, w którym nie uczestniczy grupa  $\alpha$ -COOH (transpeptydaza  $\gamma$ -glutamylowa).

Przegląd enzymów należących do tych klas zamieszcza tabela 1.

TABELA 1. Klasyfikacja peptydaz dipeptydylowych, tripeptydylowych i omega peptydaz wg [36]

Nazwa enzymu	Inne nazwy	Nr klasyfikacyjny
<b>Peptydazy dipeptydylowe</b>		
Peptydaza dipeptydylowa I, DPP I	Katepsyna C, aminopeptydaza dipeptydylowa I (DAP I), arylamidaza dipeptydylowa I, transferaza dipeptydylowa, enzym degradujący glukagon	EC 3.4.14.1
Peptydaza dipeptydylowa II, DPP II	Arylamidaza dipeptydylowa II, karboksytripeptydaza, aminopeptydaza dipeptydylowa II (DAP II), aminopeptydaza dipeptydylowa A	EC 3.4.14.2
Peptydaza dipeptydylowa III, DPP III	Aminopeptydaza dipeptydylowa III (DAP III), arylamidaza dipeptydylowa III, angiotensynaza erytrocytów, obojętna angiotensynaza, enkefalinaza B	EC 3.4.14.4
Peptydaza dipeptydylowa IV, DPP IV	Aminopeptydaza dipeptydylowa IV (DAP IV), postpolinowa aminopeptydaza dipeptydylowa IV, aminopeptydaza X-Pro-dipeptydylowa, naftylamidaza Gly-Pro	EC 3.4.14.5
Peptydaza dipeptydylowa V, DAP V	–	EC 3.4.14.-
<b>Peptydazy tripeptydylowe</b>		
Peptydaza tripeptydylowa I, TPP I	Aminopeptydaza tripeptydylowa	brak
Peptydaza tripeptydylowa II, TPP II	Aminopeptydaza tripeptydylowa	brak
<b>Omega peptydazy</b>		
Peptydaza pyroglutamylowa I, PGP I	Peptydaza pyrrolidonokarboksylowa (PCA), aminopeptydaza pyroglutamylowa, peptydaza pyrrolidonylowa	EC 3.4.19.3
Peptydaza pyroglutamylowa II, PGP II	Peptydaza tyroliberynopyroglutamylowa (TRH), peptydaza pyrrolidonokarboksylowa-TRH, aminopeptydaza TRH pyroglutamylowa, tyroliberynaza, enzym degradujący tyroliberynę	EC 3.4.19.-
Transpeptydaza $\gamma$ -glutamylowa, $\gamma$ -GTP	Transferaza $\gamma$ -glutamylowa, hydrolaza $\gamma$ -glutamylowa, glutaminaza niezależna od fosforanu, glutaminaza stymulowana maleinianem	EC 2.3.2.2
Peptydaza acyloaminoacylowa, AcAP	Enzym uwalniający acyloaminokwasy, enzym uwalniający N-formylometioninę, aminopeptydaza N-formylometioniny (fMet), aminopeptydaza N-acetyloalaniny (AcAla), N-acetyloaminoacyl-p-nitroanilidaza, hydrolaza N-acylopeptydu	EC 3.4.19.1
Peptydaza $\beta$ -aspartylowa, $\beta$ AP	dipeptydaza $\beta$ -aspartylowa	EC 3.4.13.10 EC 3.4.19.-

## 2. PEPTYDAZY DIPEPTYDYLOWE

Peptydazy dipeptydylowe występują we frakcji lizosomalnej (peptydaza dipeptydylowa I i II), cytozolowej (peptydaza dipeptydylowa III) i błonowej (peptydaza dipeptydylowa IV) różnych tkanek i narządów zwierząt i człowieka. Charakterystykę ich właściwości fizykochemicznych i biochemicznych przedstawia tabela 2.

TABELA 2. Porównanie właściwości fizykochemicznych i biochemicznych peptydaz dipeptydylowych wg [22] i [36]

Enzym	DPP I	DPP II	DPP III	DPP IV	DAP V
Źródło enzymu	wątroba szczura	przysadka wołu	mózg szczura	wątroba szczura	mózg szczura
Substrat do oznaczania	Gly-Arg-NA	Lys-Ala-NA	Arg-Arg-NA	Gly-Pro-NA	Arg <sup>o</sup> -enkefalina
Substraty peptydowe	ACTH, angiotensyna II, glukagon, sekretyna	Ala-3, Met-3	angiotensyna II, enkefalina, Ala-4,Lys-4, Phe-4	Gly-Pro-Ala, Gly-Gly	Arg <sup>o</sup> -enkefalina, proktolina, neuromedyna
Optimum pH	5,0-6,0	4,5-5,5	8,0-9,0	7,8-8,7	7,0
Miejsce aktywne	tiolowe	seryna	seryna	seryna	tiolowe
Aktywatory	halogenki	-	tiol	-	Mn <sup>+2</sup>
Masa cząsteczkowa	200000	130000	80000	260000	64000

## 2.1. PEPTYDAZA DIPEPTYDYLOWA I

Peptydaza dipeptydylowa I (DPP I, EC 3.4.14.1) występuje we frakcji lizosomalnej wielu tkanek i narządów (tab. 3). Głównym źródłem aktywności tego enzymu jest śledziona człowieka i szczura, nerki człowieka i wątroba szczura [29, 34, 36, 39, 45]. Aktywność tego enzymu wykazano także w płucach, przysadce mózgowej, mięśniach gładkich i szkieletowych, w fibroblastach skóry, łożysku, jądrach i w płynie nasiennym [10, 32, 36].

Peptydaza dipeptydylowa I jest syntetyzowana w postaci prekursora [9]. Występuje on w retikulum endoplazmatycznym i aparacie Golgiego w formie związanej z błonami. Cząsteczka

TABELA 3. Rozmieszczenie peptydazy dipeptydylowej I, II i III w narządach szczura i człowieka wg [38]

Narząd	Aktywność w %				
	DPP I		DPP II		DPP III
	człowiek	szczur	człowiek	szczur	szczur
Śledziona	100	100	100	100	52
Nerki	85	28	206	85	37
Płuca	29	54	84	37	42
Wątroba	19	130	46	24	10
Dwunastnica	16	-	89	-	41
Jelito	-	49	-	44	-
Trzustka	4	35	78	16	100
Tarczycza	-	28	-	124	19
Przysadka	-	2,6	-	75	39
Serce	2	-	34	-	-
Skóra	2	-	16	-	-
Mózg	0,3	0,3	33	16	22
Gruczoł łzowy	-	-	-	63	56
Grasica	-	-	-	59	62
Nadnercze	-	-	-	37	19
Ślinianka podżuchw.	-	-	-	25	58
Jądra	-	-	-	23	26
Mięsień szkieletowy	-	-	-	16	7,5
Gruczoł krokowy	-	-	-	-	70
Pęcherzyk nasienny	-	-	-	-	36



enzymu składa się z 462 reszt aminokwasowych [25, 29]. Pod względem sekwencji aminokwasowej DPP I wykazuje w ok. 30% identyczność z katepsyną L, B i papainą.

DPP I wyizolowana z różnych źródeł jest glikoproteiną mającą masę cząsteczkową 197000–235000 daltonów i budowę podjednostkową [29, 34, 36]. Enzym ze śledziony człowieka o masie cząsteczkowej 200000 daltonów składa się z podjednostek o masie cząsteczkowej 24000 daltonów [39]. Punkt izoelektryczny enzymu z wątroby szczura znajduje się w pH 5,0 [36], a ze śledziony człowieka w pH 5,4 [39].

DPP I odszczepia od syntetycznych substratów oraz naturalnych peptydów i polipeptydów N-końcowy dipeptyd [34, 36, 39]. Specyficzność substratową tego enzymu z wątroby szczura przedstawia tabela 4. Substratem hydrolizowanym z największą szybkością i używanym do oznaczania aktywności DPP I jest Gly-Arg-NNap. Enzym ten wykazuje również wysokie powinowactwo do Ala-Arg-NNap, Pro-Arg-NNap i Ser-Met-NNap. Naturalnym substratem

TABELA 4. Specyficzność substratowa peptydazy dipeptydylowej I wątroby szczura wg [38]

Substrat	Aktywność	
	$\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$	%
Gly-Arg-NNap	300	100
Z-Gly-Arg-NNap	0	0
Ala-Arg-NNap	215	72
Pro-Arg-NNap	164	55
Gly-Trp-NNap	150	50
Ser-Met-NNap	100	33
Ala-Ala-NNap	46	15
Glu-His-NNap	33	11
Ser-Tyr-NNap	28	9
Phe-Arg-NNap	23	8
Gly-Phe-NNap	17	5,6
His-Ser-NNap	16	5,3
Leu-Ala-NNap	10	3,4
Lys-Ala-NNap	0	0
Arg-Arg-NNap	0	0
Gly-Pro-NNap	0	0

peptydazy dipeptydylowej I jest angiotensyna i jej analogi oraz hormony polipeptydowe, takie jak glukagon, sekretyna, gastryna,  $\beta$ -kortykotropina, ACTH oraz łańcuch A i B insuliny wołu. Oprócz aktywności hydrolazowej DPP I wykazuje też aktywność transferazową i polimerazową [36, 39]. Optimum aktywności hydrolazowej przypada na pH 4,0–6,0, transferazowej na pH 6,8–7,7, a polimerazowej na pH 7,7. Aktywatorami DPP I są jony  $\text{Cl}^-$  i związki sulfhydrylowe [36].

DPP I jest cysteinową proteinazą, której aktywność hamuje pCMB, jodoocetan, maleimid, leupeptyna oraz jony metali ciężkich [25, 34, 36]. Inhibicję dokonywaną przez pCMB odwracają związki sulfhydrylowe i glutation. DPP I traci aktywność w czasie przechowywania w niskiej temperaturze [36]. Jedynie przechowywanie w temperaturze  $-70^\circ\text{C}$  w obecności NaCl, sacharozy i EDTA chroni enzym przed inaktywacją.

Podwyższona aktywność DPP I w surowicy występuje w schorzeniach wątroby, serca i mięśni oraz w nowotworze nabłonkowym [36, 56]. Na aktywność enzymu występującego w fibroblastach [10] i w mózgu [36] wpływa kortyzol, trójiodotyrozyna i testosteron.

## 2.2. PEPTYDAZA DIPEPTYDYLOWA II

Peptydaza dipeptydylowa II (DPP II, EC 3.4.14.2) występuje w lizosomach wielu tkanek i narządów zwierząt oraz człowieka [4, 33, 34, 36, 41]. Zlokalizowana jest ona w komórkach nabłonkowych [7], nerwowych i glejowych [42]. Najwyższą aktywność tego enzymu wykazują nerki człowieka i tarczyca szczura oraz śledziona człowieka i szczura (por. tab. 3). DPP II występuje też w przysadce mózgowej, mięśniach szkieletowych, fibroblastach skóry, miazdze zęba, łożysku, jajnikach i w męskich narządach rozrodczych [32, 36]. Aktywność tego enzymu wykazują również makrofagi i płyn mózgowo-rdzeniowy człowieka [19, 36].

DPP II jest glikoproteiną i ma masę cząsteczkową 97000–150000 daltonów w zależności od pochodzenia enzymu [33, 34, 36, 41]. Cząsteczka enzymu z mózgu szczura nie zawiera kwasu sjałowego [42]. Punkt izoelektryczny DPP II z różnych źródeł znajduje się w pH 4,2–5,0 [33, 34, 36, 41]. W makrofagach otrzymanych z jamy otrzewnowej szczura występuje 10 izoenzymów, a w makrofagach występujących w pęcherzykach płucnych 4 izoenzymy DPP II [36]. Z frakcji rozpuszczalnej i błonowej mózgu szczura wyizolowano dwie formy tego enzymu [41].

Specyficzność substratową peptydazy dipeptydylowej II przysadki mózgowej wołu przedstawia tabela 5. Enzym ten hydrolizuje z największą szybkością Lys-Ala-NNap, Phe-Pro-NNap i Arg-Pro-NNap. Optimum aktywności w działaniu na naftyłamidy i nitroanilidy tych dipeptydów przypada na pH 5,5, a w degradacji tripeptydów na pH 4,5 [36, 41]. DPP II hydrolizuje też tripeptydy zawierające w N-końcu sekwencję X-Pro [41]. W miarę wydłużania łańcucha peptydowego substratu podatność na działanie enzymu znacznie się obniża. DPP II hydrolizuje też fragment 1–3 i 1–5 bradykininy. Enzym z kory nerek szczura współdziała z tripeptydydową peptydazą w degradacji polipeptydów bogatych w prolinę, takich jak fragmenty kolagenu [4]. DPP II nie wymaga obecności aktywatorów. Aktywność tego enzymu oznacza się najczęściej przy użyciu Lys-Ala-NNap, Lys-Ala-MCA lub Lys-Pro-NNap w pH 5,0–5,5 [33, 34, 36]. W celu wyeliminowania wpływu innych aminopeptydaz na wynik pomiaru do mieszaniny inkubacyjnej dodaje się o-fenantrolinę.

DPP II jest serynową peptydazą, której aktywność hamuje DFP i Pms-F [33, 34, 36]. Inhibitorem tego enzymu jest również puromycyna, jony metali ciężkich, Tris oraz detergenty o wysokiej masie cząsteczkowej. Wysokoczyszczone preparaty tego enzymu mogą być przechowywane w temperaturze +4°C do 1 miesiąca.

Aktywność DPP II jest wyższa w surowicy kobiet niż mężczyzn [36]. U kobiet zmienia się ona w czasie cyklu miesięcznego. Podwyższona aktywność DPP II w surowicy występuje u chorych na cukrzycę, nowotwory i u alkoholików [36]. Wzrost aktywności tego enzymu wykazano również w płynie mózgoworzdzeniowym, chorobie Parkinsona [19] oraz w płynie maziówkowym kolana w chorobie reumatycznej [28]. DPP II jest wykorzystywana jako marker w badaniach cytochemicznych [36].

TABELA 5. Hydroliza syntetycznych substratów przez peptydazę dipeptydydową II przysadki mózgowej wołu i peptydazę dipeptydydową IV wątroby szczura wg [38]

Substrat	Aktywność w %	
	DPP II	DPP IV
Lys-Ala-NNap	100	4,9
Gly-Pro-NNap	4,5	100
Arg-Pro-NNap	62	126
Phe-Pro-NNap	75	167
Boc-Arg-Pro-NNap	0	0
Arg-Ala-NNap	30	5,8
Ala-Ala-NNap	5	5,5
Leu-Ala-NNap	10	3

### 2.3. PEPTYDAZA DIPEPTYDYLOWA III

Peptydaza dipeptydydowa III (DPP III, EC 3.4.14.4) jest zlokalizowana we frakcji cytozolowej wielu tkanek i narządów szczura (por. tab. 3). Głównym źródłem aktywności tego enzymu jest trzustka tego zwierzęcia [36]. DPP III występuje też w śledzionie [33], nerkach [34], mózgu, mięśniach szkieletowych i soczewce oka [36], łożysku [32, 65], w męskich narządach rozrodczych i plazmie nasiennej [70] oraz w komórkach krwi: erytrocytach, leukocytach wielojądrzastych, monocytach i limfocytach [1, 18].



Masa cząsteczkowa DPP III wyizolowanej z różnych źródeł wynosi ok. 80000 daltonów [1, 34, 70]. Enzym ze śledziony wieprza ma masę cząsteczkową 66000 daltonów i jest glikoproteiną [33]. Punkt izoelektryczny enzymu z erytrocytów [1] znajduje się w pH 4,5–4,6, ze śledziony wieprza w pH 4,4, a z przysadki mózgowej w pH 5,5 [36]. W centrum aktywnym DPP III występuje seryna [33].

Peptydaza dipeptydylowa III hydrolizuje wiele arylamidów oraz oligopeptydy i polipeptydy [36, 65, 70]. Optymalna aktywność w degradacji arylamidów przypada na pH 9,0, a w degradacji oligopeptydów i polipeptydów na pH 6,8–7,5 [68].

Aktywność DPP III oznacza się przy użyciu Arg-Arg-NNap, Arg-Arg-NA oraz Ala-Ala-Ala-Ala w pH 8,5–9,0 [1, 36, 70]. Enzym z erytrocytów i łożyska aktywują jony  $\text{Co}^{+2}$  i  $\text{Zn}^{+2}$  [1, 65]. Naturalnymi substratami DPP III są peptydy biologicznie czynne, takie jak angiotensyna II oraz Leu- i Met-enkefalina [1, 65]. Enzym z erytrocytów wykazuje też wysokie powinowactwo do angiotensyny III [1].  $\beta$ -kortykotropina i glukagon nie są hydrolizowane przez DPP III. Aktywność peptydazy dipeptydylowej III hamuje DFP i Pms-F [1, 33, 36, 70]. pCMB, EDTA i leupeptyna również obniżają aktywność tego enzymu. Inhibicja dokonywana przez EDTA jest odwracana przez jony  $\text{Zn}^{+2}$ . Na działanie tego inhibitora nie jest wrażliwy enzym ze skóry szczura i z erytrocytów człowieka [36].

#### 2.4. PEPTYDAZA DIPEPTYDYLOWA IV

Peptydaza dipeptydylowa IV (DPP IV, EC 3.4.14.5) wykryta została w nerkach szczura i opisana jako glicyloprolino-p-naftylamidaza [36]. Enzym ten występuje we frakcji błonowej nerek [34, 51, 63, 74], wątroby [30, 47], jelita cienkiego i grubego [17], łożyska [32], mięśni gładkich ściany naczyń krwionośnych [48] płuc i trzustki [21, 23], mięśni szkieletowych i w fibroblastach skóry człowieka i zwierząt [36, 71]. Zlokalizowany jest on w komórkach nabłonkowych [7]. Aktywność DPP IV wykazują ponadto ślinianki podżuchwowe człowieka [36] oraz leukocyty [20], limfocyty [5, 20, 46, 57, 58], makrofagi [36], płytki krwi [20, 55] i surowica krwi człowieka [36].

Wysokooczyszczone preparaty peptydazy dipeptydylowej IV otrzymuje się metodą chromatografii powinowactwa przy użyciu Gly-Pro-AH-Sepharozy 4B lub Sepharozy związanej z przeciwciałami [36]. Zastosowanie chromatografii jonowymiennej na QAE-Zeta-Prep-15 i elucja gradientem skokowym NaCl pozwala na otrzymanie preparatu tego enzymu wolnego od zanieczyszczeń aminopeptydazami i dipeptydazami [63].

W wątrobie świni i szczura wykazano obecność dwóch form DPP IV: formy rozpuszczalnej, ekstrahowanej Tritonem X-100 (sDPP) i formy związanej z błonami, otrzymanej przez działanie papainy (mDPP) [36, 47]. Obie formy mają zbliżoną masę cząsteczkową, podobny skład aminokwasowy i nie różnią się właściwościami enzymatycznymi oraz immunologicznymi. Różnice dotyczą składu aminokwasowego N-końcowego fragmentu cząsteczki enzymu, składu cukrowego i punktu izoelektrycznego [36, 47, 62]. N-końcowy fragment mDPP bierze udział w wiązaniu się tego enzymu z błonami [47]. Dwie formy molekularne DPP IV różniące się masą cząsteczkową i punktem izoelektrycznym występują natomiast w surowicy krwi człowieka [36].

Wyizolowano cDNA kodujący DPP IV człowieka [43, 47]. Cząsteczka enzymu zawiera 766 reszt aminokwasowych, o 1 resztę mniej niż DPP IV szczura.

DPP IV wyizolowana z wielu narządów jest glikoproteiną, ma masę cząsteczkową 230000–280000 daltonów i zbudowana jest z dwóch identycznych podjednostek [34, 36, 63, 74].

Powstawanie dimeru DPP IV zachodzi w aparacie Golgiego [26]. Niższą masą cząsteczkową charakteryzuje się enzym z wątroby szczura, limfocytów człowieka i leukocytów świnki morskiej. Natomiast DPP IV z fibroblastów skóry człowieka ma masę cząsteczkową 400000 daltonów i zbudowana jest z dwóch różnych podjednostek. Pod względem właściwości enzymatycznych enzym ten wykazuje duże podobieństwo do DPP IV z nerek świni. Punkt izoelektryczny DPP IV znajduje się w pH 3,9–5,5 w zależności od pochodzenia enzymu [36]. Poznano również sekwencję aminokwasową [43, 47, 63], skład cukrowy [7] i centrum aktywne tego enzymu [36]. Cząsteczka enzymu z wątroby szczura zawiera 12,4% węglowodanów, głównie mannozę, galaktozę, fukozę, N-acetyloglukozaminę i kwas neuraminowy [30].

DPP IV hydrolizuje syntetyczne substraty i naturalne peptydy zawierające w przedostatniej pozycji od N-końca prolinę, hydroksyprolinę lub alaninę [48, 51, 74]. Specyficzność substratową tego enzymu przedstawia tabela 5. DPP IV wątroby szczura wykazuje największe powinowactwo do naftylamidu dipeptydów, takich jak: Phe-Pro, Arg-Pro i Gly-Pro [36]. Aktywność enzymu z nerek wieprza badano na dipeptydach-NPhN<sub>2</sub>Ph. Substratem hydrolizowanym z największą szybkością jest Ala-Pro-NPhN<sub>2</sub>Ph, Pro-Pro-NPhN<sub>2</sub>Ph i Phe-Pro-NPhN<sub>2</sub>Ph. DPP IV hydrolizuje też Gly-Pro-NNapOMe. Substrat ten jest wykorzystywany do badania lokalizacji subkomórkowej DPP IV przy użyciu mikroskopu elektronowego [36]. DPP IV hydrolizuje naturalne peptydy, takie jak substancja P i kazomorfiną [3, 20, 36]. W degradacji bradykininy i substancji P bierze udział wspólnie z mikrosomalną aminopeptydazą prolinową (mPAP) i alaninową (mAAP), a w degradacji polipeptydów współdziała z DPP I [3, 36]. Enzym z trzustki uwalnia N-końcowy dipeptyd z trypsynogenu i prokolipazy soku trzustkowego [21]. DPP IV wykazuje też aktywność endopeptydazową [36].

Aktywność DPP IV oznacza się najczęściej przy użyciu naftylamidu lub nitroanilidu Gly-Pro oraz Gly-Pro-MCA [8, 36, 59, 74]. Do oznaczania aktywności tego enzymu stosuje się również Leu-Leu-NNap, Ala-Ala-NPh<sub>2</sub>Ph i Gly-Pro-NA [36]. Aktywność DPP IV oznacza się w pH 7,2–9,0 [36, 74]. Enzym ten nie wymaga obecności aktywatorów. DPP IV jest serynową proteinazą, której aktywność hamuje DFP, Pms-F, diprotina A, puromycyna, jony Pb<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup>, i Zn<sup>+2</sup> oraz cytryniany i fosforany [34, 36, 48, 74]. Enzym jest stabilny w stężonych roztworach mocznika.

Rola fizjologiczna DPP IV nie jest dokładnie poznana. Enzym hydrolizuje wiązania Gly-Pro w kolagenie [36]. Pozwala to wnosić o jego udziale w metabolizmie tego białka. DPP IV uwalnia Gly-Pro od N-końca łańcucha  $\alpha$  monomerów fibryny, co utrudnia ich polimeryzację [36]. Wykazano, że DPP IV wiąże się z fibronektyną w miejscu innym niż miejsce wiążące substrat [49]. Fibronektyna może też pośredniczyć w wiązaniu się tego enzymu z kolagenem. Interakcja DPP IV z fibronektyną może mieć znaczenie w wiązaniu się hepatocytów z zewnątrzkomórkowym matriks in vivo [49]. Występowanie DPP IV w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych sugeruje rolę tego enzymu w metabolizmie wazoaktywnych peptydów [48]. DPP IV pełni znaczącą rolę w indukowaniu i aktywacji cytokinin kontrolujących proliferację ludzkich limfocytów [20, 46, 57, 58]. Bierze również udział w degradacji hormonu GRH w osoczu [15]. Oznaczanie aktywności DPP IV we krwi jest przydatne w diagnostyce wielu schorzeń. Zmiany aktywności DPP IV w surowicy wykazano w niektórych schorzeniach mięśni [36], wątroby [46], nerek [75], w nowotworach tarczycy [6, 31], płuc [60, 61], nabłonka [56], w schorzeniach reumatycznych [28, 66] oraz w limfocytach nosicieli wirusa HIV [12]. Nie wykazano zależności aktywności DPP IV od wieku i płci. Diagnostyczne znaczenie ma również oznaczanie aktywności tego enzymu w moczu pacjentów ze schorze-



niami nerek [75]. Aktywność DPP IV oraz innych peptydaz dipeptydylowych, tripeptydylowych i aminopeptydaz nie zmienia się w chorobie Alzheimera [35].

### 3. INNE PEPTYDAZY DIPEPTYDYLOWE

Fracja błonowa mózgu szczura zawiera aktywność peptydazy dipeptydylowej innej od dotychczas poznanych [22]. Enzym ten nazwano peptydazą dipeptydylową V (DAP V). Uwalnia ona dipeptydy aminokwasów zasadowych i wymaga aktywacji jonami  $Mn^{+2}$ . DAP V nie hydrolizuje substratów innych peptydaz dipeptydylowych. Właściwości fizykochemiczne i biochemiczne tego enzymu przedstawia tabela 2.

Z mózgu szczura wyizolowano peptydazę dipeptydylową, która w pH 5,5 hydrolizuje Lys-Ala-NNap (substrat DPP II) oraz Gly-Pro-MCA (substrat DPP IV) [24]. Aktywność tego enzymu jest hamowana przez DFP, Pms-F i puromycynę. Wrażliwość enzymu na te inhibitory oraz kwaśne optimum pH wskazuje na duże podobieństwo do DPP II.

### 4. PEPTYDAZY TRIPEPTYDYLOWE

#### 4.1. PEPTYDAZA TRIPEPTYDYLOWA I

Peptydaza tripeptydylowa I (TPP I) występuje we frakcji lizosomalnej różnych narządów zwierząt i człowieka [36, 37]. Aktywność TPP I występuje w przysadce mózgowej wołu, wątrobie, śledzionie, nerkach, trzustce, tarczycy, nadnerczach, płucach, macicy i jajnikach świni i szczura [36].

TPP I występująca w mózgu wołu jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 57000 daltonów [36]. Enzym wyizolowany z jajników tworzy agregaty o masie cząsteczkowej powyżej 250000 daltonów, które dysocjują w 3 M moczniku na aktywne monomery o masie cząsteczkowej 55000 daltonów [36]. Monomer składa się z dwóch nieidentycznych podjednostek.

TPP I hydrolizuje arylamidy tripeptydowe, takie jak: Gly-Pro-Ala, Gly-Pro-Met i Val-Pro-Arg oraz oligopeptydy i białka [36]. Naturalnym substratem TPP I jest  $\beta$ -kortykotropina, glukagon, somatostatyna oraz angiotensyna II i III. Enzym z przysadki mózgowej wołu dokonuje daleko posuniętej degradacji hormonu wzrostu [36]. Substratem służącym do oznaczania aktywności TPP I jest Ala-Ala-Phe-NPhNO<sub>2</sub>, Gly-Pro-Met-NNap (MCA) oraz Ala-Ala-Phe-MCA [34, 36]. Optimum aktywności tego enzymu znajduje się w pH 4,0–4,5.

Aktywność TPP I hamuje DFP i Gly-Pro-Met-CH<sub>2</sub>Cl oraz pCMB i jony Hg<sup>+2</sup> [36]. Nie jest natomiast wrażliwa na pepstatynę i leupeptynę. TPP I z przysadki mózgu wołu w odróżnieniu od tego enzymu z jajników świni ulega całkowitej inaktywacji podczas zamrażania i odmrażania i w pH powyżej 5,0. Jest natomiast stabilna w 0,1 M kwasie octowym w temperaturze + 5 C.

#### 4.2. PEPTYDAZA TRIPEPTYDYLOWA II

Peptydaza tripeptydylowa II wykryta została we frakcji mikrosomalnej wątroby szczura [36]. Enzym ten ma masę cząsteczkową ok. 1000000 daltonów. Dializa powoduje dysocjację

TPP II na mniejsze podjednostki [69]. W wyniku trawienia tych podjednostek chymotrypsyną otrzymuje się trzy stabilne fragmenty. Fragment o masie cząsteczkowej 70000 daltonów zawiera serynowe centrum aktywne. Natomiast fragment o masie cząsteczkowej 42000 daltonów jest odpowiedzialny za wiązanie się z fibronektyną [69]. Ustalono całkowitą sekwencję nukleotydową cDNA kodującą N-końiec TPP II [68].

TPP II uwalnia tripeptydy od oligopeptydów mających wolną grupę N-końcową. Aktywność tego enzymu oznacza się przy użyciu  $^{32}\text{P}$ -fosfopeptydów, takich jak heksapeptyd Arg-Arg-Ala-Ser( $^{32}\text{P}$ )-Val-Ala.

W nerkach człowieka występuje aminopeptydaza tripeptydylowa o masie cząsteczkowej ponad 500000 daltonów [36]. Enzym ten hydrolizuje tripeptyd Ala-Ala-Phe-MCA w pH 7,5 w obecności ditiotreitolu. Aktywność tej proteazy hamują jony  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$  i  $\text{Zn}^{+2}$  oraz fenantrolina, maleimid, puromycyna i bestatyna.

## 5. N-KOŃCOWE "OMEGA PEPTYDAZY"

### 5.1. TRANSPEPTYDAZA $\gamma$ -GLUTAMYLOWA

Transpeptydaza  $\gamma$ -glutamyłowa (GTP, EC 2.3.2.2) została szczegółowo scharakteryzowana przez wielu autorów [2, 13, 36, 38, 52]. Występuje ona we frakcji błonowej prawie wszystkich narządów, ale głównym źródłem jej aktywności są nerki. GTP z nerek szczura jest glikoproteiną i zawiera 18,5–35% węglowodanów [36]. Po solubilizacji tkanek proteazami wyizolowano enzym o masie cząsteczkowej 68000–80000 daltonów (P- $\gamma$ -GTP), a po solubilizacji detergentami enzym o masie cząsteczkowej 169000–200000 daltonów (D- $\gamma$ -GTP) [13]. Cząsteczka GTP zbudowana jest z dwóch podjednostek: łańcucha lekkiego (L) i łańcucha ciężkiego (H). Aktywność proteolityczną wykazuje łańcuch lekki, natomiast łańcuch ciężki zawiera miejsce wiążące substrat. D- $\gamma$ -GTP z nerek szczura zawiera w N-końcu łańcucha ciężkiego hydrofobowy peptyd o masie cząsteczkowej 6000 daltonów, za pomocą którego enzym ten wiąże się z błonami. Wykazano wiele izoenzymów P- $\gamma$ -GTP, które różnią się zawartością kwasu sjałowego i punktem izoelektrycznym oraz różne formy molekularne tego enzymu różniące się masą cząsteczkową.

$\gamma$ -glutamylotransferaza charakteryzuje się aktywnością transferazową i hydrolazową [8, 36]. Katalizuje ona przeniesienie grupy  $\gamma$ -glutamyłowej z  $\gamma$ -glutamyłowych peptydów. Akceptorem tych grup są aminokwasy (Met, Gln, Arg) i peptyd Gly-Gly [36, 38]. Substratem służącym do oznaczania aktywności GTP jest naftylamid lub nitroanilid  $\gamma$ -glutaminowy oraz zredukowany glutation [38]. Aktywność oznacza się też przy użyciu L-Glu-(7-amido-4-metyloksymaryny) metodą fluorymetryczną [8]. Optimum aktywności znajduje się w pH 7,5–9,0. Aktywność GTP jest hamowana przez jodoacetamid oraz serynę w obecności boranu [36].

Rola fizjologiczna  $\gamma$ -glutamylotransferazy polega na przenoszeniu aminokwasów i peptydów z donatorów na akceptory. Aktywność hydrolazowa związana jest z uwalnianiem grupy aminowej z glutaminy [38]. GTP bierze również udział w procesach detoksykacji poprzez tworzenie kwasów merkaptouronowych [38]. Aktywność tego enzymu zwiększa się w płynie maziowym, w surowicy i moczu chorych na reumatyzm [52]. Wzrost aktywności tego enzymu w surowicy występuje także w nowotworach wątroby, jelita grubego i skóry [36].



#### 4.2. PEPTYDAZA PYROGLUTAMYLOWA I

Peptydaza pyroglutamyłowa I (PGPI, EC 3.4.19.3) występuje we frakcji cytozolowej wielu tkanek ssaków, ptaków, ryb, roślin oraz w bakteriach *E. coli* [11, 16, 36, 53, 67]. Spośród narządów ssaków najwyższą aktywność tego enzymu wykazują: wątroba, nerki i śledziona oraz przedni płat przysadki mózgowej [36].

Peptydaza pyroglutamyłowa I mózgu świnki morskiej ma masę cząsteczkową 24000 daltonów i punkt izoelektryczny w pH 4,6 [36]. PGP I uwalnia N-końcową grupę pyroglutamyłową (p-Glu) z wielu arylamidów aminokwasowych i polipeptydów [67]. Enzym z wątroby szczura hydrolizuje najszybciej pGlu-Ala i wolniej pGlu-Ile oraz pGlu-Phe. Nie hydrolizuje natomiast Glu-Ala i pGlu-Pro. Peptydaza pyroglutamyłowa I mózgu hydrolizuje wiązanie pGlu-His w tyrotropinie, tyroliberynie i luliberynie, pGlu-Leu w neurotensynie, pGlu-Ser w łańcuchu B relaksyny, pGlu-Gln w bombesynie oraz wiązanie pGlu-Gly w peptydzie B [11, 14, 40]. Produktami końcowymi w działaniu tego enzymu na peptydy jest wolny kwas pyroglutamyłowy i despyroglutamylpeptyd. PGP I nie hydrolizuje analogów TRH wykazujących terapeutyczne znaczenie [14]. Wykazano jednak, że analog tyreotropiny, jakim jest p-Glu-His-amfetamina jest hydrolizowany, w związku z czym może wywierać efekt psychotropowy [36]. PGP I uwalnia również grupy pyroglutamyłowe z N-końca łańcucha B natywnego fibrynogenu [36].

Do oznaczania aktywności PGP I używa się pGlu-Ala, pGlu-NNap lub pGlu-NMec [36, 67]. Najwyższą aktywność wykazuje ten enzym w buforze fosforanowym o pH 7,5 zawierającym 2 mM ditiotretol i 2 mM EDTA. Aktywność PGP I hamuje pGlu-CH<sub>2</sub>Cl, jodoacetamid i 1,10-fenantrolina [36, 67]. Natomiast enzym ten nie jest wrażliwy na Pms-F, puromycynę i bestatynę. Stabilizatorem aktywności PGP I jest EDTA i 2-pyrrolidon. Znaczenie biologiczne PGP I polega na degradacji hormonów TRH i LHRH [40]. Aktywność tego enzymu wzrasta z wiekiem [11, 16]. Pełni on prawdopodobnie rolę w zmianach neurochemicznych zachodzących podczas dojrzewania komórek mózgowych.

#### 5.3. PEPTYDAZA PYROGLUTAMYLOWA II

Peptydaza pyroglutamyłowa II (PGP II, EC 3,4,19.-) występuje w błonach synaptosomalnych mózgu [36, 72, 73]. Aktywność PGP II wykryto również w trzustce szczura [72] i w surowicy krwi człowieka [44, 76].

PGP II ma masę cząsteczkową 230000–260000 daltonów [36]. Enzym z błon synaptosomalnych jest odporny na solubilizację ultradźwiękami lub działanie Tritonu X-100 i dezoksycholenu. Uwalniany jest natomiast z tych błon pod wpływem działania papainy.

PGP II uwalnia reszty pyroglutamyłowe (pGlu-) z tyroliberyny (pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>) i luliberyny (pGlu-His-Trp-) oraz hydrolizuje pGlu-His-Pro i pGlu-His-Gly [50]. Na działanie tego enzymu nie jest wrażliwa neurotensyna, tripeptyd luliberyna (pGlu-His-Trp), bombesyna i analogi tyroliberyny. Nie hydrolizuje też dipeptydów zawierających N-końcowy kwas pyroglutaminowy (pGlu) i peptydów pyroglutamyłowych zawierających w swoim składzie więcej niż 3 reszty aminokwasowe [76].

Aktywność PGP II oznacza się najczęściej przy użyciu <sup>14</sup>C-pyroglutamylotyroliberyny w buforze imidazolowym lub Tris o pH 7,5. Do oznaczania aktywności tego enzymu wykorzystuje się wysokociśnieniową chromatografię (HPLC) [36]. Inhibitorem PGP II jest ditiotretol, EDTA, 1,10-fenantrolina i jony metali ciężkich, takie jak Hg<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> i Cd<sup>+2</sup> [76]. Inhibitory proteaz serynowych (DFP i Pms-F) oraz tiolowych (jodoacetamid, maleimid) tylko

w nieznacznym stopniu hamują aktywność tego enzymu. Fizjologiczna rola PGP II związana jest z inaktywacją TRH oraz z sekrecją prolaktyny [50, 73].

#### 4.4. PEPTYDAZA ACYLOAMINOACYLOWA

Peptydaza acyloaminoacylowa (AcAP, EC 3.4.19.1) znana jest w literaturze jako enzym uwalniający formylometioninę lub aminopeptydaza N-acetyloalaninowa [36]. Głównym źródłem tego enzymu jest cytozol wątroby i jelita szczura, łożyska i erytrocytów człowieka [27, 36, 64]. AcAP występuje też w śledzionie, płucach, retikulocytach i soczewce oka [36, 54].

Peptydaza acyloaminoacylowa ma masę cząsteczkową 290000–390000 daltonów w zależności od pochodzenia narządowego enzymu i wykazuje budowę podjednostkową [36, 64]. Występują dwa izoenzymy AcAP różniące się punktem izoelektrycznym.

Peptydaza acyloaminoacylowa uwalnia acyloaminokwasy od N-acylowanych peptydów [27, 36]. Nie hydrolizuje natomiast N-acylowanych aminokwasów i peptydów pyroglutamylowych. Najwyższe powinowactwo wykazuje do Ac-Met-Thr, Ac-Met-Ala, Ac-Ala-Tyr, Ac-Ser-Tyr, Ac-Ser-Thr i Ac-Leu-Ala-Gly. Inne N-acylowe peptydy hydrolizowane są z mniejszą szybkością.

Do oznaczania aktywności AcAP stosuje się N-Ac-Met-Thr, N-fMet-Leu, N-Ac-Ala-NPh-NO<sub>2</sub> i N-fMet-NNap [27, 36]. Optimum aktywności znajduje się w pH 7,5–8,0.

Aktywność peptydazy acyloaminoacylowej hamuje DFP, pCMB i Hg<sup>+2</sup> [36]. Nieznacznym efektem inhibicyjnym wywierają: jodoocetan, jodoacetamid i Pms-F. Natomiast EDTA, leupeptyna, pepstatyna, bestatyna i amastatyna nie hamują aktywności tego enzymu.

Rola fizjologiczna AcAP nie jest dotychczas znana. Z uwagi na to, że 80–90% rozpuszczalnych białek komórek eukariotycznych jest N-acetylowana prawdopodobny jest udział tego enzymu w ich katabolizmie [36]. Występowanie tego enzymu w mięśniówce jelita mogłoby powstrzymać absorpcję bioaktywnych f-Met peptydów produkowanych przez bakterie żyjące w symbiozie w jelicie [64].

#### 5.5. PEPTYDAZA β-ASPARTYLOWA

Peptydaza β-aspartylowa (β-AP, EC 3.4.13.10) wykazuje wysoką aktywność w wątrobie i nerkach szczura [36]. Występuje też w niewielkich ilościach w mózgu, płucach, mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym.

β-AP hydrolizuje β-aspartyłowe peptydy, takie jak: β-Asp-Gly, β-Asp-Gly-Gly, β-Asp-Met, β-Asp-Leu, β-Asp-Ser, β-Asp-Gly-Ala i β-Asp-Ala. Substratem służącym do oznaczania aktywności tego enzymu jest β-Asp-Gly [36]. β-AP wykazuje najwyższą aktywność w buforze fosforanowym o pH 7,5–8,0. Związki tiolowe nieznacznie aktywują ten enzym. Inhibitorem β-AP jest pCMB. Jodoacetamid i EDTA pozostają bez wpływu na aktywność tego enzymu. β-AP jest stabilna podczas zamrażania i odmrażania w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,5. Jest natomiast niestabilna w wodzie i buforze Tris-HCl.

### LITERATURA

- [1] ABRAMIC M, ZUBAVOVIC M, VITALE L. Dipeptidyl peptidase III from human erythrocytes. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1988; **369**: 29–38
- [2] AGRAWAL Y, VANHA-PERTTULA T. Gamma-glutamyl transpeptidase in rat epididymis: effects of castration, hemicastration and efferent duct ligation. *Int J Androl* 1989; **12**: 321–328.



- [3] AHMADS, WANGL, WARD PE. Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **260**: 1257–1261.
- [4] ANDERSEN KJ, MCDONALD JK. Lysosomal heterogeneity of dipeptidyl peptidase II active on collagen-related peptides. *Renal Physiol Biochem* 1989; **12**: 32–40.
- [5] ANSORGE S, SCHON E, KUMZ D. Membrane-bound peptidases of lymphocytes: functional implication. *Biomed Biochim Acta* 1991; **50**: 799–807.
- [6] ARATAKE Y, KOTANI T, TAMURA K, ARAKI Y, KURIBAYASHI T, KONOE K, OHTAKI S. Dipeptidyl aminopeptidase IV staining of cytologic preparations to distinguish benign from malignant thyroid diseases. *Am J Clin Pathol* 1991; **96**: 306–310.
- [7] AVASARALA JR, NAVI M, SASAKI S, UEDA M, SAGA S, SUZUKI T, YANAGITA N, NAGATSU T. Distribution of peptidases in cultured cells from middle ear mucosa: prolyl endopeptidase is localized in fibroblast and dipeptidyl peptidase IV and II in epithelial cells. *Biochem Med Metab Biol* 1991; **45**: 355–358.
- [8] BLACKMAN DL, WATSON AJ, MONTROSE MH. Assay of apical membrane enzymes based on fluorogenic substrates. *Anal Biochem* 1992; **200**: 352–358.
- [9] BURGE V, MEINFERME F, WATTAUX R. Transient membrane association of the precursors of cathepsin C during their transfer into lysosomes. *Biochem J* 1991; **275**: 797–800.
- [10] DAVIS MH. Hormonal regulation of dipeptidyl-aminopeptidase I activity in cultured human fibroblasts. *Archiv Biochem Biophys* 1987; **254**: 498–503.
- [11] DEGANDARIAS JM, CASSIS O, ECHEVARRIA E, YRAZUSTA J, CASSIS L. Pyroglutamyl(correction of pyroglutamyl)-peptidase I activity in the cortex of the cat brain during development. *Int J Dev Biol* 1992; **36**: 335–337.
- [12] DEPASQUALE A, GINALDIL, LIMONCELLI P, QUALINO D. Dipeptidyl aminopeptidase IV cytochemistry in circulating lymphocytes from HIV-1-seropositive subjects. *Acta Haematol* 1989; **81**: 19–21.
- [13] ECHETABU ZO, MOSS DW. Multiple forms of human  $\gamma$ -glutamyltransferase. Preparation and characterization of different molecular weight fractions. *Enzyme* 1982; **27**: 1–8.
- [14] ELMORE MA, GRIFFITHS EC, OCONNOR B, OCUINN G. Further characterization of the substrate specificity of a TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides* 1990; **15**: 31–36.
- [15] FROHMAN LA, DOWNS TR, HEIMER EP, FELIX AM. Dipeptidylpeptidase IV and trypsin-like enzymatic degradation of human growth hormone-releasing hormone in plasma. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1533–1540.
- [16] FUSE Y, POLK DH, LAM RW, REWICZKY AL, FISHER DA. Distribution and ontogeny of thyrotropin-releasing hormone degrading enzymes in rats. *Am J Physiol* 1990; **259**: 787–791.
- [17] GORVEL JP, FERRERO A, CHARMBRAND L, ROGAL A, BONICEL J, MAROUX S. Expression of sucrase-isomaltase and dipeptidylpeptidase IV in human small intestine and colon. *Gastroenterology* 1991; **101**: 618–625.
- [18] GRDISA M, VITALEL. Types and localization of aminopeptidases in different human blood cells. *Int J Biochem* 1991; **23**: 339–345.
- [19] HAGIHARA M, MIHARA R, TOGARI A, NAGATSU T. Dipeptidyl-aminopeptidase II in human cerebrospinal fluid: changes in patients with Parkinson's disease. *Biochem Med Metabol Biol* 1987; **37**: 360–365.
- [20] HENDRIKS D, DEMEESTER I, UMIEL T, VANHOOF G, VANSANDE M, SCHARPE S, YARON A. Aminopeptidases P and dipeptidyl peptidase IV activity in human leukocytes and in stimulated lymphocytes. *Clin Chim Acta* 1991; **196**: 87–96.
- [21] HEYMANN E, MENTLEIN R, NAUSCH I, ERLANSON-ALBBERTSSON C, YOSHIOMOT T, FELLER AC. Processing of pro-colipase and trypsinogen by pancreatic dipeptidyl peptidase IV. *Biomed Biochim Acta* 1986; **45**: 575–584.
- [22] HUI KS. A novel dipeptidyl aminopeptidase in rat brain membranes. *J Biol Chem* 1988; **263**: 6613–6618.
- [23] ICHINOSE M, MAEDA R, FUKUDA T, WATANABE B, ISHIMARU T, IZUMI M, MIYAKES, TAKAMORI M. Partial purification and characterization of glycylprolyl dipeptidyl aminopeptidase in porcine pancreas. *Biochim Biophys Acta* 1982; **719**: 527–531.
- [24] IMAIK, HAMA T, KATO T. Purification and properties of rat brain dipeptidyl aminopeptidase. *J Biochem* 1983; **93**: 431–437.
- [25] ISHIDOH K, MUNO D, SATO N, KOMINAMI E. Molecular cloning of cDNA for rat cathepsin C. Cathepsin C, a cysteine proteinase with an extremely long propeptide. *J Biol Chem* 1991; **266**: 16312–16317.
- [26] JASCUR T, MATTER K, HAURI HP. Oligomerization and intracellular protein transport: dimerization of intestinal dipeptidylpeptidase IV occurs in the Golgi apparatus. *Biochemistry* 1991; **30**: 1908–1915.
- [27] JONES WM, MANNING JM. Substrate specificity of an acyloaminopeptidase that catalyzes the cleavage of the blocked aminotermini of peptides. *Biochim Biophys Acta* 1988; **953**: 357–360.

- [28] KAMORI M, HAGIHARA M, NAGATSU T, IWATA H, MIURA T. Activities of dipeptidyl peptidase II, dipeptidyl peptidase IV, prolyl endopeptidase and collagenase-like peptidase in synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biochem Med Metab Biol* 1991; **45**: 154–160.
- [29] KOMINAMI E, ISHIDO K, MUNO D. The primary structure and tissue distribution of cathepsin C. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1992; **373**: 367–373.
- [30] KYOUDEN T, HIMENO M, ISHIKAWA T, OHSUMI Y, KATO K. Purification and characterization of dipeptidyl peptidase IV in rat liver lysosomal membranes. *J Biochem* 1992; **111**: 770–777.
- [31] KOTANI T, ARATAKE Y, OGATA Y, UMELI K, ARAKI Y, HIRAI K, KUMA K, OHTAKI S. Expression of dipeptidyl aminopeptidase IV activity in thyroid carcinoma. *Cancer Lett* 1991; **57**: 203–208.
- [32] LAMPELO S, LALU K, VANHA-PERTTULA T. Biochemical studies on dipeptidyl peptidase I to IV of the human placenta. *Placenta* 1987; **8**: 389–398.
- [33] LYNN KR. The isolation and some properties of dipeptidyl peptidase II and III from porci spleen. *Int J Biochem* 1991; **23**: 47–50.
- [34] MANTLE D. Characterization of dipeptidyl and tripeptidyl aminopeptidases in human kidney soluble fraction. *Clin Chim Acta* 1991; **d196**: 135–142.
- [35] MANTLE D, PERRY EK. Comparison of aminopeptidase, dipeptidyl aminopeptidase and tripeptidyl aminopeptidase activities in brain tissue from normal and Alzheimer's disease cases. *J Neurol Sci* 1990; **98**: 13–20.
- [36] McDONALD JK, BARRETT AJ. Mammalian proteases: a glossary and bibliography. vol. 2. Exopeptidases. Academic Press 1986.
- [37] McDONALD JK, HOISINGTON AR, EISENHAEUER DA. Partial purification and characterization of an ovarian tripeptidyl peptidase: a lysosomal exopeptidase that sequentially releases collagen-related (Gly-Pro-X) triplets. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; **126**: 63–71.
- [38] McDONALD JK, SCHWABE C. Intracellular exopeptidases. [w] Proteinases in mammalian cells and tissues. Barrett AJ [red.]. North-Holland Publ Co Amsterdam 1977: 311–391.
- [39] McGUIRE MJ, LIPSKY PE, THIELE DL. Purification and characterization of dipeptidyl peptidase I from human spleen. *Arch Biochem Biophys* 1992; **295**: 280–288.
- [40] MENDEZ M, CRUZ C, JOSEPH-BRAVO P, WILK S, CHARLI JL. Evaluation of the role of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH in brain. *Neuropeptides* 1990; **17**: 55–62.
- [41] MENTLEIN R, STRUCKHOFF G. Purification of two dipeptidyl aminopeptidases II from rat brain and their action on proline-containing neuropeptides. *J Neurochem* 1989; **52**: 1284–1293.
- [42] MENTLEIN R, VON KOLSZYŃKI M, SPRANGE R, LUCIUS R. Proline-specific proteases in cultivated neuronal and glial cells. *Brain Res* 1990; **527**: 159–162.
- [43] MISUMI Y, HAYASHI Y, ARAKAWA F, IKEHARA Y. Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1131**: 333–336.
- [44] MOSS J, BUNDGAARD H. Kinetics and pattern of degradation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in human plasma. *Pharm Res* 1990; **7**: 751–755.
- [45] NIKAWA T, TOWATARI T, KATUNMA N. Purification and characterization of cathepsin J from rat liver. *Eur J Biochem* 1992; **204**: 381–393.
- [46] NILIUS R, STUHECK K, DIETRICH R. Changes of dipeptidylpeptidase IV as a membrane marker of lymphocytes in acute and chronic liver diseases – biochemical and cytochemical investigations. *Physiol Res* 1991; **40**: 95–102.
- [47] OGATA S, MISUMI Y, IKEHARA Y. Primary structure of rat liver dipeptidylpeptidase IV deduced from its cDNA and identification of the NH<sub>2</sub>-terminal signal sequence as the membrane-anchoring domain. *J Biol Chem* 1989; **264**: 3596–3601.
- [48] PALMIERI FE, WARD PE. Dipeptidyl(amino)peptidase IV and post proline cleaving enzyme in cultured endothelial and smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol* 1989; **247A**: 305–311.
- [49] PIAZZA GA, CALLAHAN HM, MOWERY J, HIXON DC. Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix. *Biochem J* 1989; **262**: 327–334.
- [50] PONCE G, CHARLI JL, PASTEN JA, ACEVES C, JOSEPH-BRAVO P. Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 1988; **48**: 211–213.
- [51] RAHFELD J, SCHUTKOWSKI M, FAUST J, NEUBERT K, BARTH A, HEINS J. Extended investigation of the substrate specificity of dipeptidyl peptidase IV from pig kidney. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1991; **372**: 313–318.
- [52] RAMBABU K, ANSARI AA, SHAAFI IA, CHELVAM AP, ZIN MM.  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in synovial fluid, serum, and urine of patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Med Metab Biol* 1990; **43**: 183–192.
- [53] SALERS P, ONAFIK LH, GIRAUD P, MALTESE JY, DOUTOUR A, OLIVER C. Ontogeny of prolyl endopeptidase, pyroglutamyl peptidase I, TRH and its metabolites in rat pancreas. *Am J Physiol* 1992; **262**: E845–850.



- [54] SCHARMA KK, ORWETH BJ. Description of an acylpeptide hydrolase from lens. *Exp Eye Res* 1992; **54**: 1005–1010.
- [55] SCHARPE SL, VANHOOF GC, DeMEESTER JA, HENDRIKS DF, SANDE ME, MUYLLI LM, YARON A. Exopeptidases in human platelets: an indication for proteolytic modulation of biologically active peptides. *Clin Chim Acta* 1991; **195**: 125–132.
- [56] SCHLAGENHAUFF B, KLESSEN C, TEICHMANN-DORRS, BREUNINGER H, RASSNE G. Demonstration of proteases in basal cell carcinomas. A histochemical study using amino acid-4-methoxy-2-naphthylamides as chromogenic substrates. *Cancer* 1992; **70**: 1133–1140.
- [57] SCHON E, BORN I, DEMUTH HU, FAUST J, NEUBERT K, STEINMETZER T, BARTH A, ANGSORGE S. Dipeptidyl peptidase IV in the immune system. Effect of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and proliferation of human lymphocytes. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1991; **372**: 305–311.
- [58] SCHON E, DEMUTH HU, EICHMANN E, HORST HJ, KORNER IJ, KOPP J, MATTERN T, NEUBERT K, NOLL F, ULMER AJ. Dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocytes. Impaired induction of interleukin 2 and gamma interferon due to specific inhibition of dipeptidyl peptidase IV. *Scand J Immunol* 1989; **29**: 127–132.
- [59] SEDO A, KREPELA E, KASAFIREK E. A kinetic fluorometric assay of dipeptidyl peptidase IV in viable human blood mononuclear cells. *Biochimie* 1989; **71**: 757–761.
- [60] SEDO A, KREPELA E, KASAFIREK E. Dipeptidyl peptidase IV, prolyl endopeptidase and cathepsin B activities in primary human lung tumors and lung parenchyma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; **117**: 249–253.
- [61] SEDO A, KREPELA E, KASAFIREK E, KRAML J, KADLECOVA L. Dipeptidyl peptidase IV in the human lung and spinocellular lung cancer. *Physiol Res* 1991; **40**: 359–362.
- [62] SEIDL R, MANN K, SCHAFER W. N-terminal amino-acid sequence of pig kidney dipeptidyl peptidase IV solubilized by autolysis. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1991; **372**: 213–214.
- [63] SEIDL R, SCHAEFER W. Preparative purification of dipeptidyl peptidase IV. *Preparative Biochem* 1991; **21**: 141–50.
- [64] SHERRIFF RM, BROOM MF, CHADWICK VS. Isolation and purification of N-formylmethionine aminopeptidase from rat intestine. *Biochim Biophys Acta* 1992; **119**: 275–280.
- [65] SHIMAMORI Y, WATANABE Y, FUJIMOTO Y. Human placental dipeptidyl aminopeptidase III: hydrolysis of enkefalins and its stimulation by cobaltous ion. *Biochem Med Metab Biol* 1988; **40**: 305–310.
- [66] STANCIKOVA M, LUKAC J, MICKOVA D, ROVENSKY J. Dipeptidylpeptidaza IV v sere a v synovialnom vypotku pri reumatických chorobach. *Rheumatologia* 1990; **4**: 235–239.
- [67] SVOBODA KS, CURRIE BL. Evaluation of some substrates and potential inhibitors of tissue pyroglutamyl aminopeptidase I. *Neuropeptides* 1992; **21**: 85–92.
- [68] TOMKINSON B. Nukleotide sequence of cDNA converting the N-terminus of human tripeptidyl peptidase II. *Biomed Biochim Acta* 1991; **50**: 727–729.
- [69] TOMKINSON B, ZETTERQUIST O. Immunological cross-reactivity between human tripeptidyl peptidase II and fibronectin. *Biochem J* 1990; **267**: 149–154.
- [70] VAHNA-PERTTULA T. Dipeptidyl peptidase III and alanyl aminopeptidase in the human seminal plasma: origin and biochemical properties. *Clin Chim Acta* 1988; **177**: 179–195.
- [71] VANHOOF G, DEMEESTER I, VANSANDE M, SCHARPE S, YARON A. Distribution of proline-specific aminopeptidases in human tissues and body fluid. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; **30**: 333–338.
- [72] VARGAS MA, HERRERA J, URIBE RM, CHARLI JL, JOSEPH-BRAVO P. Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohypophysis and pancreas. *Brain Res Dev Brain Res* 1992; **66**: 251–256.
- [73] WILK S, SUEN CS, WILK EK. Occurrence of pyroglutamyl peptidase II a specific TRH degrading enzyme in rabbit retinal membranes and in human retinoblastoma cells. *Neuropeptides* 1988; **12**: 43–47.
- [74] WOLF GB, SCHERBERIC JE, FISCHER P, SCHOEPPE W. Isolation and characterization of dipeptidyl aminopeptidase IV from human kidney cortex. *Clin Chim Acta* 1989; **179**: 61–71.
- [75] WOLF G, SCHERBERIC JE, NOWACK A, STEIN O, SCHOEPPE W. Urinary excretion of dipeptidyl aminopeptidase IV in patients with renal diseases. *Clin Nephrol* 1990; **33**: 136–142.
- [76] YAMADA M, MORI M. Thyrotropin-releasing human serum is classified as type II of pyroglutamyl aminopeptidase: influence of thyroid status. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990; **194**: 346–351.
- [77] YAMASHITA K, TACHIBANA Y, MATSUDA Y, KATUNUMA N, KOCHIBEN, KOBATA A. Comparative studies of the sugar chains of aminopeptidase N and dipeptidylpeptidase IV purified from rat kidney brush-border membrane. *Biochemistry* 1988; **27**: 5565–5573.

Otrzymano 10.04.1993

Przyjęto 10.11.1993 r.

Adres autora: 15-230 Białystok, ul. Mickiewicza 3.

# METODA MIKROANALIZY RENTGENOWSKIEJ W BADANIACH BIOLOGICZNYCH

## X-RAY MICROANALYSIS METHODS IN BIOLOGICAL INVESTIGATION

Rafał BUTOWT, Elżbieta BEDNARSKA

Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet im. M. Kopernika,  
Toruń

*Streszczenie.* Omówiono podstawy teoretyczne i możliwości wykorzystania mikroanalizy rentgenowskiej w materiale biologicznym (głównie na poziomie komórkowo-tkankowym). Scharakteryzowano dwa systemy mikroanalizy: system energo-dyspersyjny (EDS) i system falowo-dyspersyjny (WDS). Wskazano na podstawowe zasady prawidłowej interpretacji wyników. Podano przykłady zastosowania metody.

*Słowa kluczowe.* promieniowanie rentgenowskie, spektrometria energo-dyspersyjna, spektrometria falowo-dyspersyjna, mikroanaliza jakościowa, mikroanaliza ilościowa, przygotowanie próbek do mikroanalizy, artefakty widmowe, zastosowanie mikroanalizy w biologii.

*Summary.* Theoretical basis and practical use of X-ray microanalysis in biological studies on tissue-cellular level are discussed. Two microanalysis systems were compared: Energy Dispersive Spectrometry (EDS) and Wavelength Dispersive Spectrometry (WDS). Fundamental rules of adequate interpretation of the results are described. Examples of application of this method are given.

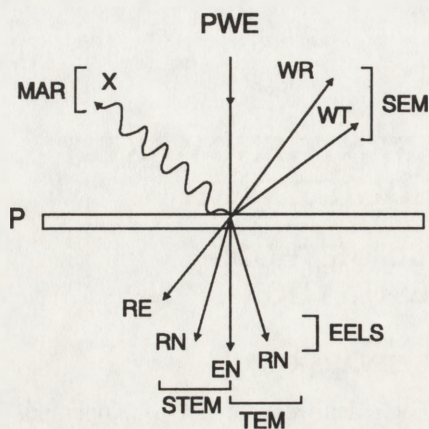
*Key words.* X-ray, Energy Dispersive Spectrometry, Wavelength Dispersive Spectrometry, Qualitative Microanalysis, Quantitative Microanalysis, Specimen Preparation for Microanalysis, Spectral Artefacts, Application of Microanalysis in Biology.

## WSTĘP

Mikroanaliza rentgenowska (MAR) jest nowoczesną metodą badania składu pierwiastkowego próbki. Znalazła ona szerokie zastosowanie w takich dziedzinach wiedzy, jak: geologia, metalurgia, fizyka, a także biologia [26, 36, 39, 43] i medycyna [17, 33, 26]. Metoda ta umożliwia identyfikację pierwiastków w próbce materiału niezależnie od stopnia ich utlenienia oraz wytwarzanych przez nie połączeń chemicznych. Nie daje też możliwości rozróżnie-



nienia poszczególnych izotopów danego pierwiastka. W przeciwieństwie do niektórych innych metod analitycznych stosowanych w biologii, wykorzystujących np. spalenie próbki lub jej homogenizację, MAR nie wymaga zniszczenia struktury badanego materiału. Dzięki temu pozwala na odniesienie uzyskanego wyniku do konkretnego obszaru w danej próbce (organie, tkance, komórce). Bezwzględna czułość metody wynosi co najmniej  $10^{-15}$  g, natomiast jej próg wykrywalności jest rzędu 10–1000 ppm. Obecnie metodą tą można analizować pierwiastki o liczbie atomowej  $Z > 3$  do  $Z < 93$  [23]. Oprócz analiz jakościowych możliwe jest też, przy zastosowaniu odpowiednich standardów, wykonywanie pomiarów ilościowych.



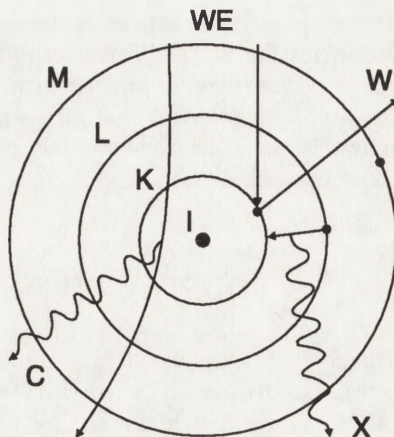
Rys. 1 Schemat podstawowych interakcji pomiędzy pierwotną wiązką elektronową a wybranym obszarem próbki: zaznaczono zjawiska fizyczne odpowiadające za powstawanie obrazu w mikroskopie skaningowym (SEM), transmisyjnym (TEM) i transmisyjno-skaningowym (STEM) (wg J. Meek – zmienił [22]): P – próbka; PWE – pierwotna wiązka elektronowa; EN – elektrony nierozproszone; RN – elektrony rozproszone nieelastycznie; RE – elektrony rozproszone elastycznie; WR – elektrony rozproszone wstecznie; WT – elektrony wtórne; X – promieniowanie rtg; MAR – mikroanaliza rentgenowska; EELS – analiza strat energii elektronów (metoda analizy składu chemicznego próbki alternatywna w stosunku do MAR)

MAR jest w zasadzie połączeniem techniki mikroskopii elektronowej i detekcji promieniowania rtg, co jako pierwsi zaproponowali Castaing i Guinier [5]. Wykorzystali oni fakt, że promieniowanie rtg powstaje w każdym mikroskopie elektronowym jako jeden z wielu efektów oddziaływania wiązki elektronowej z badaną próbką (rys. 1). Problem polega zatem na zastosowaniu odpowiedniego detektora umożliwiającego rejestrację emitowanego promieniowania rtg. Obecnie używane detektory mogą współpracować z mikroskopem transmisyjnym (TEM) i mikroskopem skaningowym (SEM). Może to być także SEM pracujący w trybie skaningowo-transmisyjnym (STEM). Schemat powiązania MAR z podstawowymi typami mikroskopu elektronowego przedstawia rysunek 1.

1. FIZYCZNE PODSTAWY METODY

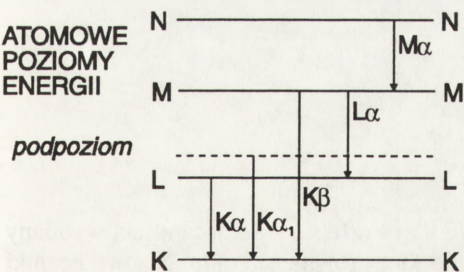
Promieniowanie rtg jest częścią widma elektromagnetycznego o energii zawartej w przybliżeniu w przedziale od 0,1 do 100 keV, co odpowiada długości fali od 10 do 0,01 nm. Fotony tego promieniowania są generowane w trakcie oddziaływania pierwotnej wiązki elektronowej, tzn. wiązki emitowanej przez katodę mikroskopu, z próbką badanego materiału [6, 32, 47]. Każda próbka jest mieszaniną określonej liczby atomów różnych pierwiastków, które z fizycznego punktu widzenia różnią się między sobą ładunkiem jądra oraz liczbą powłok i liczbą krążących po nich elektronów. Część elektronów wiązki pierwotnej oddziałując w

wyniku zderzeń z elektronami wewnętrznymi powłok atomu próbki, tzn. powłok K, L, względnie M, powoduje wyrzucenie ich na zewnątrz atomu. Prowadzi to do jonizacji atomu. Każda powłoka atomu danego pierwiastka ma charakterystyczną dla siebie krytyczną energię jonizacji. Po wybiciu elektronu z jednej z powłok wewnętrznych atomu powstaje po nim luka, którą uzupełniają elektrony z powłok bardziej zewnętrznych. Odbywa się to zwykle w sposób stopniowy, tzn. lukę w powłoce K uzupełnia elektron z powłoki L, a na jego miejsce w powłoce L wchodzi elektron z powłoki M itd. Atom uzyskuje w ten sposób korzystniejszą, niższą wartość energii potencjalnej. Elektron przekazując z powłoki zewnętrznej do powłoki bliższej jądra, wypromieniowuje nadmiar energii w postaci charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego (ang. *characteristic radiation*, rys. 2).



Rys. 2. Schemat generowania promieniowania rtg: WE – pierwotna wiązka elektronowa, W – wyrzuty elektron, I – jądro atomowe, K, L, M – kolejne powłoki atomu, X – charakterystyczne promieniowanie rtg, C – promieniowanie ciągłe

2). Przejścia z powłoki L do powłoki K określa się jako linie charakterystyczne  $K\alpha$ , z powłoki M do powłoki K jako linie  $K\beta$ , a np. z powłoki M do powłoki L jako  $L\alpha$  (rys. 3). Atomy różnych pierwiastków charakteryzują się odmiennymi wartościami energii dla poszczególnych powłok. Konsekwencją tego zjawiska jest fakt, że atomy poszczególnych pierwiastków emitują promieniowanie rtg o różnej energii i odmiennej długości fali. Stanowi to podstawę analizy poszczególnych pierwiastków w badanej próbce. Ponadto zgodnie z zakazem Pauliego, który mówi, że w atomie nie ma dwóch elektronów o tej samej wartości energii, również w obrębie powłok istnieją podpoziomy o różnej wartości energii znajdujących się na nich elektronów. Na tej podstawie można mówić np. o liniach  $K\alpha_1$  i  $K\alpha_2$ , które różnią się



Rys. 3. Poszczególne linie charakterystycznego promieniowania rtg są efektem przejść elektronowych pomiędzy różnymi wewnętrznymi poziomami energetycznymi w atomie: K, L, M, N – kolejne powłoki atomu

nieznacznie charakterystycznymi dla siebie energiami promieniowania rtg. Oznacza to, że przejście elektronu z powłoki L do powłoki K nastąpiło z różnych podpoziomów powłoki L (rys. 3). Obecnie używane detektory promieniowania rentgenowskiego mają zdolność rozróżniania niektórych z tych linii. Z przedstawionego powyżej rozumowania wynika, że im więcej dany atom ma elektronów, tzn. im cechuje go większa liczba Z, tym większą liczbę linii charakterystycznych można dla niego stwierdzić. Spośród tych linii najczęściej wykorzystywane są linie  $K\alpha$ , gdyż powstanie ich jest najbardziej prawdopodobne. Pojawiają się one jako pierwsze, gdy stężenie badanego pierwiastka jest bliskie granicy wykrywalności.

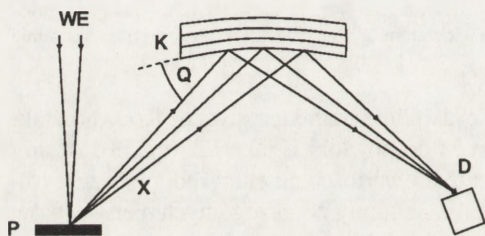


Oprócz promieniowania charakterystycznego pojawia się również tzw. promieniowanie ciągłe, określane niekiedy mianem promieniowania hamowania i stanowiące tło widma rentgenowskiego (ang. *continuum*, niem. *Bremstrahlung*). Powstaje ono, gdy pierwotne elektrony penetrując próbkę wolno tracą energię w wyniku opadania w polu magnetycznym jąder atomowych (rys. 2). Intensywność tego promieniowania jest odzwierciedleniem średniej masy atomowej próbki.

## 2. PODSTAWOWE SYSTEMY MIKROANALIZY

Istnieją dwa podstawowe systemy MAR [6, 23, 47]: spektrometria energo-dyversyjna (ang. *Energy Dispersive Spectrometry*) oraz spektrometria falowo-dyversyjna (ang. *Wavelength Dispersive Spectrometry*). Obydwa mogą współpracować zarówno z TEM, jak i SEM.

W systemie falowo-dyversyjnym mierzy się intensywność promieniowania rtg o wybranej długości fali (rys. 4), co pozwala na analizowanie w danej chwili obecności jednego pierwiastka w badanej próbce.



Rys. 4. Schemat detekcji promieniowania rtg w systemie falowo-dyversyjnym (WDS) [6]: WE – pierwotna wiązka elektronowa, P – próbka, K – kryształ, D – detektor, X – fotony promieniowania rtg, Q – kąt ugięcia

Możliwe jest to dzięki zastosowaniu odpowiednich kryształów analizujących, znajdujących się na drodze pomiędzy próbką a detektorem. Odległość międzypłaszczyznowa w tych kryształach jest tak dobrana, że umożliwia interferencję promieniowania rtg tylko o określonej długości fali (lub całkowitej krotności tej długości). Określa to warunek Bragga:

$$2d \sin Q_n = nL$$

gdzie:

$L$  – długość fali promieniowania X,

$n$  – liczba całkowita,

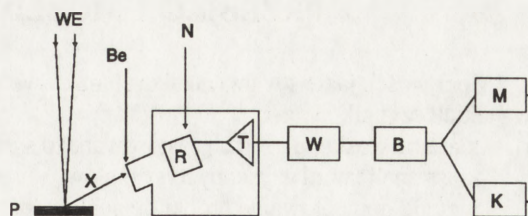
$d$  – odległość międzypłaszczyznowa w kryształach,

$Q_n$  – kąt ugięcia.

Wynika stąd, że zmiana analizowanego pierwiastka wiąże się z koniecznością wymiany kryształu analizującego. W systemie WDS jako detektory stosuje się m.in. gazowe liczniki proporcjonalne, w których wykorzystuje się efekt jonizacji cząsteczek gazu pod wpływem promieniowania rtg. Detektory falowo-dyversyjne osiągają energetyczne zdolności rozdzielcze rzędu 10–20 eV.

System energo-dyversyjny (EDS) umożliwia rejestrację promieniowania rtg o energii od 0 keV do wartości napięcia przyspieszającego stosowanego w danym typie mikroskopu [6, 44]. Stwarza to możliwość jednoczesnego analizowania większej liczby różnych pierwiastków. W Polsce najczęściej stosowane są systemy EDS analizujące pierwiastki o liczbie

atomowej  $Z > 10$ . W systemie energo-dyspersyjnym fotony promieniowania rtg trafiają do detektora bez pośrednictwa kryształu. Przechodzą one najpierw przez cienkie okienko z berylu, a następnie padają na krzemowo-litowy detektor (rys. 5). Detektor ten jest półprzewodnikiem typu *p*, stąd padające fotony powodują powstanie w nim par luka-elektron, których liczba jest proporcjonalna do energii tych fotonów. Następnie sygnał taki jest zamieniany na impulsy napięciowe i odpowiednio wzmacniany. Po wyjściu z detektora ulega on w procesorze konwersji



Rys. 5. Schemat budowy systemu energo-dyspersyjnego (EDS): WE – pierwotna wiązka elektronowa, P – próbka, X – fotony promieniowania rtg, Be – okienko berylowe, R – detektor, N – cieki azot, T – tranzystor, W – wzmacniacz, B – przetwornik analogowo-cyfrowy, M – monitor, K – komputer

na sygnał cyfrowy, który może już być przesłany do komputera i monitorowany. Detektory w systemie EDS mogą być również zbudowane z germanu. Obydwa stosowane systemy mają swoje wady i zalety (tab. 1). Podstawową wadą EDS jest mniejsza energetyczna zdolność rozdzielcza stosowanych detektorów. Wynosi ona ok. 130 eV ( $\approx 30$  eV) i zależy od długości fali oraz liczby zliczeń rejestrowanych w jednostce czasu. Ponadto zamykające detektor od

TABELA 1. Podstawowe wady i zalety systemu EDS i WDS

EDS	WDS
<p><b>Zalety:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• rejestruje cały zakres widma dla pierwiastków o liczbie <math>Z &gt; 10</math></li> <li>• brak części mechanicznych w detektorze</li> <li>• możliwość stosowania małych średnic wiązki elektronicznej</li> <li>• mniejsze uszkodzenie próbki biologicznej (gdyż jest stosowany mniejszy prąd wiązki)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• wysoka energetyczna zdolność rozdzielcza (rzędu 0,01 keV)</li> <li>• rejestruje widmo dla pierwiastków od <math>Z &gt; 3</math></li> <li>• większa dokładność w badaniach ilościowych (wynikająca z lepszego stosunku piku do tła)</li> <li>• lepsza czułość, zwłaszcza dla pierwiastków lekkich (rzędu 0,01% badanej masy)</li> </ul>
<p><b>Wady:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• niższa niż dla WDS energetyczna zdolność rozdzielcza</li> <li>• mniejsza dokładność w badaniach ilościowych</li> <li>• wymaga do pracy temp. ciekłego azotu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• elementy mechaniczne w detektorze mogą być przyczyną błędów</li> <li>• tylko jeden pierwiastek może być analizowany jednocześnie</li> <li>• pik i tło są mierzone oddzielnie</li> </ul>

strony próbki okienko berylowe pochłania część promieni rtg w zakresie długofalowym [6, 23, 48]. Wskazuje to na utrudnioną analizę pierwiastków lekkich. Najnowsze rozwiązania w tej dziedzinie charakteryzuje obecność okienka ultracienkiego lub w ogóle go brak (np. system EDS ISIS firmy Oxford Instruments). Podnosi to czułość analizy (zwłaszcza w zakresie pierwiastków lekkich) i umożliwia wykrywanie pierwiastków już od liczby atomowej  $Z > 3$ .



### 3. PRZEBIEG I MOŻLIWOŚCI ANALIZY

Możliwości, jakie stwarza analiza charakterystycznego promieniowania rtg, są wypadkową takich czynników, jak:

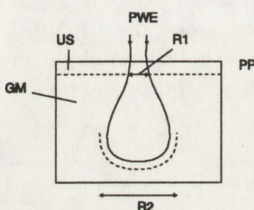
- klasa mikroskopu i rodzaj zastosowanego systemu mikroanalizy (WDS lub EDS),
- klasa analizatora uzyskanych sygnałów,
- metoda przygotowania próbki do analizy (patrz p. 6 i 7).

W przypadku stosowania systemu EDS energetyczna zdolność rozdzielcza detektora jest rzędu 130 eV, a dla detektorów WDS wynosi ok. 10–20 eV. Oznacza to, że dwa piki leżące w widmie w odległości np. 30 eV będą w systemie WDS tworzyły dwa oddzielne maksima, natomiast w systemie EDS będą się na siebie częściowo nakładać. Niektóre urządzenia (np. LINK 10000 AN) zaopatrzone są w program pozwalający na uniknięcie tej niedogodności. Umożliwia on usunięcie (tzw. "rozwiniecie") nakładającego się piku za pomocą metody najmniejszych kwadratów.

Korzystając z typowego systemu energo-dyspersyjnego można przeprowadzić analizę generowanego promieniowania rtg w dowolnym punkcie, fragmencie próbki lub wzdłuż dowolnie wybranej linii. Przy stosowaniu detektorów z cienkim okienkiem berylowym w obszarze tym wykrywane są pierwiastki o liczbie atomowej  $Z > 10$ . System EDS może być wyposażony w urządzenia pośrednie (ang. *interface*), które sterując wiązką mikroskopu, przekazują obraz mikroskopowy na ekran monitora. Pozwala to na precyzyjne wybranie analizowanego regionu.

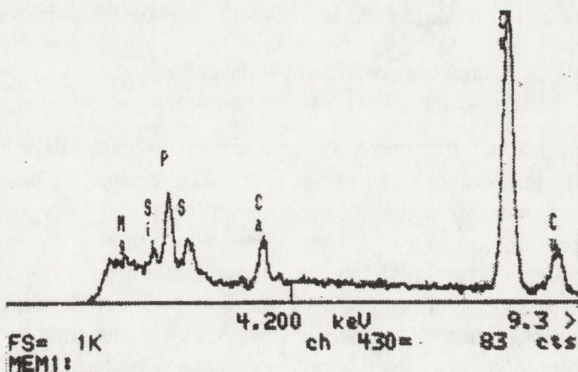
Analizę wybranego obszaru próbki można przeprowadzać generując promieniowanie rtg przy użyciu ruchomej lub nieruchomej wiązki elektronowej. Analizę z płaszczyzny lub z linii przeprowadza się skenującą wiązką ruchomą, natomiast analizę punktową wiązką nieruchomą. Punkt obejmuje analizowany obszar o średnicy zależnej od średnicy stosowanej wiązki elektronowej. W mikroskopie JEM 1200EX wynosi ona 10, 20 lub 40 nm. Wartości te odpowiadają zdolności rozdzielczej metody w ultracienkich skrawkach [26]. Rozdzielczość ta jest wysoka, ponieważ ultracienkie skrawki obejmują jedynie górną część przewidywanego obszaru generowania promieniowania rtg (rys. 6). Dla skrawków o grubości kilku mikrometrów i dla tzw. grudek materiału (ang. *bulk medium*) rozdzielczość jest stała i wynosi 1–10 mikrometrów. Wynika to z wielkości obszaru, w jakim jest w tym przypadku generowane promieniowanie rtg (rys. 6). Średnica tego obszaru, który przyjmuje kształt charakterystycznej "łezki", rośnie wraz ze wzrostem napięcia przyspieszającego i maleje ze wzrostem gęstości próbki. Odpowiada ona rozdzielczości, którą określa się mianem rozdzielczości przestrzennej (ang. *spatial resolution*). Nie jest ona oczywiście równoznaczna z rozdzielczością obrazu (ang. *image resolution*), która to jest cechą danego mikroskopu.

W przypadku zbyt słabego sygnału od poszukiwanego pierwiastka istnieje możliwość wydłużenia czasu trwania analizy. Podobny efekt można osiągnąć zbliżając lub oddalając detektor od próbki. Na rysunku 7 przedstawiono przykładowe widmo rentgenowskie z punktu



Rys. 6. Rozdzielczość MAR w cienkich skrawkach (R1) i w grudkach materiału (R2) jest uzależniona od objętości próbki, z jakiej generowane jest promieniowanie rtg: PWE – pierwotna wiązka elektronowa, PP – powierzchnia próbki, US – ultracienki skrawek, GM – grudka materiału

o średnicy 40 nm leżącego w obrębie pęcherzyka zawierającego wapń w ziarnie pyłkowym *Chlorophyllum elatum*. Czas rejestrowania sygnałów składających się na to widmo wynosił 200 s (tyle czasu był czynny procesor), jednak realny czas oczekiwania eksperymentatora na zakończenie pomiaru był nieco dłuższy ze względu na tzw. czas martwy (ang. *dead time*). W okresie tym zablokowane jest wejście do procesora z uwagi na zbyt dużą liczbę zliczeń przypadającą na jednostkę czasu. Czas, w którym procesor jest zablokowany na wejściu, jest doliczany do planowanego czasu analizy i suma tych czasów stanowi właśnie realny czas trwania pomiaru. Czas martwy wzrasta ze wzrostem



Rys. 7. Przykład punktowej mikroanalizy rtg pęcherzyków zawierających wapń występujących w ziarnie pyłkowym *Chlorophyllum elatum*, warunki analizy: średnica wiązki – 40 nm; czas pomiaru – 200 s; czas martwy – 10%; materiał umieszczono na miedzianych siatkach (dane niepublikowane)

gęstości próbki, nie może on jednak przekroczyć 30%, gdyż grozi to uszkodzeniem detektora.

W większości systemów EDS istnieje również możliwość badania obecności tylko jednego wybranego pierwiastka wzdłuż dowolnie wybranej linii lub w dowolnym fragmencie komórki. Taki tryb jest jakby symulacją pracy systemu WDS. Polega on na analizowaniu kolejnych punktów składających się na linię lub określony obszar i zatrzymywaniu w pamięci komputera tylko wskazanej wcześniej części widma. Tego rodzaju pomiary określa się mianem mapowania. Wiele udogodnień stwarza również samo oprogramowanie [12, 19,20]. Poszczególne widma można przedstawiać w dowolnej skali, wycinać pewne ich fragmenty, zwężać, poszerzać ich zasięg itd. Istnieje możliwość porównywania różnych widm na jednym wykresie. Opisu otrzymanych widm dokonuje się automatycznie lub ręcznie. Wszystkie dane zbiera się na dysku komputera lub na dyskietkach.

#### 4. ANALIZA ILOŚCIOWA

MAR jest wykorzystywana również jako metoda ilościowego oznaczania pierwiastków [6, 15, 16]. Pomiary ilościowe wykonuje się zazwyczaj porównując znaną zawartość pierwiastka w standardzie z jego zawartością w próbce. Sprowadza się to do porównania powierzchni odpowiednich pików (najczęściej  $K\alpha$ ) i skorzystania z wyrażenia:

$$C_{px} = I_{px}/I_{sx} \cdot C_{sx}$$

gdzie:

$I_{sx}$  – intensywność promieniowania dla pierwiastka  $x$  w standardzie,



$I_{px}$  – intensywność promieniowania dla pierwiastka  $x$  w próbce, (wyznacznikiem intensywności promieniowania jest stosunek powierzchni pików  $p_0$  do odpowiadającej mu powierzchni promieniowania tła),

$C_{sx}$  – stężenie pierwiastka  $x$  w standardzie,

$C_{px}$  – stężenie pierwiastka  $x$  w próbce.

Metodę tę opracował i wprowadził do badań T. Hall [15].

Jeżeli obiektem badania są grudki materiału lub bardzo grube skrawki, to nieodzowne jest wprowadzenie dodatkowego współczynnika korygującego. Wynika to z faktu, że część promieniowania rtg, przy dostatecznie długiej drodze biegu promieni w materiale, ulega absorpcji (efekt A) lub sama powoduje emisję dodatkowych fotonów X (efekt F). Efekty te wiążą się z rodzajem i ilością atomów innych pierwiastków, które razem z badanym tworzą próbkę (efekt Z). Obecnie oprócz klasycznej metody ZAF stosowanych jest kilka innych metod korygujących wyniki uzyskane w badaniach ilościowych [23]. Wynika to z faktu, że metoda ZAF obciążona jest zbyt dużym błędem dla pierwiastków o liczbie atomowej  $Z < 11$ . W odpowiednio cienkich skrawkach (o grubości nie przekraczającej 200 nm) efekty ZAF mogą być pominięte. W skrawkach takich nie następuje jeszcze rozszerzenie przestrzeni, w której generowane są fotony promieniowania rtg (por. rys. 6). W przypadku analizy ilościowej istotne jest też, jeśli podstawą obliczeń jest pik  $K\alpha$ , ażeby wartość energii pierwotnej wiązki elektronowej była wystarczająca do zjonizowania powłoki K większości atomów badanego pierwiastka. W tym celu należy zastosować odpowiednio duże napięcie przyspieszające w mikroskopie. Szacuje się, że musi być ono co najmniej 2,7 raza większe od krytycznej energii jonizacji powłoki K dla danego pierwiastka [6]. Jednym z najważniejszych problemów analizy ilościowej jest przygotowanie odpowiednich standardów [46]. Wszystkie komponenty standardów muszą być odpowiednio czyste. Zarówno przygotowanie, jak i analiza próbki i standardu powinny odbywać się w tych samych warunkach. Istotne jest również, ażeby warstwa napyłonego węgla lub metalu była jednakowej grubości dla standardu i próbki [18]. Eliminuje to błąd związany z niejednakową absorpcją promieniowania rtg przez warstwy o różnej grubości. Do przygotowywania standardów używa się m.in. prostych soli nieorganicznych lub ich mieszanin zatapiających w odpowiednio oczyszczonej żelatynie [6], dekstranie, żywicy [46] lub w spektralnie czystym graficie [20].

## 5. APARATUROWE ARTEFAKTY METODY

Można wyróżnić trzy podstawowe źródła powstających artefaktów. Wynikają one z:

- budowy mikroskopu,
- właściwości detektora i procesora,
- przygotowania próbki do analizy (patrz p. 7).

Artefakty związane z zastosowaną aparaturą są w zasadzie niezależne od eksperymentatora. Powodem ich są fizyczne właściwości materiału budującego detektor, nieprawidłowe przetwarzanie sygnału w detektorze oraz detekcja promieniowania dochodzącego spoza próbki. Źródłem dodatkowego promieniowania rtg (a więc dodatkowych pików) mogą być niektóre części mikroskopu [6, 48]. Odnosi się to przede wszystkim do mikroskopów starszych generacji. Promieniowanie takie powstaje np. w trakcie przechodzenia części elektronów przez materiał apertury w SEM. Kolejne zakłócenia w SEM powodują niektóre wstecznie rozproszone elektrony, które wchodzić przez okienko berylowe do detektora. Okienko

stanowi skuteczne zabezpieczenie przed nimi jedynie wtedy, gdy napięcie przyspieszające wiązki elektronowej nie przekracza 25 keV. Duży wpływ na wielkość promieniowania tła ma miejsce położenia komórki na siatce [42]. Wskazane jest analizowanie tych komórek, które są położone centralnie w oczkach siatki.

Jednym z podstawowych źródeł dodatkowych artefaktowych pików w systemie EDS jest detektor [6]. Szczególnie charakterystycznym zjawiskiem są tzw. krzemowe piki ucieczki (ang. *escape peak*). Powstają one na skutek tego, że wchodzące do detektora fotony promieniowania rtg mogą z pewnym prawdopodobieństwem przekazać część energii atomom budującym detektor. Dla detektorów półprzewodnikowych pierwiastkiem tworzącym detektor jest głównie krzem. Wywołuje to m.in. charakterystyczną dla tego pierwiastka emisję promieniowania rtg. W widmie pojawia się dodatkowy pik dla linii  $K\alpha$  Si w miejscu odpowiadającym energii 1,74 keV. Natomiast energia fotonów, które były przyczyną tej emisji, maleje o wartość 1,74 keV. Stąd np. pik dla fotonów o energii 6,40 keV (linia  $K\alpha$  żelaza) pojawi się dodatkowo w miejscu odpowiadającym energii 4,66 keV (rys. 8). Wartość ta odpowiada różnicy energii pomiędzy linią  $K\alpha$  Fe a linią  $K\alpha$  Si.

Oprócz powstawania krzemowych pików ucieczki w detektorach półprzewodnikowych zachodzi wiele innych niepożądanych procesów. Prowadzą one m.in. do zniekształcenia i sumowania pików (zwłaszcza w warunkach dużej ilości zliczeń w jednostce czasu [30]) oraz absorpcji części promieniowania rtg przez tzw. martwą część detektora [6]. Dokładniejsza analiza tych zjawisk wykracza poza ramy niniejszego opracowania.

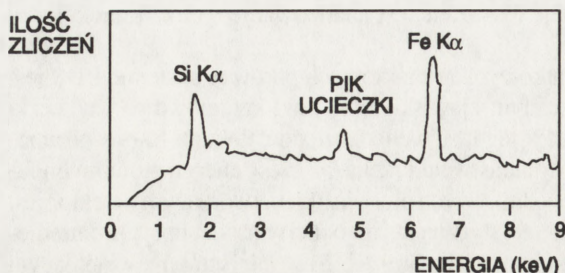
## 6. WYBÓR METODY I PRZEBIEG PRZYGOTOWANIA PRÓBKII DO ANALIZY

Wybór metody i procedura przygotowania próbki biologicznej do analizy zależą od celu badawczego, który należy zrealizować (rys. 9). Jeżeli celem jest analiza obecności jednego wybranego pierwiastka w dużych grudkach materiału, to korzystniejsze jest zastosowanie systemu WDS. W innych przypadkach stosuje się system EDS. Ponieważ MAR współpracuje zarówno ze (S)TEM, jak i z SEM, analizę składu pierwiastkowego próbki można wykonać na poziomie subkomórkowym oraz na poziomie tkanki lub organu. W pierwszym przypadku wykonuje się ultracienkie skrawki, które przygotowuje się podobnie jak w konwencjonalnej metodzie TEM. Badania fragmentów tkanki lub organu wymagają natomiast postępowania zgodnego z procedurą przygotowania materiału do SEM.

Badany materiał wymaga przede wszystkim utrwalenia i odwodnienia w taki sposób, aby przy możliwie wiernym zachowaniu struktury i składu chemicznego próbki wprowadzić do niej jak najmniej dodatkowych, egzogennych pierwiastków. Utrwalanie i odwadnianie próbki przeprowadza się metodami chemicznymi, fizycznymi i fizyko-chemicznymi [31]. Materiału przeznaczonego do TEM nie poddaje się, jeśli nie jest to konieczne, osmowaniu i kontrastowaniu. Techniki, których celem jest podniesienie jakości obrazu w TEM, są bowiem źródłem chemicznych zanieczyszczeń próbki [43].

Ogólny tok postępowania z próbką biologiczną ulega wielu modyfikacjom w zależności od rodzaju analizowanych pierwiastków (rys. 9) [39, 43, 55]. W przypadku, gdy obiektem analizy są metale ciężkie lub pierwiastki związane w postaci nierozpuszczalnych strąków, stosuje się zazwyczaj standardowe chemiczne metody utrwalenia i odwadniania (np. aldehyd





Rys. 8. Schemat pików uciekczki dla linii  $K\alpha$  żelaza jako przykład jednego z artefaktów widmowych powstających w systemie EDS: (Si  $K\alpha$  – 1,73 keV, Fe  $K\alpha$  – 6,40 keV, pik uciekczki – 4,66 keV)

skanych wyników. Najlepszym rozwiązaniem jest stosowanie siatek berylowych lub węglowo-nylonowych, gdyż nie są one źródłem sygnału w najczęściej spotykanych EDS [31]. Przed umieszczeniem w (S)TEM siatki napyła się cienką warstwą węgla o grubości do kilkudziesięciu nm [50]. Ta dodatkowa powłoka ochronna ma na celu odprowadzanie ładunków, które gromadzą się na powierzchni próbki w trakcie analizy. Próbkę można również napyłać warstwą metalu (np. glinu), lecz wówczas warstwa ta musi być znacznie cieńsza od warstwy węgla [18].

W przypadku, gdy obiektem analizy pierwiastków słabo dyfundujących jest fragment tkanki lub organu, badanie przeprowadza się w SEM. Do mikroskopu wprowadza się bądź skrawki o grubości rzędu kilku mikrometrów zatopione w żywicy, bądź grudki materiału przygotowane według klasycznej metody stosowanej w mikroskopii skaningowej. Po chemicznym utrwaleniu i odwodnieniu materiał suszy się w tzw. punkcie krytycznym [26]. Polega to na umieszczeniu próbki w takich warunkach ciśnienia i temperatury, w których ciecz przechodzi z fazy płynnej w gazową. Z uwagi na to, że ciśnienie i temperatura w punkcie krytycznym dla wody są niekorzystne dla próbek biologicznych i wynoszą odpowiednio 225,6 atm i 374°C, materiał należy odwodnić w sposób standardowy, a następnie przesyścić płynnym  $CO_2$ . Temperatura krytyczna dla  $CO_2$  wynosi tylko 31°C. Niewielkie jej podwyższenie powoduje sublimację  $CO_2$ . Po jego usunięciu materiał umieszcza się na węglowych lub metalowych stolikach, napyła warstwą węgla i poddaje mikroanalizie w SEM.

Chemiczne metody utrwalenia i odwadniania próbek biologicznych często prowadzą do zmian w lokalizacji pierwiastków czy wręcz wypływu z tkanek pierwiastków występujących w postaci jonów lub związków łatwo rozpuszczalnych [6, 31, 39, 43, 52]. Badania jakościowe i ilościowe tego typu pierwiastków wymagają zastosowania fizycznych metod przygotowania materiału (rys. 10). W tym przypadku próbki utrwala się za pomocą bardzo szybkiego zamrożenia i następnie odwadnia metodą sublimacji w niskiej temperaturze [31, 45]. Takie postępowanie zatrzymując w ułamku sekundy procesy życiowe zapobiega w dużym stopniu przemieszczaniu pierwiastków w komórce. Zamrożenia próbek dokonuje się w temperaturze zbliżonej do temperatury wrzenia ciekłego azotu ( $-195,8^\circ C$ ) w tak dobranych warunkach, aby

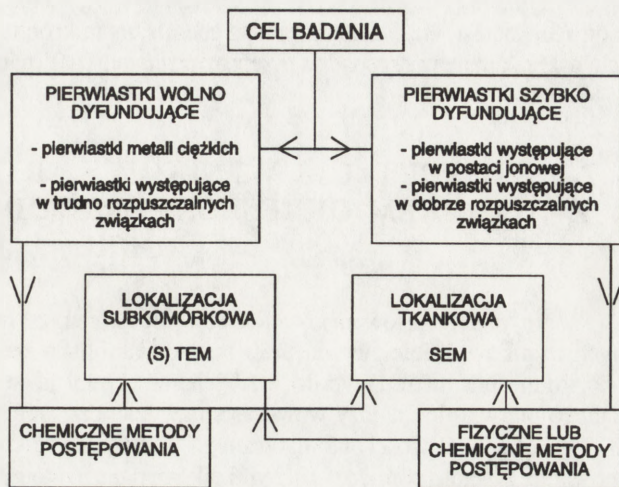
glutarowy + seria alkoholi etylowych). Jeżeli celem badań jest analiza wewnątrzkomórkowa, materiał zatapia się w żywicy (np. Epon, Spurr), kroi na ultracienkie skrawki i umieszcza na siateczkach. Grubość stosowanych skrawków mieści się w granicach 150–200 nm. Istotny jest też wybór materiału, z którego zbudowane są siateczki do zbierania skrawków [31]. W zasadzie można stosować wszystkie rodzaje siateczek metalowych. Jeżeli jednak analizuje się np. sód, to niewskazane jest używanie siatek miedzianych, ponieważ linia  $K\alpha$  sodu (1,04 keV) znajduje się zbyt blisko linii  $L\alpha$  dla miedzi (0,94 keV), co utrudnia interpretację uży-

szybkość zamrażania wynosiła  $10^4-10^6 \text{ Ks}^{-1}$  [24]. Zastosowanie takich warunków utrwalania jest najnowszym osiągnięciem w zakresie preparatyki stosowanej w mikroskopii elektronowej. Szybkość działania niskiej temperatury zabezpiecza przed powstaniem wody w postaci krystalicznej, dzięki czemu nie dochodzi do uszkodzenia komórek.

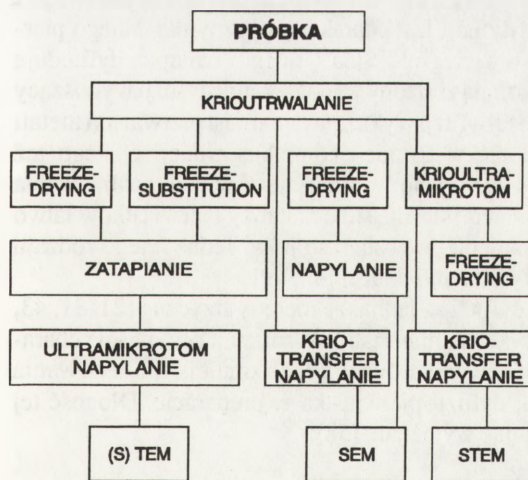
Zamrożone próbki mogą być przeznaczone do analizy składu pierwiastkowego na poziomie tkankowym w SEM lub na poziomie subkomórkowym w (S)TEM. W przypadku większych fragmentów materiału zamrożoną próbkę poddaje się procesowi *freeze-drying*, który prowadzi do odwodnienia materiału na skutek sublimacji wody

w warunkach próżni. Próbki przytwierdza się następnie do metalowych lub węglowych stolików, napyła warstwą węgla i analizuje w SEM. W celu uzyskania skrawków pozwalających na subkomórkową analizę próbki stosuje się również metodę *freeze-substitution*. Proces

ten polega na zastąpieniu sublimującej wody przez określony rozpuszczalnik organiczny, w którym rozpuszcza się stosowana do zatapiania żywica [16]. Zatapianie można przeprowadzać w podwyższonych temperaturach (żywice epoksydowe) lub w niskich temperaturach (ang. *cryo-embedding*), stosując żywice typu Lowikryl [52]. Zatopiony materiał kroi się następnie na odpowiednie skrawki i umieszcza na siateczkach. Ultra cienkie skrawki można również otrzymać krojąc zamrożony materiał na krioultramikrotomie. Skrawki takie bądź osusza się metodą *freeze-drying* i analizuje w pokojowej temperaturze w (S)TEM, bądź bezpośrednio wprowadza do kolumny mikroskopu pracującego w temperaturze poniżej punktu rekrytalizacji wody ( $T -125 \text{ }^\circ\text{C}$ ; ang. *cryo-transfer*) [31, 10].



Rys.9. Wybór ogólnej metody przygotowania próbki w zależności od rodzaju pierwiastka i wielkości analizowanego obszaru



Rys. 10. Schemat różnych dróg fizycznego przygotowania próbek do MAR (wg Zierold i Steinbrecht [51])



Wprowadzane do kriomikroskopu skrawki są odwadniane (skrawki typu *freeze-dried*) lub nie są odwadniane (skrawki typu *frozen-hydrated*) [54]. Metody otrzymywania krioskrawków w najmniejszym stopniu zmieniają skład chemiczny mikroobszarów próbki, dlatego stosowanie ich jest pożądaną w przypadku przeprowadzania MAR (patrz p. 7).

## 7. INTERPRETACJA WYNIKÓW I ARTEFAKTY ZWIĄZANE Z WYBOREM OKREŚLONEJ METODY PRZYGOTOWANIA PRÓBKII

W przypadku stosowania MAR niezwykle istotna jest prawidłowa interpretacja otrzymanych wyników. Wiele pierwiastków posiada tak blisko leżące linie charakterystyczne, że są one trudne lub niemożliwe do rozdzielania. Ażeby potwierdzić lub wykluczyć obecność danego pierwiastka, należy wówczas sprawdzić, czy istnieją w widmie inne jego linie oraz skorzystać z możliwości automatycznego "rozwijania" pików, jakie zwykle stwarza oprogramowanie. Ponadto pomiędzy różnymi pikami danego atomu (dla danej powłoki) powinna być zachowana określona proporcja. Na przykład pik dla linii  $K\alpha$  danego pierwiastka powinien być ok. pięciokrotnie wyższy od pików  $K\beta$ . Jeśli tak nie jest, może oznaczać to, że interferuje on z pikami innego pierwiastka. Jednym ze źródeł artefaktów może być procedura przygotowania próbki (patrz p. 6). Dotyczy to szczególnie metod chemicznych, które zawsze wprowadzają dodatkowo pewną ilość pierwiastków. Istnieje zatem realna możliwość niezamierzonego podania z zewnątrz szukanego w komórce pierwiastka. Z tego powodu wszystkie stosowane odczynniki powinny być analitycznie czyste. Procedura chemiczna powoduje również dyfuzję w obrębie komórki, a nawet wypłukanie łatwiej dyfundujących pierwiastków, co ma istotne znaczenie zarówno dla analizy jakościowej, jak i ilościowej [21, 39, 51]. Zdolność do szybkiej dyfuzji dotyczy przede wszystkim jonów i wzrasta wraz ze wzrostem promienia jonowego i spadkiem ładunku jonu. Miarą zdolności do dyfuzji jest charakterystyczny dla danego pierwiastka współczynnik dyfuzji. Na przykład w szeregu  $K^+ > Ca^{2+} > Mg^{2+}$  najlepiej dyfunduje  $K^+$ , a najslabiej  $Mg^{2+}$ . Niemniej pierwiastki te mają zbliżony współczynnik dyfuzji wynoszący około  $2 \cdot 10^{-9} m^2/s$ . Znacznie mniejszą zdolność dyfuzji wykazują natomiast pierwiastki metali ciężkich, ponieważ występują one w komórce w formie skompleksowanej. Dlatego też chemiczne metody przygotowania materiału są zwykle wystarczające w celu analizowania tych pierwiastków. Jeśli jednak metody chemiczne stosuje się do analizy pierwiastków łatwo dyfundujących, wskazane jest ich unieruchomienie w postaci strąków. Jedną z tego rodzaju metod jest strącanie  $Ca^{2+}$  za pomocą piroantymonianu potasu [40, 49].

Najskuteczniejszym przeciwdziałaniem dyfuzji są jednakże metody fizyczne [21, 31, 43, 55]. Zastosowanie mrozeniowej metody utrwala materiału nie zmienia oczywiście charakterystycznego dla danego pierwiastka współczynnika dyfuzji, lecz zmniejsza czas trwania tego procesu. W efekcie zmniejsza to drogę dyfuzji pierwiastka w preparacie. Długość tej drogi można w przybliżeniu oszacować stosując wyrażenie [58]:

$$S = \sqrt{2 D t}$$

gdzie:

$D$  – współczynnik dyfuzji [ $m^2/s$ ]

$t$  – czas dyfuzji [s]

$S$  – długość drogi dyfuzji [m]

Na znaczenie metod fizycznych wskazywało już wiele wcześniejszych prac. Między innymi w 1969 roku Hall i Hohling wykazali, że w trakcie chemicznego utrwalania dochodzi nawet do 75% ubytku fosforu w dentynie w stosunku do ilości tego pierwiastka w materiale utrwalonym fizycznie [14]. Również metody fizyko-chemiczne (aldehyd glutarowy i następnie *freeze-drying*) w odniesieniu do takich pierwiastków, jak  $K^+$  i  $Ca^{2+}$ , okazują się niewystarczające [21]. Obecnie prowadzone prace pozwalają stwierdzić, które spośród stosowanych metod mrozeniowych są korzystniejsze z punktu widzenia mikroanalizy rtg [56, 57]. Ogólnie rzecz biorąc metody *freeze-substitution* i *freeze-drying* prowadzące do zatopienia materiału w żywicy dają gorsze wyniki aniżeli metody otrzymywania krioskrawków. Optymalnym rozwiązaniem jest stosowanie kriotransferu do kolumny kriomikroskopu. W skrawkach erytrocytów ludzkich otrzymanych tą metodą i następnie analizowanych przy użyciu systemu EDS, uzyskano potwierdzony innymi metodami stosunek  $K^+/Na^+$  wynoszący ok. 10/1 [57]. Różne odmiany metody *freeze-substitution* dawały nawet kilkukrotnie mniejsze wartości. Badania te wskazują zatem, że metoda dobrze zachowująca ultrastrukturę próbki nie musi jednocześnie zabezpieczać przed dyfuzją niektórych jej składników.

Korzystne jest także stosowanie wysokich ciśnień w czasie utrwalania materiału, zwłaszcza w przypadku preparowania grubych skrawków (ang. *high-pressure freezing*). Warunki takie umożliwiają powstawanie wody w postaci amorficznej w obszarze aż do 200  $\mu m$  od powierzchni badanej próbki [24]. Przy stosowaniu normalnych ciśnień woda w takiej postaci powstaje jedynie do głębokości ok. 100 nm od powierzchni próbki. W głębszych warstwach powstaje krystaliczna postać wody, która jest przyczyną nie tylko zaburzeń struktury, ale powoduje również przemieszczanie pierwiastków [55]. W przypadku cienkich skrawków metoda wysokociśnieniowa daje wyniki zbliżone do metody otrzymywania krioskrawków w warunkach normalnego lub obniżonego ciśnienia [56].

## 8. PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA MAR W BADANIACH BIOLOGICZNYCH

MAR w badaniach biologicznych jest najczęściej wykorzystywana w celu:

- 1) analizowania pierwiastków endogennych
  - w takiej postaci, w jakiej naturalnie występują w komórce,
  - związanych do postaci strątu przez wprowadzenie odpowiedniej substancji chemicznej;
- 2) analizowania pierwiastków egzogennych
  - wprowadzonych eksperymentalnie do komórki,
  - będących skutkiem zanieczyszczenia środowiska;
- 3) kontroli niektórych reakcji cytochemicznych.

Przykładem zastosowania MAR do badania endogennych silnie związanych pierwiastków, jest analiza obecności żelaza w niektórych komórkach nerwowych. Wzrost ilości tego pierwiastka w neuronach istoty czarnej śródmózgowia towarzyszy rozwojowi choroby Parkinsona. Obserwacje takie znane były na podstawie badań histo- i biochemicznych [38]. Używając



MAR w systemie EDS stwierdzono, że większość gromadzonego w warunkach patologicznych żelaza znajduje się w osmofilnych złogach neuromelaniny na terenie cytoplazmy neuronów [34].

Analiza pierwiastków występujących w komórce głównie w postaci jonów (np.  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) wykonywana jest po ich uprzednim wytrąceniu w postaci nierozpuszczalnych precypitatów lub przy użyciu technik mrozeniowych. Jedną z metod unieruchomiania  $Ca^{2+}$  jest wytrącenie go za pomocą piroantymonianu potasu ( $KSb[OH]_6$ ). Powstające elektronowo-gęste strąty ujawniają miejsce występowania tego pierwiastka w komórce [49]. Podobne precypitaty mogą jednakże powstawać w sposób niespecyficzny na skutek wiązania się piroantymonianu z niektórymi innymi kationami (głównie z  $Na^+$ ). Ostatecznym dowodem na obecność  $Ca^{2+}$  jest w tym przypadku mikroanaliza precypitatów [40]. Jednakże pewnym utrudnieniem powyższej metody jest bliskość niektórych pików wapnia i antymonu ( $Sb L\alpha - 3,60$  keV,  $Ca K\alpha - 3,69$  keV), co daje się jednak usunąć przez zastosowanie odpowiedniej obróbki otrzymanego widma. Metodyka ta została użyta m.in. w badaniach lokalizacji  $Ca^{2+}$  w różnicujących się ziarnach pyłkowych *Chlorophytum elatum*. Uzyskane wyniki wskazują na gromadzenie się tego pierwiastka w strefie granicznej między komórką generatywną a komórką wegetatywną [13]. Metodę piroantymonianową wykorzystano również w celu ujawnienia miejsc wysokiej koncentracji wapnia w woreczkach zalążkowych *Pennisetum glaucum* L. Używając systemu EDS udowodniono, że nagromadzenie elektronowo-gęstych precypitatów w synergidach i komórkach osłonek w okolicy mikropyle jest wynikiem wysokiego poziomu  $Ca^{2+}$  w tych rejonach zalążka [7, 8]. Podobne rezultaty uzyskano wykonując mapowanie całych zalążków przygotowanych techniką *freeze-substitution* [9]. Mapowanie woreczka zalążkowego i jego okolic pozwoliło ponadto ujawnić przemieszczanie się puli wapnia z synergidy do mikropyle po uwolnieniu w niej zawartości łagiewki pyłkowej [7, 8]. Zamrożone w temperaturze ciekłego azotu próbki zostały także użyte do analizy wapnia w systemie WDS. Wysoki poziom tego pierwiastka stwierdzono w warstwie aleuronowej ziarniaka owsa [41] oraz w strukturach powierzchniowych znamienia *Ruscus aculeatus* [2].

Powiązanie MAR z metodami mrozeniowego przygotowania próbek umożliwia badanie ilościowych zmian rozmieszczenia jonów na poziomie subkomórkowym w odpowiedzi na stymulację receptorów. Przy użyciu izoproterenolu wykazano na przykład, że stymulacja receptorów  $\beta$ -adrenergicznych komórek mięśni gładkich powoduje obniżenie cytoplazmatycznej i mitochondrialnej puli  $Na^+$  i  $Cl^-$ . W cytoplazmie maleje również zawartość  $Ca^{2+}$ , rośnie natomiast zawartość  $Mg^{2+}$ . Efekty te związane są przede wszystkim z aktywacją pompy sodowo-potasowej i aktywacją antyportu sodowo-magnezowego [53].

Mikroanaliza pierwiastków egzogennych wprowadzonych do komórki drogą eksperymentalną lub z gleby czy powietrza, odgrywa istotną rolę w badaniach toksycznego ich wpływu na organizmy żywe [1]. Do pierwiastków tego typu zalicza się m.in. ołów, kadm, miedź i cynk. Mikroanaliza rtg pozwala na ujawnienie miejsc lokalizacji tych metali w komórce, co pośrednio przyczynia się do zrozumienia mechanizmów ich toksycznego działania. W roku 1981 stwierdzono, że podanie Cd do komórki *Acanthamoeba castellanii* powoduje powstanie gęstych elektronowo złogów w miejscach subplazmalemalnych komórki, rozmieszczonych analogicznie do miejsc wiążących Ca [25,35]. Dalsze prace wykazały, że po jednoczesnym podaniu Cd i Ca powstaje dodatkowo większa ilość złogów wewnątrz komórki [27]. Należało zatem rozstrzygnąć, czy powstające złogi składają się z obydwu pierwiastków oraz jeśli tak, to jaki jest stosunek Cd/Ca w złogach znajdujących się w różnych kompartmentach komórki. Stosując mikroanalizę w systemie EDS wykazano obecność obydwu pierwia-

stków w stosunku od 70/30 do 88/12 na korzyść Cd [28]. W kolejnych badaniach przy użyciu EDS stwierdzono, że Cd nie tylko zastępuje Ca, ale może nawet wypierać go z już istniejących złogów Ca [29]. Wyniki te wskazują, że podobieństwa fizyko-chemiczne niektórych pierwiastków mogą wiązać się z wzajemnym ich zastępowaniem w komórce.

Metodą MAR postużono się również w celu określenia wpływu pyłów hutniczych na rozwój komórek korzeni dwóch odmian topoli [51]. Podstawowymi toksycznymi składnikami tych pyłów są takie metale, jak Pb, Zn i Cu. Wcześniejsze prace wskazywały, że jedna z odmian jest bardziej tolerancyjna na skażenie tymi metalami. MAR wykazała, że odmiana ta występując w środowisku skażonym charakteryzuje się prawie dwukrotnie większą zawartością Zn i Pb, natomiast znacznie mniejszą zawartością Cu w stosunku do odmiany bardziej wrażliwej. Użycie tej metody umożliwia identyfikację odmian bardziej tolerancyjnych na niektóre z powszechnie występujących pierwiastków toksycznych.

MAR jest ponadto dobrym testem weryfikującym dla niektórych metod cytochemicznych [33], obarczonych zwykle dużym marginesem błędu. Przykładem tego typu zastosowania była omówiona już metoda lokalizacji wapnia przy użyciu piroantymonianu potasu. W podobny sposób MAR może zostać wykorzystana w reakcji Gomoriego, mającej na celu lokalizację aktywności trifosfatazowej w komórce. Reakcja ta polega na inkubowaniu komórek z  $Pb(NO_3)_2$  i ATP jako substratem. Powstający w wyniku reakcji enzymatycznej  $PO_4^{3-}$  reaguje z Pb, dając nierozpuszczalny, elektronowo-gęsty strą. Część ciemnych strąków stanowią zawsze niespecyficzne złogi ołowiu, pojawiające się w ścianie komórkowej i w innych regionach komórki. Złogi takie można odróżnić od powstałych w wyniku reakcji enzymatycznej, ponieważ nie zawierają fosforu [11, 44].

Interesującym zastosowaniem MAR jest testowanie wyniku transformacji genetycznej u roślin. Jednym z markerów transformacji jest test aktywności  $\beta$ -glukuronidazowej [3]. Odcinek DNA kodujący  $\beta$ -glukuronidazę przyłącza się do transformowanego genu i wraz z nim wprowadza się go do hodowanych *in vitro* komórek roślinnych [19]. Ujawnienie się w transformowanych komórkach aktywności  $\beta$ -glukuronidazowej oznacza jednocześnie ekspresję drugiego wprowadzonego genu, ponieważ obydwa geny mają wspólne miejsce promotorowe. Aktywność  $\beta$ -glukuronidazy bada się metodą cytochemiczną używając bromoindoksylowych pochodnych kwasu  $\beta$ -glukuronidowego. W miejscach aktywności enzymu powstają precypitaty bromoindyga, które można odróżnić od innych strąków dzięki obecności w nich bromu [4]. W przypadku kontroli reakcji cytochemicznych MAR nie jest testem rozstrzygającym. Konieczne jest równoległe przeprowadzenie innych, standardowo stosowanych reakcji kontrolnych.

Przedstawione przykłady świadczą zdecydowanie o znacznych możliwościach wykorzystania MAR we współczesnych naukach biologicznych. Wskazuje na to również rosnąca ilość prac wykorzystujących tę metodę, jak i częste organizowanie poświęconych jej kongresów międzynarodowych.

## PODZIĘKOWANIE

Autorzy pracy serdecznie dziękują Pani Profesor A. Przełęckiej za pomoc i istotne wskazówki w redagowaniu niniejszego artykułu.



## LITERATURA

- [1] BARCKHAUS RH, SCHMIDT PF. How can toxic elements (Pb, Ti) be localized in histological sections by electronprobe microanalysis (EPMA). [w:] Histo- and cytochemistry as a tool in environmental toxicology. Graumann W, Drukker J [red.] Inc. 1991: 332–342.
- [2] BEDNARSKA E. Localization of Calcium on the surface of stigma in *Ruscus aculeatus* L.– studies by the chlorotetracycline and X-ray microanalysis. *Planta* 1989; **179**: 11–16.
- [3] BURGESS SM, HIRSCH D.  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad USA* 1986; **83**: 8447–8451.
- [4] CAISSARD J-C, REMBUR J, CHRIQUI D. Electron microscopy and X-ray microanalysis as tools for fine localization of the  $\beta$ -glucuronidase activity in transgenic plants harbouring the GUS reporter gene. *Protoplasma* 1992; **170**: 68–76.
- [5] CASTAING R, GUINIER A. Sur l'exploration et l'analyse elementaire d'un echantillon par une sonde electronique. Proc. 1st Int. Congr. Electron Microscopy Delft 1949: 60.
- [6] CHANDLER JA. X-Ray Microanalysis in the Electron Microscope. Glauert MA. (red.) North-Holland 1977.
- [7] CHAUBAL R, REGER BJ. Relatively high calcium is localized in synergid cells of wheat ovaries. *Sex Plant Repr* 1990; **3**: 98–102.
- [8] CHAUBAL R, REGER BJ. Calcium in the synergid cells and other regions of pearl millet ovaries. *Sex Plant Repr* 1992; **5**: 34–46.
- [9] CHAUBAL R, REGER BJ. The dynamics of calcium distribution in the synergid cells of wheat after pollination. *Sex Plant Repr* 1992; **5**: 206–213.
- [10] ECHLIN P. Ice crystal damage and radiation effect in relation to microscopy and analysis at low temperatures. *J Microsc* 1991; **161**(1): 159–170.
- [11] ESCHRICH W, FROMM J, EVERT RF. Histochemical localization of nucleoside triphosphatase activity in assimilate conducting plant tissue. *Protoplasma* 1992; **167**: 145–51.
- [12] FOSTER MC, SAUBERMANN AJ. Personal-computer-based system for electron beam X-ray microanalysis of biological samples. *J Microsc* 1991; **161**(2): 367–373.
- [13] GÓRSKA-BRYLASS A, BUTOWT R, RODRIGUEZ-GARCIA M. Lokalizacja  $Ca^{2+}$  w różnicujących się komórkach ziarna pyłkowego. V Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki Wrocław 1993: 158.
- [14] HALL TA, HOHLING HJ. The application of microprobe analysis to biology. [w:] X-ray Optics and Microanalysis, Mollenstadt G Gaulker KH [red.] Academic Press New York Inc. 1969: 582–583.
- [15] HALL TA. The microprobe assay of chemical elements. [w:] Physical Techniques In Biochemical Research, Oster G [red.] Academic Press New York 1971; **1A**: 393–394.
- [16] HALI TA. Suggestions for the quantitative X-ray microanalysis of thin sections of frozen-dried and embedded biological tissues. *J Microsc* 1991; **164**(Pt1): 67–79.
- [17] HAGLER HK. Electron probe microanalysis applications in biology and medicine. Zierold K Hagler HK [red.] Springer Verlag Berlin Heidelberg 1989: 141–153.
- [18] HOPKINS DM, JACKSON AD, OATES K. The effect of aluminium coating on elemental standarts in X-ray microanalysis. *J Electron Microsc Tech* 1991; **18**(2): 176–182.
- [19] JEFFERSON RA. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 1987; **5**: 387–405.
- [20] LAZOF D, LAUCHLI A. Complementary analysis of freeze-dried and frozen-hydrated plant tissue by electronprobe X-ray microanalysis: Spectral resolution and analysis of calcium. *Planta* 1991; **184**: 327–333.
- [21] LOPEZ-ESCAMEZ JA, CANIZARES FJ, CRESPO PV, CAMPOS A. Electron probe microanalysis of the oholithic membrane. A methodological and quantitative study. *Scanning Microsc* 1992; **6**(3): 765–771.
- [22] MEEK GA. Practical Electron Microscopy For Biologists. John Wiley @ Sons Inc. 1976: 61.
- [23] MORAWIEC H. Mikroanaliza rentgenowska w badaniach metali. Materiały I Krajowej Szkoły Mikroskopii Elektronowej Jabłonna 1983. Warmiński T [red.] Warszawa 1984.
- [24] MULLER M, MICHEL M, HOHENBERG H. Progress in high-pressure freezing. Megias-Megias L Rodriguez-Garcia MI Rios A Arias JM [red.] Proc. 10th European Congress Electron Microscopy Granada 1992; **3**: 43–44.
- [25] PRZEŁĘCKA A, SOBOTA A. Developmental changes in the localization of cadmium binding sites in *Acanthamoeba castellanii*. *Histochemistry* 1981; **71**: 135–144.
- [26] PRZEŁĘCKA A. Skaningowy mikroskop elektronowy w badaniach biologiczno-medycznych. Materiały I Krajowej Szkoły na Temat Mikroskopii Elektronowej Jabłonna 1983. Warmiński T [red.] Warszawa 1984.
- [27] PRZEŁĘCKA A, BAN DD. Visualization of binding sites of calcium and its analogue- cadmium in *Acanthamoeba castellanii* cells. *Acta Protozool* 1988; **27**: 135–140.

- [28] PRZEŁĘCKA A, KLUSKA AM, ZWIERZYK M. The binding of Cd-ions in *Acanthamoeba castellanii*, X-ray microanalysis. 12th International Congress on X-ray Optics and Microanalysis 1989 II: 618–621.
- [29] PRZEŁĘCKA A, KLUSKA AM, ZWIERZYK M. Replacement of calcium by cadmium ions from Ca-affinity sites localized in different cytoplasmic compartments of *Acanthamoeba* cells. *Histochem* 1991; **95**: 391–395.
- [30] REED SJB. Quantitative ED analysis in high count rates. [w] *Microbeam Analysis*. Michael JR Ingran P [red.] San Francisco Press Inc. 1990: 181–184.
- [31] REID N, BEESLEY JE. Sectioning and Cryosectioning for Electron Microscopy. Glauert AM [red.] Elsevier 1991.
- [32] ROOMANS GM. Introduction to X-ray microanalysis in biology. *J Electron Microscop* 1988; **9**(1): 3–19.
- [33] ROOMANS GM. Biomedical applications of X-ray microanalysis. Rios A Arias JM Megias-Megias L Lopez-Galindo A [eds.] Proc. 10th European Congress on Electron Microscopy Granada 1992; **1**: 337–341.
- [34] RUMPLMAIR G, JELLINGER K, KIENZLE E, YODIM MBH. Melanin-iron complex in the substantia nigra of Parkinsonian brain – An X-ray study. Megias-Megias L Rodriguez-Garcia MI Rios A Arias JM [red.] Proc. 10th European Congress on Electron Microscopy Granada 1992; **3**: 707–708.
- [35] SOBOTA A. Subplazmalemmal calcium-binding microregions in *Acanthamoeba*. *J Cell Sci* 1985; **79**: 217–239.
- [36] SOBOTA A. Zastosowanie mikroanalizy rentgenowskiej do badań materiałów biologicznych. *Zeszyty naukowe UJ* 1978; **5**: 55–65.
- [37] SUMNER AT. Cytochemical applications of X-ray microanalysis. *J Electron Microscop* 1988; **9**(1): 99.
- [38] SOFICE, PAULUS W, JELLINGER K, RIEDERER P, YODIM MBH. Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of Parkinsonian brains. *J Neurochem* 1991; **56**: 978–983.
- [39] SPURR AR. Applications of X-ray microanalysis in botany. *Scanning Electron Microscop* 1980; II: 535–564.
- [40] SUZUKI S, SUGI H. Evaluation of the pyroantimonate method for detecting intracellular calcium localization in smooth muscle fibers by X-ray microanalysis of cryosections. *Histochem* 1989; **92**: 95–101.
- [41] TRETYN A, KOPCEWICZ J. Calcium localization in oat aleurone cells using chlorotetracycline and X-ray microanalysis. *Planta* 1988; **175**: 237–240.
- [42] VON EULER A, WRÓBLEWSKI R, ROOMANS GM. Correction for extraneous background in X-ray microanalysis of cell culture. *Scanning Microscopy* 1992; **6**(2): 451–456.
- [43] VON ZGLINICKI T. Röntgenmikroanalyse-Möglichkeiten und Methoden. *Acta Histochem Suppl* 1990; **39**: 479–484.
- [44] VAN STEVENINCK RFM. The verification of cytochemical tests for ATP-ase activity in plant cells using X-ray microanalysis. *Protoplasma* 1979; **99**: 211–220.
- [45] WARLEY A. Cryofixation of heart tissue for X-ray microanalysis. *Scanning Microscopy* 1989; **3**(4): 1247–1253.
- [46] WARLEY A. Standards for the application of X-ray microanalysis to biological specimens. *J Microscop* 1990; **157**(Pt2): 135–147.
- [47] WATT IM. The Principles and Practice of Electron Microscopy. Cambridge University Press 1989.
- [48] WHALLON JH, FLEGER SL, KLOMPARENS KL. Energy-dispersive X-ray microanalysis. *BioScience* 1987; **39**: 256–259.
- [49] WICK SM, HEPLER PK. Selective localization of intracellular  $Ca^{2+}$  with potassium antimonate. *J Histochem Cytochem* 1982; **30**: 1190–1204.
- [50] WILLISON MJH, ROWE AJ. The coating-unit and its use. [w]: *Practical Methods in Electron Microscopy*, Glauert MA [ed.] Elsevier 1980: 13–53.
- [51] WOŹNY A, GRONIKOWSKA G, RACHWAŁ L. The effect of metalliferous dust from a copper on the morphological and ultrastructural changes of two selected poplar hybrids. *Arbor Kórnickie* 1991; **35**:
- [52] WRÓBLEWSKI R, WRÓBLEWSKI J, WIKSTROM SO, ANNICO M. A low temperature vacuum embedding procedure for X-ray microanalysis of biological specimens at subcellular level. *Scanning Microscopy* 1990; **4**(3): 787–792.
- [53] ZIEGLER A, SOMLYO AV, SOMLYO AP. Beta-adrenergic effects on cellular Na, K, Ca, K, and Cl in vascular smooth muscle: electron probe analysis of rabbit pulmonary artery. *Cell Calcium* 1992; **13**(9): 593–602.
- [54] ZIEROLD K, SCHAFER D. X-ray microanalysis of freeze-dried and frozen-hydrated cryosections. *J Electron Microscop* 1988; **9**(1): 65–83.
- [55] ZIEROLD K, STEINBRECHT RA. Cryotechniques in Biological Electron Microscopy, Steinbrecht RA Zierold K [red.] Springer-Verlag 1987.
- [56] ZIEROLD K, TOBLER M, MULLER M. X-ray microanalysis of high-pressure and impact frozen erythrocytes. *J Microscop* 1991; **161**(2): RP1.
- [57] ZIEROLD K. Cryopreparation for electron probe microanalysis of biological cells. Megias-Megias L Rodriguez-Garcia MI Rios A Arias JM [red.] Proc. 10th European Congress on Electron Microscopy Granada 1992; **3**: 45–49.



[58] ZIEROLD K. Rapid freezing techniques for biological electron probe microanalysis. [w]: X-ray microanalysis in biology: experimental techniques and applications, Sigeo DC Morgan AJ Sumner AT Warley A [red.]. Cambridge University Press 1993: 101–116.

W trakcie opracowania artykułu skorzystano dodatkowo z instrukcji fabrycznej dla urządzenia EDS typu LINK 10000 AN udostępnionej dzięki uprzejmości pracowników Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie.

*Otrzymano: 16.08.1993 r.*

*Przyjęto: 16.11.1993 r.*

*Adres autorów: ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń.*

## WSPÓLZALEŻNOŚCI POMIĘDZY FOTOSYNTETYCZNYM I OKSYDACYJNYM TRANSPORTEM ELEKTRONÓW U PRO- I EUKARIONTÓW\*

### RELATIONSHIP BETWEEN PHOTOSYNTHETIC AND OXIDATIVE ELECTRON TRANSPORT IN PRO- AND EUKARYOTES

Andrzej WALOSZEK

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Instytut Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego,  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

**Streszczenie.** Wspólne ogniwa dla dwóch układów transportu elektronów (związane z fotosyntezą i oddychaniem) wykryto w niektórych grupach pro- i eukariotycznych fotoautotrofów. U purpurowych bakterii niesiarkowych (dawniej *Rhodospirillaceae*) oddechowy i fotosyntetyczny, cykliczny transport elektronów zachodzą w tych samych fragmentach błon. Elementami wspólnymi tych dwóch łańcuchów jest pula ubichinonu, cytochromy  $b/c_1$  i  $c_2$ . W błonach tylakoidów sinic obok fotosyntetycznego transportu elektronów wykryto łańcuch oddechowy. Wspólnymi ogniwami tych systemów są zazwyczaj: pula plastochinonu, kompleks cytochromów  $b_6/f$  i cytochrom  $c$ . Zjawisko oksydacyjnego transportu elektronów wykryto również w chloroplastach zielenic i roślin wyższych, gdzie ogniwem wspólnym łańcucha oksydacyjnego (zwanego chloro-respiracją) i fotosyntetycznego jest pula plastochinonu. Chloro-respiracja jest maskowana przez oddychanie mitochondrialne; uległa uwstecznięciu w procesie ewolucji.

**Słowa kluczowe:** Fotosynteza, oddychanie, plastochinon, purpurowe bakterie niesiarkowe, sinice, *Chlamydomonas*, plastocjanina, transport elektronów.

**Summary.** In some photoautotrophic pro- and eukaryotes common links of photosynthetic and respiratory electron transport have been discovered. Respiratory and photosynthetic electron transport systems are localized in the same membranes in the cells of purple nonsulfur bacteria (former *Rhodospirillaceae*). Ubiquinone pool as well as cytochrome  $b/c$  complex and cytochrome  $c_2$  are common components both of these systems. Both respiratory and photosynthetic electron transport chains have been found in thylakoid membranes of cyanobacteria. Plastoquinone pool, cytochrome  $b_6/f$  complex and cytochrome  $c$  are usually the common links. Oxidative electron transport chains has been discovered in green algae and higher plants and was called chlororespiration. Plastoquinone pool is active in this process as well as in photosynthetic electron transport chain. Chlororespiration is considered to be an evolutionary relic.

\*Praca finansowana przez KBN (projekt badawczy nr 41660.91.01)



**Keywords:** Photosynthesis, respiration, plastoquinone, purple nonsulfur bacteria, cyanobacteria, *Chlamydomonas*, plastocyanin, electron transport.

**Stosowane skróty:** CCCP – karbonylocyjano-p-trifluorometoksyfenylohydrazon, DBMIB – 2,5-dibromo-3-metylo-p-benzochinon, DCCD – 1, 3-dicykloheksylkarbodiimid, DCMU – 3-(3', 4'-dichlorofenyl)-1,1'-dimetylomocznik,  $\Delta\phi$  – protonowy gradient elektrochemiczny, Fd – ferredoksyna, FNR – oksydoreduktaza ferredoksyna:NADP<sup>+</sup>, HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa, PET – fotosyntetyczny transport elektronów, PQ – plastochinon, RET – oddechowy transport elektronów, SHAM – kwas salicylohydroksyamowy, TLC – chromatografia cienkowarstwowa, UQ – ubichinon,

## I. WSTĘP

Niezbędnym warunkiem fosforylacji fotosyntetycznej, jak i oksydacyjnej jest istnienie dwóch przestrzeni rozdzielonych błoną, w której znajdują się układy powodujące powstawanie gradientu elektrochemicznego oraz enzymy odpowiedzialne za produkcję ATP przy wyrównywaniu tego gradientu. W komórkach fotosyntetyzujących prokariotów, w których nie występują organelle, oddechowy i fotosyntetyczny transport elektronów jest związany z tymi samymi błonami. Podobieństwo struktury i funkcji niektórych przenośników pozwala wnioskować, że mogą one uczestniczyć w obydwu procesach. U eukariotów fotosynteza i oddychanie są przestrzennie rozdzielone, ale hipoteza o pochodzeniu chloroplastów od wolno żyjących, prokariotycznych glonów daje podstawy do poszukiwania w chloroplastach oksydacyjnego transportu elektronów.

## II. PROKARIONTY

### a. BAKTERIE PURPUROWE – *Rhodospirillaceae*

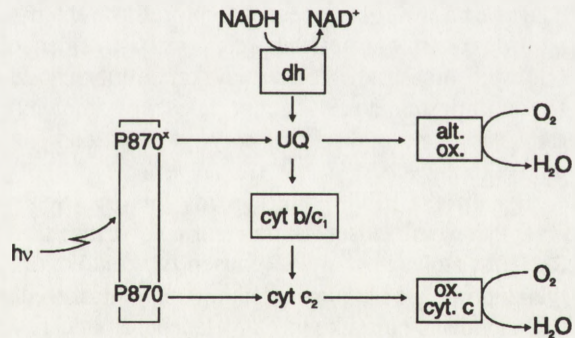
Najprymitywniejszymi organizmami mającymi wspólne ogniwa w fotosyntetycznym i oddechowym łańcuchu transportu elektronów jest grupa niesiarkowych bakterii purpurowych (*Rhodospirillaceae*). Od końca lat trzydziestych znane są doniesienia o hamującym wpływie światła na zużycie tlenu przez purpurowe bakterie niesiarkowe. Zjawisko to było tłumaczone w różny sposób, zależnie od poglądu na przebieg fotosyntezy [17]. Wprowadzenie hipotezy chemiosmotycznej ułatwiło wyjaśnienie tego zjawiska.

Cotton i wsp. [8] stwierdzili sprzężenie zjawiska świetlnej inhibicji oddychania u *Rhodobacter capsulatus* z protonowym gradientem elektrochemicznym ( $\Delta\phi$ ) obserwując zmiany natężenia oddychania i efektu elektrochromowego pod wpływem światła i związku rozprzegającego fosforylację od  $\Delta\phi$  (rozprzegacza) CCCP (karbonylocyjano-p-trifluorometoksyfenylohydrazonu). Zaburzenie potencjału błonowego przez CCCP powodowało zwiększenie natężenia oddychania bakterii oświetlanych do poziomu porównywalnego z natężeniem oddychania w ciemności. Ponadto stwierdzili synergistyczne działanie bardzo niskich stężeń CCCP i antymycyny A na obniżanie potencjału błonowego i świetlną inhibicję oddychania. Na tej podstawie doszli do wniosku, że za fotoinhibicję oddychania odpowiedzialny jest

przede wszystkim potencjał błonowy związany z fotosyntetycznym transportem elektronów, ale także drugi proces, działający przy niskiej wartości  $\Delta\phi$ , który być może jest związany z działaniem CCCP jako inhibitora oddychania.

Richaud i wsp. [39] badali wpływ oświetlania ciągłego i błyskowego na procesy oddechowe mutantów *Rhodobacter capsulatus*:  $M_6$  – pozbawionego oksydazy alternatywnej\* oraz  $M_7$  – nie mającego oksydazy cytochromu  $c_2$ . Stwierdzili, że błyski o częstotliwości 1 Hz powodowały krótkotrwałą inhibicję zużycia tlenu w szczepie dzikim i mutancie  $M_6$ , natomiast nie wywoływały tego efektu w mutancie  $M_7$ . Inhibicję we wszystkich szczepach obserwowano przy częstotliwości błysków 20 Hz, jak również w świetle ciągłym. W obecności CCCP nie występowała inhibicja w świetle ciągłym; przy częstotliwości błysków 20 Hz obserwowano inhibicję jedynie w szczepie  $M_6$ , przy częstotliwości zaś 1 Hz – w szczepie  $M_6$  i dzikim. Antymycyna A i CCCP działały synergistycznie w szczepie  $M_7$  i dzikim, natomiast nie miały wpływu na fotoinhibicję oddychania w szczepie  $M_6$ . Na tej podstawie wyciągnięto wniosek, że poza inhibicją oddychania związaną z potencjałem błonowym indukowanym przez fotosyntetyczny transport elektronów zachodzi również inhibicja związana z konkurencją o elektrony między cytochromem  $c_2$  a "otwartym" (wzbudzonym) centrum reakcji fotochemicznej. Pierwszy proces dotyczy oddychania związanego z oksydazą alternatywną, a drugi – oddychania związanego z oksydazą cytochromową.

Na podstawie badań spektroskopowych i potencjometrycznych Venturoli i wsp. [49] opisali szczegółowo łańcuch przenośników elektronów w błonach *Rhodospirillum rubrum*. Opis ten pasuje również do danych uzyskanych dla *Rhodobacter capsulatus*. Ogniwa fotosyntetycznego, cyklicznego transportu elektronów tworzą: centrum reakcji fotochemicznej, pula ubichinonu (UQ), kompleks cytochromów  $b/c_1$  i cytochrom  $c_2$ . Elektrony włączane do łańcucha oddechowego pochodzą głównie z NADH (cf. [46]) i są przekazywane przy udziale dehydrogenazy NADH na pulę UQ. Stąd transport elektronów może przebiegać dwiema drogami: w jednej z nich uczestniczy kompleks cytochromów  $b/c_1$ , cytochrom  $c_2$  i oksydaza cytochromu  $c_2$  (cytochrom b o potencjale oksydoredukcyjnym ( $E_m$ ) + 380 mV, wrażliwy na KCN w stężeniu  $10^{-6}$  M); w drugiej zaś – "alternatywna" oksydaza. Oksydaza "alternatywna" występująca u bakterii purpurowych jest niewrażliwa na KCN w niskim stężeniu ( $10^{-6}$  M) i antymycynę A, a jej



Rys. 1. Fotosyntetyczny i oddechowy system transportu elektronów u purpurowej bakterii niesiarkowej *Rhodospirillum rubrum* (wg [42], zmienione): P 870 – centrum reakcji fotochemicznej, dh – dehydrogenaza, UQ – ubichinon, cyt  $b/c_1$  – kompleks cytochromowy  $b/c_1$ , cyt  $c$  – cytochrom  $c$ , alt. ox. – oksydaza alternatywna (cytochrom b o potencjale oksydoredukcyjnym +250 mV), ox. cyt.  $c$  – oksydaza cytochromu  $c$  (cytochrom b o potencjale oksydoredukcyjnym +380 mV)

\*Oksydazy alternatywne są to enzymy utleniające plastochinon lub ubichinon bez udziału cytochromu  $c$  i oksydazy cytochromu  $c$ . Są one niewrażliwe na KCN w stężeniu  $10^{-6}$  M. Inhibitorem najbardziej znanej oksydazy alternatywnej jest kwas salicylohydroksymowy (SHAM). U bakterii stwierdzono również inne oksydazy alternatywne (patrz niżej oraz np. [25]).



inhibitorami są CO i KCN w stężeniu ok.  $10^{-4}$  M. Badania potencjometryczne i spektroskopowe wykazały, że jest to cytochrom b o  $E_m = +250$  mV.

Omówione wyniki świadczą o tym, że łańcuch oddechowy i łańcuch fotosyntetyczny mają wspólny odcinek, w którego skład wchodzi pula UQ, cytochrom b/c<sub>1</sub> i cytochrom c<sub>2</sub>. W komórkach purpurowych bakterii redukujących NO (*Rhodobacter sphaeroides* f.s. *denitrificans*) bezpośrednim donorem elektronów jest cytochrom c<sub>2</sub>, który w innych warunkach środowiskowych jest ogniwem fotosyntetycznego i oddechowego łańcucha transportu elektronów [15].

Oksydaza "alternatywna" uczestniczy w transporcie elektronów pochodzących z tej samej puli UQ (rys. 1). Brak hamowania "alternatywnego" oddechowego transportu elektronów przez PET można tłumaczyć tym, że pula UQ, która jest jedynym ogniwem wspólnym obydwu tych procesów, jest na tyle duża, że nie zachodzi współzawodnictwo o równoważniki redukcyjne.

#### b. SINICE (CYJANOBAKTERIE)

U sinic (cyjanobakterii) zachodzi typowy proces fotosyntezy z wydzielaniem cząsteczkowego tlenu. Organizmy te mają wewnątrzkomórkowy układ membran (tylakoidów), w których zlokalizowany jest chlorofil i wszystkie ogniwa łańcucha fotosyntetycznego transportu elektronów i protonów. W wyniku frakcjonowania błon sinic otrzymano również frakcję wzbogaconą w plazmolemmę, w której m.in. wykryto chlorofil [30].

Peschek i wsp. [36, 37] wykryli w plazmolemmie *Anacystis nidulans* protochlorofilid, chlorofilid *a* i niezależną od światła oksydoreduktazę NADPH-protochlorofilid, natomiast nie udało się im stwierdzić obecności chlorofilu. Scherer [42] tłumaczy te fakty ciągłością systemu błon w prokariotycznej komórce, a więc istnieniem obszarów błony o właściwościach przejściowych oraz trudnościami uzyskania dobrze oczyszczonych preparatów plazmolemmy. Hipoteza postulująca istnienie ciągłości plazmolemmy i błon tylakoidów w komórce prokariotycznej nie została do tej pory potwierdzona jednoznacznie wynikami badań elektronomikroskopowych.

Lokalizacja RET u sinic jest dyskusyjna. Scherer, Almon i Böger [43] w swej pracy przeglądowej przedstawili trzy teorie dotyczące tego problemu. Pierwsza z nich zakłada, że RET jest zlokalizowany w błonach tylakoidów, druga – że występuje zarówno w błonach tylakoidów, jak i w plazmolemmie, natomiast według trzeciej w błonach tylakoidów mają funkcjonować początkowe etapy łańcucha oddechowego, natomiast oksydaza cytochromu *c* ma występować w plazmolemmie; w przenoszeniu elektronów na nią z wcześniejszych etapów RET uczestniczy nieokreślony bliżej pośrednik.

Porównując wyniki badań przeprowadzonych na różnych gatunkach sinic stwierdza się międzygatunkowe zróżnicowanie udziału błony cytoplazmatycznej w oddechowym transporcie elektronów. We frakcji plazmolemmy *Anabaena variabilis* nie stwierdzono wykrywalnych ilości cytochromów *b* i *c* [19] ani reakcji z przeciwciałami przeciw czynnikowi sprzęgającemu [18]. Obydwa te fakty wskazują na brak procesów energetycznych związanych z transportem elektronów w plazmolemmie tej sinicy.

Omata i Murata [31] analizowali obecność przenośników elektronów w plazmolemmie i błonach tylakoidów *Anacystis nidulans*. Stosując HPLC i TLC wykryli w obydwu typach błon te same prenylochinony – PQ-9, fyllochinon i 5'-monohydroksyfyllochinon, ale w różnych

stosunkach ilościowych. Analiza absorpcyjnych widm różnicowych umożliwiła wykrycie w błonie cytoplazmatycznej dwóch różnych cytochromów, różniących się od czterech innych, wykrytych w błonach tylakoidów.

Autorzy stwierdzili jedynie, że nie są to cytochromy typu a.

Zarówno w błonie cytoplazmatycznej, jak i w błonach tylakoidów *Anacystis nidulans* i *Plectonema* ATCC 29407 stwierdzono, na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych, utlenianie egzogenego cytochromu c wrażliwe na KCN,  $N_3^-$ ,  $S^{2-}$ , CO lub salicylaldoksym, natomiast nie wykazano takiej aktywności w preparatach plazmolemmy uzyskanych z *Anabaena variabilis* ATCC 29413 [23]. Pośrednio potwierdza to przytoczone wyżej wyniki Lockaua i Pfeffer [19]. Ponadto w preparacie bLon cytoplazmatycznych *Anacystis nidulans* obserwowano, po zablokowaniu aktywności oksydazy cytochromu c, redukcję egzogenego cytochromu c w obecności NAD(P)H. Wskazuje to na obecność w plazmolemmie tej sinicy nie tylko oksydazy cytochromowej, ale również enzymów uczestniczących we wcześniejszych etapach oddechowego transportu elektronów.

Nicholls i wsp. [28] przeprowadzili dokładną analizę zawartości cytochromów w błonach *Anacystis nidulans*, wykrywając w błonach tylakoidów wszystkie typy cytochromów, które biorą udział w transporcie elektronów, tzn. cytochrom c, cytochrom b i oksydazę cytochromu c (cytochrom  $aa_3$ ). We frakcjach plazmolemmy występowała natomiast znaczna przewaga cytochromu c i oksydazy cytochromu c. Również Moser i wsp. [24] stwierdzili aktywność oksydazy cytochromu c zarówno w plazmolemmie, jak i w błonach tylakoidów *Anacystis nidulans* i *Synechocystis* PCC 6803. Scherer i wsp. [43] donieśli o wykryciu oksydazy cytochromu c w błonie komórkowej w linearnej fazie namnażania komórek *Anacystis nidulans*, podczas gdy w fazie logarytmicznej enzym ten był wykrywany tylko w błonach tylakoidów.

Wyniki te wskazują na możliwość zachodzenia zmian w rozmieszczeniu aktywności enzymatycznych podczas rozwoju organizmów.

Doświadczenia prowadzone z użyciem znanych inhibitorów dehydrogenaz oddechowych – rotenonu i antymycyny A [21] wykazały, że w komórkach *Plectonema boryanum* 594 Gomont występują dwie różne dehydrogenazy, przy czym dehydrogenaza specyficzna dla NADH była wrażliwa na obydwie inhibitory, natomiast dehydrogenaza zależna od NADPH – tylko na rotenon. Obecność dehydrogenazy NADH wrażliwej na rotenon wykazali również Berger i wsp. [6] we frakcjach błon tylakoidów i plazmolemmy uzyskanych z *Synechocystis* sp. PCC 6803. Ci sami badacze przeprowadzając reakcję z przeciwciałami skierowanymi przeciwko dehydrogenazie NADH:UQ z mitochondriów wykryli podobieństwo pomiędzy badanymi dehydrogenazami. Opierając się na stosunkowo słabym działaniu rotenonu (33–50% inhibicji) na aktywność dehydrogenazy NADH w błonie tylakoidów zasugerowali występowanie innej dehydrogenazy NADH odpornej na rotenon lub osłabienie działania inhibitora wskutek tego, że akceptorem wodoru nie jest UQ (jak w mitochondriach), lecz PQ. Podobne zastrzeżenie można postawić w stosunku do wyników badań Matthijisa i wsp. [21] przedstawionych powyżej. W preparatach uzyskanych przez tę grupę autorów rotenon hamował szybkość utleniania NADPH w 28–42%, antymycyna A zaś hamowała szybkość utleniania NADH średnio w 47%. Autorzy badali możliwość utleniania NAD(P)H przez FNR dodając do mieszaniny reakcyjnej ferredoksynę, jednakże ferredoksyna nie bierze udziału w przenoszeniu elektronów z NADPH na RET [14].



Houchins i Hind [14] oraz Stürzl i wsp. [47] na podstawie badań z użyciem inhibitorów zasugerowali, że FNR może pełnić rolę dehydrogenazy oddechowej u *Anabaena variabilis*. Do podobnych wniosków doszli Scherer i wsp. [44] stwierdzając, że przeciwciała wytworzone przeciwko temu enzymowi hamowały całkowicie aktywność dehydrogenazy NADPH w roztworze oczyszczonego enzymu. W preparacie błon tylakoidów nie udało się jednak stwierdzić inhibicji przez przeciwciała. Ponieważ w preparatach białek otrzymanych z błon tylakoidów nie obserwowano innej aktywności dehydrogenazy, uznano, że FNR pełniąc funkcję dehydrogenazy znajduje się w "kieszeni" niedostępnej dla przeciwciał. Fotoredukcja  $\text{NADP}^+$  była przez te same przeciwciała hamowana w 60–70%.

Jak wynika z przytoczonych danych, u różnych gatunków sinic utlenianie równoważników redukcyjnych może być przeprowadzane przez dehydrogenazy specyficzne dla oddychania lub/i przez FNR. Odcinek od puli PQ do cytochromu  $c_{553}$  (jeżeli ten ostatni występuje) jest uważany przez wielu autorów za wspólny dla PET i RET. U sinic akceptorem elektronów z dehydrogenaz oddechowych i PSII jest plastochinon i inne chinony wykrywane w mniejszych ilościach. Szczegółową analizę chinonów występujących we fragmentach błon wykazujących aktywność oddechową *Anacystis nidulans* przedstawił Peschek [34]. Obok plastochinonu wykrył co najmniej 2 inne chinony – fyllochinon i "polarny naftochinon", występujące jednak w dużo mniejszych (10–100 x) ilościach. Najaktywniejszy w transporcie równoważników redukcyjnych okazał się być fyllochinon, plastochinon wykazywał mniejszą aktywność, ubichinon zaś (którego w badanych błonach stwierdzono jedynie śladowe ilości) – najmniejszą. Biorąc jednak pod uwagę ilości różnych chinonów, należy przypuszczać, że fyllochinon jest przenośnikiem dodatkowym. Według innych badaczy głównym chinonem związanym z łańcuchem oddechowym u sinic jest plastochinon, pełniący równocześnie funkcję akceptora elektronów z PSII. Aoki i Katoh [2] badali zmiany indukcji fluorescencji PSII po zablokowaniu przepływu elektronów przed pulą PQ i za nią stwierdzając, że w komórkach *Synechocystis* sp. PSII uczestniczy w redukcji PQ, a KCN przyspiesza tę reakcję. Natomiast w ciemności następowała reoksydacja PQ, która była silnie hamowana przez KCN. Obserwowano również silne przyspieszenie redukcji PQ w warunkach zahamowania utleniania cytochromu c (warunki beztlenowe, zablokowanie aktywności oksydazy cytochromu c przez KCN) lub w obecności substratów oddechowych (glukoza, fruktoza).

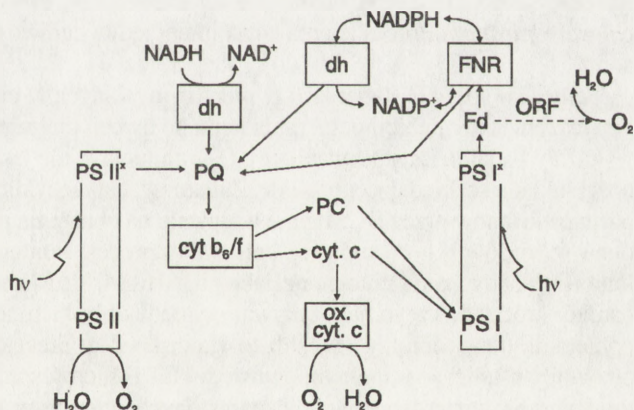
Natlenianie zawiesiny komórek w obecności glukozy powodowało utrzymywanie się stopnia utlenienia puli PQ na tym samym poziomie. Wpływ przepływu elektronów przez pulę PQ na stopień redukcji cytochromu c sugeruje, że również kompleks cytochromów  $b_6/f$  (oksydoreduktaza PQ:cytochrom c) i sam cytochrom c mogą być wspólnymi ogniwami w łańcuchu fotosyntetycznym i oddechowym. Potwierdzają to badania przeprowadzone z użyciem specyficznie działających inhibitorów. Na przykład stwierdzono, że w sferoplastach *Aphanocapsa* 6714 przekazywanie elektronów z  $\text{NAD(P)H}$  do PSI i dalej na  $\text{O}_2$  za pośrednictwem metylwiologeny zachodzi jedynie na świetle i jest wrażliwe na 2-jodo-6-izopropyl-3-metylo-2',4,4'-trinitrodifenyl-eter (DNP-INT), inhibitor kompleksu cytochromów  $b_6/f$  [41]. Zablokowanie przepływu elektronów na poziomie miejsca akceptorowego kompleksu cytochromów  $b_6/f$  przez 2,5-dibromo-3-metylo-*p*-benzochinon (DBMIB) powodowało zmiany w kinetyce redukcji  $\text{P700}^+$  i cytochromu c w całych komórkach *Synechococcus* [27].

Matthijs i wsp. [21,22] zaproponowali schemat wspólnego fotosyntetycznego i oddechowego przepływu elektronów od puli PQ do kompleksu cytochromów  $b_6/f$  w preparatach błon wyizolowanych z komórek *Plectonema boryanum*. W komórkach tej sinicy akceptorem elektronów z kompleksu cytochromów  $b_6/f$  jest plastocyjanina, która nie może być utleniana

przez oksydazę cytochromu c. Powoduje to rozgałęzienie wspólnego łańcucha transportu elektronów na poziomie kompleksu cytochromów  $b_6/f$ . Należy jednak zauważyć, że stwierdzono u sinic możliwość funkcjonalnego zastępowania plastocyjaniny przez cytochrom c w warunkach niedoboru miedzi [51]. Peschek [35] obserwował zmiany absorbancji cytochromu  $b_{563}$  i cytochromu f związane z ich aktywnością oksydoredukcyjną w preparatach błon z *Anacystis nidulans*. Zmiany te były podobne niezależnie od tego, czy utlenianie przeprowadzano w obecności tlenu przy udziale oksydazy cytochromu c, czy w obecności metylwio-logenu i na świetle przy udziale PSI. O udziale kompleksu cytochromów  $b_6/f$  w obu łańcuchach transportu elektronów może świadczyć również stwierdzenie tylko jednej kopii genów kodujących polipeptydy cytochromu f i centrum Fe-S w genomie *Nostoc PCC 7906* [16]. W błonach sferoplastów termofilnego gatunku *Mastigocladus laminosus* wykazano zwiększenie zużycia  $O_2$  po oświetleniu. Zablokowanie aktywności PSII powodowało znaczne zmniejszenie tego efektu. Zjawisko to można tłumaczyć pewnego rodzaju konkurencją o elektrony między RET a PET. Dodanie KCN hamowało zużycie tlenu (inhibicja oksydazy cytochromu c) indukowane dodaniem NADH, a oświetlenie błon usuwało ten efekt [7] (przekazywanie elektronów z PSI na tlen – reakcja Mehlera). Alpes i wsp. [1] stwierdzili porównywalny stopień inhibicji zużycia tlenu w błonach tylakoidów *Nostoc muscorum* ATCC 29151 w ciemności i na świetle po dodaniu przeciwciał przeciw cytochromowi  $c_{553}$ .

Wszystkie przytoczone tu fakty świadczą o tym, że przy nieobecności plastocyjaniny istnieje wspólny odcinek PET i RET między PQ a cytochromem c. Po pojawieniu się plastocyjaniny rozgałęzienie następuje prawdopodobnie na poziomie kompleksu cytochromowego  $b_6/f$ , przy czym zapewne część cytochromu c jest również włączana w PET.

Stwierdzono, że oksydaza cytochromu c, przekazująca elektrony z cytochromu  $c_{553}$  na  $O_2$  z *Anabaena variabilis* jest cytochromem typu  $aa_3$  [12]. W komórkach *Anacystis nidulans* powinowactwo cytochromu c do oksydazy cytochromu c lub PSI zależy od siły jonowej [28]. Przy niskiej sile jonowej elektrony są przenoszone głównie do PSI, natomiast przy wysokiej – do oksydazy cytochromu c. Ponieważ siła jonowa wewnątrz tylakoidów wzrasta podczas aktywności fotochemicznej, autorzy sugerują regulacyjne znaczenie tego zjawiska. Elektrony z PSI są przekazywane na ferredoksynę i z niej na tlen cząsteczkowy przez słabo zbadane czynniki



Rys. 2. Oddechowy i fotosyntetyczny łańcuch transportu elektronów w błonach tylakoidów sinic (opracowano na podstawie publikacji [10, 21, 42]): PS – fotosystem, PQ – plastochinon, cyt.  $b_6/f$  – kompleks cytochromowy  $b_6/f$ , PC – plastocyjanina, Fd – ferredoksyna, FNR – oksydoreduktaza ferredoksyna:  $NADP^+$ , ORF – układ redukujący tlen w reakcji Mehlera, pozostałe oznaczenia jak na rys. 1; plastocyjanina i cytochrom c mogą występować wymiennie lub obok siebie; należy zauważyć, że oksydoreduktaza ferredoksyna:  $NADP^+$  może pełnić również funkcję dehydrogenazy  $NADPH$



redukujące (reakcja Mehlera) [10], bądź też na  $\text{NADP}^+$  przez oksydoreduktazę ferredoksyna:  $\text{NADP}^+$  albo na kompleks cytochromów b<sub>6</sub>/f do cyklicznego fotosyntetycznego transportu elektronów (rys. 2). Zredukowana ferredoksyna może też być donorem elektronów w różnych innych procesach.

### III. EUKARIONTY

#### a. ZIELENICE

U eukariontów układ fotosyntetycznych przenośników elektronów jest zlokalizowany w chloroplastach a układ oddechowy – w mitochondriach. Wzajemne oddziaływanie tych dwu układów nie jest związane bezpośrednio z procesami transportu elektronów, lecz opiera się na procesach regulacji, których omówienie wykracza poza temat niniejszej pracy. Uzyskano jednakże dane, z których wynika, że zarówno w chloroplastach glonów, jak i roślin wyższych funkcjonuje oksydacyjny transport elektronów.

Bennoun [5] badał zmiany stopnia utlenienia puli plastochinonu na podstawie zmian kinetyki fluorescencji PSII w błonach tylakoidów *Chlamydomonas reinhardtii* i *Chlorella pyrenoidosa*. U *Chlamydomonas* dodanie CO, NO, KCN, DCCD,  $\text{NaN}_3$  (inhibitory oksydazy cytochromowej) lub warunki beztlenowe wywoływały znaczny wzrost redukcji puli PQ, natomiast SHAM nie powodował dostrzegalnych zmian w kinetyce fluorescencji. U *Chlorella* wykazano wzrost redukcji puli PQ po dodaniu SHAM lub  $\text{NaN}_3$ , a dodanie KCN lub CO nie powodowało zmian. Wykazano również wzrost stopnia redukcji puli PQ po dodaniu NADH lub NADPH. Fakty te Bennoun uznał za świadectwo obecności w chloroplastach tych zielenic oksydacyjnego łańcucha przenośników elektronów, który nazwał chlororespiracją (ang. *chlororespiration*). Proces ten ma co najmniej jedno ogniwo wspólne z PET – pulę plastochinonu.

Peltier i wsp. [32] stwierdzili w przetrzymywanych w ciemności komórkach *Chlamydomonas* zjawisko inhibicji pobierania tlenu po dwóch pierwszych błyskach (2  $\mu\text{s}$ ) światła. Jak wykazały badania z zastosowaniem  $^{18}\text{O}_2$ , inhibicja ta nie jest związana z obniżeniem aktywności układu rozkładającego wodę. Zahamowanie niecyklicznego fotosyntetycznego transportu elektronów przez DCMU nie wpływało na obniżenie pobierania tlenu. Wzrost stężenia tlenu w środowisku stymulował opisywany proces. Ponieważ nie był on zaburzany przez inhibitory oddychania mitochondrialnego (SHAM, 1  $\mu\text{M}$  antymycyna A), a także z powodu bardzo krótkiego czasu, jaki upływał pomiędzy błyskiem a obserwowanym zmniejszeniem pobierania tlenu, autorzy określili to zjawisko jako efekt chlororespiracji. Dalsze badania pozwoliły ustalić, że wspólnym ogniwem PET i chlororespiracji jest pula plastochinonu [38]. Ponieważ nie stwierdzono wpływu określonych inhibitorów (myksotiazolu, antymycyny A w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ ) na aktywność PET w warunkach powodujących inhibicję chlororespiracji, wykluczono możliwość redukcji tlenu w reakcji Mehlera.

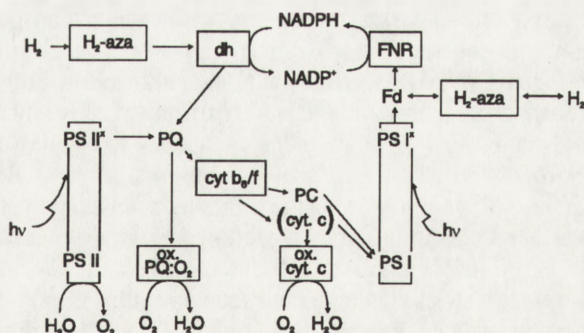
Zasugerowano również udział w procesie chlororespiracji jednego lub dwóch cytochromów, których obecność stwierdzili Rolfe i wsp. [40] w błonach tylakoidów mutantu F18 *Chlamydomonas* (pozbawionego kompleksu cytochromów b<sub>6</sub>/f). Zostało to potwierdzone przez Peltiera i Schmidta [33]. W preparatach uzyskiwanych z błon tylakoidów *Chlamydomonas* hodowanego w warunkach niedoboru azotu stwierdzili oni duże ilości oksydoreduktazy

NAD(P)H:PQ i wymienionych wyżej cytochromów. Jednocześnie komórki glonu hodowane w tych warunkach wykazywały ok. 10-krotne zwiększenie hamowania zużycia tlenu po pierwszych błyskach światła.

Obserwowano też degradację  $^{14}\text{C}$ -glukozy do  $^{14}\text{CO}_2$  w izolowanych chloroplastach *Chlamydomonas reinhardtii*. Proces ten był hamowany przez znane inhibitory oddychania – rotenon, SHAM, DBMIB, antymycynę A,  $\text{NaN}_3$  i inne [45]. Potwierdza to udział chlororespiracji w oksydacyjnym procesie rozpadu glukozy, ponieważ inne możliwe procesy przekształcające ją w  $\text{CO}_2$  nie zawierają ogniw wrażliwych na stosowane inhibitory.

Z danych przedstawionych wyżej wynika jednoznacznie, że w chloroplastach *Chlamydomonas* funkcjonuje fotosyntetyczny i chlororespiracyjny transport elektronów z pulą PQ jako miejscem "skrzyżowania" obydwu tych szlaków. Ogniwa chlororespiracji utleniające PQ przez  $\text{O}_2$  są słabo poznane. Można zaproponować schemat obejmujący dwie równoległe drogi utleniania PQ z oksydazą cytochromową wrażliwą na KCN i "alternatywną" wrażliwą na SHAM, jak również schemat, w którym opisane przez Rolfe i wsp. [40] cytochromy tworzą jedną sekwencję, przekazującą elektrony z PQ na tlen [45]. Poza PET i postulowanym oksydacyjnym transportem elektronów, w chloroplastach *Chlamydomonas* stwierdzono również obecność dwu innych szlaków transportu elektronów zależnych od obecności wolnego wodoru w środowisku [20]. Pierwszy z nich, określany jako fotoredukcja, polega na redukcji NADP kosztem  $\text{H}_2$  przy udziale hydrogenazy, po czym elektrony z powstałego NADPH są przekazywane na ferredoksynę i dalej według schematu cyklicznego PET na PQ i PS I, skąd przekazywane są poprzez Fd i FNR na  $\text{NADP}^+$ . Drugi proces, zwany reakcją tlenowodorową (ang. *oxyhydrogen reaction*) przebiega w ciemności i polega na przepływie elektronów z  $\text{H}_2$  do PQ w drodze opisanej dla fotoredukcji albo z hydrogenazy bezpośrednio na kompleks dehydrogenazy NADPH. Plastochinon jest następnie utleniany przez opisane wyżej oksydazy przekazujące elektrony na  $\text{O}_2$ . Ponieważ zjawisko to prowadzi również do wiązania  $\text{CO}_2$ , można je uważać za chemosyntezę. Obydwa opisane procesy zachodzą w obecności  $\text{O}_2$  i  $\text{H}_2$ . Natomiast w warunkach beztlenowych i na świetle obserwuje się wydzielanie przez *Chlamydomonas* wolnego wodoru; powstaje on w wyniku "odwrotnego" przekazywania elektronów z ferredoksyny na  $\text{H}^+$  przy udziale hydrogenazy.

Na podstawie analizy wymiany  $^{16}\text{O}_2$  na  $^{18}\text{O}_2$  przez *Chlamydomonas* Sültemeyer i wsp. [48] doszli do wniosku, że w środowisku alkalicznym (pH 8), gdy wymagany jest aktywny transport  $\text{HCO}_3^-$  do komórki, dodatkowym procesem



Rys. 3. Systemy transportu elektronów w chloroplastach *Chlamydomonas reinhardtii* (opracowano na podstawie publikacji [13, 20, 42]):  $\text{H}_2$ -aza – hydrogenaza, ox. PQ:  $\text{O}_2$  – układ przenoszący elektrony z plastochinonu na  $\text{O}_2$  (bliższe informacje w tekście), pozostałe oznaczenia jak na rys. 1 i 2; należy podkreślić, że cytochrom c zastępuje plastocjaninę tylko w specyficznych warunkach, np. przy niedoborze miedzi w środowisku



zaangażowanym w produkcję ATP jest fotosyntetyczny transport pseudocykliczny: elektrony z PS I są przekazywane na  $O_2$ , a powstające rodniki ponadtlenkowe ulegają dysmutacji. Szlaki transportu elektronów w chloroplastach *Chlamydomonas* przedstawiono na rysunku 3.

Oksydacyjny transport elektronów u zielenic i innych glonów eukariotycznych poza *Chlamydomonas* i *Chlorella* był badany u prymitywnej zielenicy *Mantoniella squamata* (*Prasinophyceae*) [50]. Przypadek ten jest ciekawy ze względu na występowanie w PET obok plastocyaniny również cytochromu c, którego obecność powoduje, że wspólnymi ogniwami fotosyntetycznego i oksydacyjnego transportu elektronów są także kompleks cytochromów  $b_6/f$  i cytochrom c, podobnie jak u sinic. Stwierdzono, że cytochrom c może występować w warunkach silnego niedoboru miedzi obok lub zamiast plastocyaniny również w chloroplastach innych zielenic – *Chlamydomonas reinhardtii* [13] i *Pediastrum boryanum* [26].

Rola fizjologiczna chlororespiracji u zielenic była badana przez Gfeller i Gibbsa [11]. Stwierdzili oni, że jest to proces zaangażowany m.in. w utlenianie równoważników redukcyjnych, powstających przy procesach przenoszenia węglowodanów z chloroplastów do cytoplazmy.

## b. ROŚLINY WYŻSZE

U roślin wyższych zjawisko oksydacyjnego transportu elektronów w chloroplastach i jego powiązania z transportem fotosyntetycznym jest słabo poznane. W izolowanych chloroplastach szpinaku Singh i wsp. [45] wykazali obecność procesu powodującego rozkład fruktozy do  $CO_2$ , wrażliwego na inhibitory, takie jak: rotenon, SHAM, DBMIB, antymycynę A,  $NaN_3$ . Wskazuje to na obecność w chloroplastach przenośników elektronów związanych z oksydacją NAD(P)H – dehydrogenaz NAD(P)H:PQ, oksydaz końcowych (wrażliwych na SHAM i  $NaN_3$ ) oraz na udział w tym procesie PQ i cytochromów wrażliwych na antymycynę A. Asada i wsp. badając wielkość puli elektronów uczestniczących w cyklicznym transporcie elektronów wykazali, że u roślin  $C_3$  pula ta wynosi 12–28 elektronów na  $P_{700}$  [3], natomiast w roślinach  $C_4$  ocenili ją na ok. 225 [4]. Ilości te znacznie przekraczają ilości elektronów czynnych w "klasycznym" modelu cyklicznego transportu elektronów. Na tej podstawie autorzy ci sugerują, że w cyklicznym transporcie elektronów uczestniczy NADP(H) i dehydrogenaza NADPH, a u roślin  $C_4$  dodatkowo również pula fosforanów trioz. Wskazuje to na obecność enzymów utleniających równoważniki redukcyjne w układzie fotosyntetycznym.

Garab i wsp. [9] badali interakcje między fotosyntetycznym i oksydacyjnym transportem elektronów u roślin dwuliściennych obserwując efekt elektrochromowy, zmiany spektralne kompleksu cytochromów  $b_6/f$  oraz stopień redukcji puli plastochinonu. Obecność w środowisku reakcji 0,5–5 mM KCN powodowała zwiększenie zarówno efektu elektrochromowego, jak i aktywności kompleksu cytochromów  $b_6/f$ , niezależnie od aktywności PSII. Obserwowano również zwiększenie stopnia redukcji puli PQ pod wpływem SHAM. W izolowanych chloroplastach po dodaniu inhibitora PSII (DCMU) i donora elektronów ( $HSO_3^-$  lub askorbinian) obserwowano wzrost aktywności PSI o ok. 40% po dodaniu KCN. Wykazano również zwiększenie ilości aktywnych centrów reakcji PSI w protoplastach poddanych działaniu KCN, niezależnie od stanu funkcjonalnego PSII.

Na podstawie przedstawionych faktów można więc zaproponować występowanie w chloroplastach roślin wyższych oksydacyjnego układu przenośników elektronów, który przypominałby układ funkcjonujący w chloroplastach zielenic: dehydrogenazy NAD(P)H przekazują elektrony na PQ, który jest ogniwem wspólnym z transportem fotosyntetycznym. Z puli

PQ elektrony są przenoszone, zapewne przez nieznane jeszcze przENOŚniki, na końcowe oksydazy wrażliwe na inhibitory oksydaz mitochondrialnych i w końcu na tlen. Nie jest znana rola fizjologiczna tego procesu. Garab i wsp. [9] stwierdzili w rozwijających się liściach intensywne pobieranie tlenu w ciemności, które w części przypisują procesom oksydacyjnym w chloroplastach. Może to sugerować udział tego procesu w transporcie równoważników redukcyjnych przez błony chloroplastów, podobnie jak u zielenic.

#### IV. PODSUMOWANIE

U sinic i niesiarkowych bakterii purpurowych wykryto ogniwa wspólne dla fotosyntetycznego i oddechowego systemu transportu elektronów. W chloroplastach zielenic i roślin wyższych stwierdzono zjawisko oksydacyjnego transportu elektronów, nazwane chloro-respiracją, wykazujące również wspólne ogniwa z fotosyntetycznym transportem elektronów. We wszystkich badanych przypadkach wspólnym ogniwem jest pula chinonu, u bakterii – ubichinon, u pozostałych – plastochinon.

W komórkach purpurowych bakterii niesiarkowych (*Rhodospirillaceae*) zachodzi cykliczny transport elektronów wokół centrum reakcji fotochemicznej przy udziale ubichinonu, kompleksu cytochromów  $b/c_1$  i cytochromu  $c_2$ . Ta sama pula ubichinonu może też być zredukowana elektronami z dehydrogenazy NADH oraz utleniana albo przez układ: cytochrom  $b/c_1$ , cytochrom  $c_2$ , oksydaza cytochromu  $c$ , albo przez oksydazę alternatywną (oksydazę ubichinonu – cytochrom  $b_{250}$ ).

U sinic i w chloroplastach eukariontów pula plastochinonu, zredukowana uprzednio przez PSII lub dehydrogenazy NAD(P)H, jest utleniana przez kompleks cytochromów  $b_6/f$  lub przez "alternatywną" oksydazę końcową niewrażliwą na KCN. Jeżeli kompleks cytochromowy  $b_6/f$  jest utleniany przez plastocyjaninę, to dalej zachodzi fotosyntetyczny transport elektronów. Jeżeli natomiast w miejscu plastocyjaniny występuje cytochrom  $c$ , jak ma to miejsce u niektórych sinic i prymitywnych zielenic, a także przy niedoborze miedzi, to elektrony mogą być przekazywane albo na PSI, albo do końcowej oksydazy cytochromu  $c$ . Być może jest to powodem zastąpienia w układach fotosyntetycznych cytochromu  $c$  przez plastocyjaninę.

U niektórych sinic stwierdzono działanie oksydoreduktazy ferredoksyna:NADP jako dehydrogenazy oddechowej. Może to potwierdzać hipotezę o pochodzeniu łańcucha oddechowego z fotosyntetycznego systemu transportu elektronów [29]. Zjawisko chloro-respiracji w chloroplastach wydaje się być pozostałością szlaku oddechowego przodków sinic, z których przez endosymbiozę powstały chloroplasty. Szlak ten uległ prawdopodobnie uwstecznieniu w procesie ewolucji.

#### PIŚMIENNICTWO

- [1] ALPES I, STÜRZL E, SCHERER S, BÖGER P. Interaction of photosynthetic and respiratory electron transport in blue-green algae: Effect of a cytochrome  $c$ -553 specific antibody. *Z Naturforsch* 1984; **39c**: 623–626.
- [2] AOKI M, KATOH S. Size of the plastoquinone pool functioning in the photosynthetic and respiratory electron transport of *Synechococcus* sp. *Plant Cell Physiol* 1983; **24**: 1379–1386.
- [3] ASADA K, HEBER U, SCHREIBER U. Pool size of electrons that can be donated to  $P700^+$ , as determined in intact leaves: donation to  $P700^+$  from stromal components via the intersystem chain. *Plant Cell Physiol* 1992; **33**: 927–932.



- [4] ASADA K, HEBER U, SCHREIBER U. Electron flow to the intersystem chain from stromal components and cyclic electron flow in maize chloroplast, as detected in intact leaves by monitoring redox change of P700 and chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Physiol* 1993; **34**: 39–50.
- [5] BENNOUN P. Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 4352–4356.
- [6] BERGER S, ELLERSIEK U, STEINMÜLLER K. Cyanobacteria contain a mitochondrial complex I-homologous NADH-dehydrogenase. *FEBS Letters* 1991; **286**: 129–132.
- [7] BINDER A, HAUSER R, KROGMANN D. Isolation and characterization of three types of membranes from the cyanobacterium (blue-green alga) *Synechocystis* PCC 6714. *Biochim Biophys Acta* 1984; **765**: 241–246.
- [8] COTTON PJ, CLARK AJ, JACKSON JB. Interaction between the respiratory and photosynthetic electron transport chains of intact cells of *Rhodospseudomonas capsulata* mediated by membrane potential. *Eur J Biochem* 1983; **130**: 581–587.
- [9] GARAB G, LAJKÓF, MUSTÁRDY L, MÁRTON L. Respiratory control over electron transport in chloroplasts of higher-plant cells: evidence for chlororespiration. *Planta* 1989; **179**: 349–358.
- [10] GIMMLER H. Photophosphorylation in vivo. [w] Encyclopedia of Plant Physiology, Pirson A, Zimmermann MH. [red.] New Series, Vol. 5: Photosynthesis I. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1977: 448–472.
- [11] GFELLER RP, GIBBS M. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. II. Role of plastoquinone. *Plant Physiol* 1985; **77**: 509–511.
- [12] HÄFELE U, SCHERER S, BÖGER P. Cytochrome  $aa_3$  from heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*: isolation and spectral characterization. *Biochim Biophys Acta* 1988; **934**: 186–190.
- [13] HILL KL, MERCHANT S. In vivo competition between plastocyanin and a copper-dependent regulator of the *Chlamydomonas reinhardtii* cytochrome  $c_6$  gene. *Plant Physiol* 1992; **100**: 319–326.
- [14] HOCHINS JP, HIND G. Pyridine nucleotides and  $H_2$  as electron donors to the respiratory and photosynthetic electron-transfer chains and to nitrogenase in *Anabaena* heterocysts. *Biochim Biophys Acta* 1982; **682**: 86–96.
- [15] ITOH M, MIZUKAMI S, MATSUURA K, SATOH T. Involvement of cytochrome  $bc_1$  complex and cytochrome  $c_2$  in the electron-transfer pathway for NO reduction in a photodenitrifier, *Rhodobacter sphaeroides* f.s. *denitrificans*. *FEBS Letters* 1989; **244**: 81–84.
- [16] KALLAS T, SPILLER S, MALKIN R. Primary structure of transcribed genes encoding the Rieske Fe-S and cytochrome f proteins of the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7906. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5794–5798.
- [17] KEISTER DL. Respiration vs. photosynthesis. [w] The Photosynthetic Bacteria. Clayton RK, Sistrom WS. [red.] New York, London: Plenum Press 1978: 849–856.
- [18] LOCKAU W, PFEFFER S. A cyanobacterial ATPase distinct from the coupling factor of photophosphorylation. *Z Naturforsch* 1982; **37c**: 658–664.
- [19] LOCKAU W, PFEFFER S. ATP-dependent calcium transport in membrane vesicles of the cyanobacterium, *Anabaena variabilis*. *Biochim Biophys Acta* 1983; **733**: 124–132.
- [20] MAIONE TE, GIBBS M. Association of the chloroplastic respiratory and photosynthetic electron transport chains of *Chlamydomonas reinhardtii* with photoreduction and the oxyhydrogen reaction. *Plant Physiol* 1986; **80**: 364–368.
- [21] MATTHIJS HCP, LUDERUS EME, LÖFFLER HJM, SCHOLTS MJC, KRAAYENHOF R. Energy metabolism in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Participation of the thylakoid photosynthetic electron transfer chain in the dark respiration of NADPH and NADH. *Biochim Biophys Acta* 1984; **766**: 29–37.
- [22] MATTHIJS HCP, LUDERUS EME, LÖFFLER HJM, SCHOLTS MJC, KRAAYENHOF R. Energy metabolism in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Oxidative phosphorylation and respiratory pathways. *Biochim Biophys Acta* 1984; **766**: 38–44.
- [23] MOLITOR V, PESCHEK GA. Respiratory electron transport in plasma and thylakoid membrane preparations from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett* 1986; **195**: 145–150.
- [24] MOSER D, NICHOLLS P, WASTYN M, PESCHEK GA. Acidic cytochrome  $c_6$  of unicellular cyanobacteria is an indispensable and kinetically competent electron donor to cytochrome oxidase of plasma and thylakoid membranes. *Biochem International* 1991; **24**: 757–768.
- [25] MUSSER SM, STOWELL MHB, CHAN SI. Comparison of ubiquinol and cytochrome c terminal oxidases. An alternative view. *FEBS Lett* 1993; **327**, 131–136.
- [26] NAKAMURA M, YAMAGISHI M, YOSHIZAKI F, SUGIMURA Y. The syntheses of plastocyanin and cytochrome c-553 are regulated by copper at the pre-translational level in a green alga, *Pediastrum boryanum*. *J Biochem* 1992; **111**: 219–224.
- [27] NANBA M, KATOH S. Effects of dibromothymoquinone on oxidation-reduction reactions and the midpoint potential of the Rieske iron-sulfur center in photosynthetic electron transport of *Synechococcus* sp. *Biochim Biophys Acta* 1984; **767**: 396–403.

- [28] NICHOLLS P, OBINGER C, NIEDERHAUSER H, PESCHEK GA. Cytochrome c and c-554 oxidation by membranous *Anacystis nidulans* cytochrome oxidase. *Biochem Soc Trans* 1991; **19**: 252.
- [29] OLSON JM. Evolution of photosynthetic and respiratory prokaryotes and organelles. *Annals NY Acad Sci* 1981; **361**: 8–19.
- [30] OMATA T, MURATA N. Isolation and characterization of three types of membranes from the cyanobacterium (blue-green alga) *Synechocystis* PCC 6714. *Arch Microbiol* 1984; **139**: 113–116.
- [31] OMATA T, MURATA N. Cytochromes and prenylquinones in preparations of cytoplasmic and thylakoid membranes from the cyanobacterium (blue-green alga) *Anacystis nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 1984; **766**: 395–402.
- [32] PELTIER G, RAVENEL J, VERMÉGLIO A. Inhibition of a respiratory activity by short saturating flashes in *Chlamydomonas*: evidence for a chlororespiration. *Biochim Biophys Acta* 1987; **893**: 83–90.
- [33] PELTIER G, SCHMIDT GW. Chlororespiration: an adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 4791–4795.
- [34] PESCHEK GA. Restoration of respiratory electron-transport reactions in quinone-depleted particle preparations from *Anacystis nidulans*. *Biochem J* 1980; **186**: 515–523.
- [35] PESCHEK GA. The cytochrome f-b electron-transport complex. *Biochem J* 1983; **210**: 269–272.
- [36] PESCHEK GA, HINTERSTOISSER B, WASTYN M, KUNTNER O, PINEAU B, MISSBICHLER A, LANG J. Chlorophyll precursors in the plasma membrane of a cyanobacterium, *Anacystis nidulans*. *J Biol Chem* 1989; **264**: 11827–11832.
- [37] PESCHEK GA, HINTERSTOISSER B, PINEAU B, MISSBICHLER A. Light-dependent NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase activity in purified plasma membrane from cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; **162**: 71–78.
- [38] RAVENEL J, PELTIER G. Inhibition of chlororespiration by myxothiazol and antimycin A in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res* 1991; **28**: 141–148.
- [39] RICHAUD P, MARRS BL, VERMEGLIO A. Two modes of interaction between photosynthetic and respiratory electron chains in whole cells of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biochim Biophys Acta* 1986; **880**: 256–269.
- [40] ROLFE SA, SANGUARMSEMSRI M, BENDALL DS. Cytochrome b-560, a new component of thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1987; **894**: 434–442.
- [41] SANDMANN G, MALKIN R. NADH and NADPH as electron donors to respiratory and photosynthetic electron transport in the blue-green alga, *Aphanocapsa*. *Biochim Biophys Acta* 1983; **725**: 221–224.
- [42] SCHERER S. Do photosynthetic and respiratory electron transport chains share redox proteins? *TIBS* 1990; **15**: 458–462.
- [43] SCHERER S, ALMON H, BÖGER P. Interaction of photosynthesis, respiration and nitrogen fixation in cyanobacteria. *Photosynthesis Res* 1988; **15**: 95–114.
- [44] SCHERER S, ALPES I, SADOWSKI H, BÖGER P. Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase is the respiratory NADPH dehydrogenase of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Arch Biochem Biophys* 1988; **267**: 228–235.
- [45] SINGH KK, CHEN C, GIBBS M. Characterization of an electron transport pathway associated with glucose and fructose respiration in the intact chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii* and spinach. *Plant Physiol* 1992; **100**: 327–333.
- [46] SMITH L, PINDER PB. Oxygen-linked electron transport and energy conservation. [w] The Photosynthetic Bacteria, Clayton RK, Sistrom WS. [red.] New York, London: Plenum Press: 1978: 849–856.
- [47] STÜRZL E, SCHERER S, BÖGER P. Interaction of respiratory and photosynthetic electron transport, and evidence for membrane-bound pyridine-nucleotide dehydrogenases in *Anabaena variabilis*. *Physiol Plant* 1984; **60**: 479–483.
- [48] SÜLTEMEYER D, BIEHLER K, FOCK HP. Evidence for the contribution of pseudocyclic photophosphorylation to the energy requirement of the mechanism for concentrating inorganic carbon in *Chlamydomonas*. *Planta* 1983; **189**: 235–242.
- [49] VENTUROLI G, FENOLL C, ZANNONI D. On the mechanism of respiratory and photosynthetic electron transfer in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim Biophys Acta* 1987; **892**: 172–184.
- [50] WILHELM C, DUVAL J-C. Fluorescence induction kinetics as a tool to detect a chlororespiratory activity in the prasinophycean alga, *Mantoniella squamata*. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1016**: 197–202.
- [51] ZHANG L, MC SPADEN B, PAKRASI HB, WHITMARSH J. Copper-mediated regulation of cytochrome c<sub>553</sub> and plastocyanin in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J Biol Chem* 1992; **267**, **27**: 19054–19059.

Otrzymano: 05.07.1993 r.

Przyjęto: 20.11.1993 r.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków





# MUTANTY FITOCHROMOWE W BADANIACH MECHANIZMÓW FOTOMORFOGENEZY ROŚLIN

## PHYTOCHROME MUTANTS IN PLANT PHOTOMORPHOGENESIS MECHANISMS INVESTIGATIONS

Andrzej TRETYN, Jan KOPCEWICZ

Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, Instytut Biologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń

**Streszczenie.** Fitochrom jest chromoproteiną występującą w dwóch spektralnie odmiennych formach: Pr – absorbującej światło czerwone i Pfr – pochłaniającej światło dalekiej czerwieni. U roślin wyższych fitochrom kodowany jest przez małą rodzinę genów. Występujący w tkankach etiolowanych roślin fitochrom labilny (phyA) kodowany jest przez gen *phyA*. Ciągle mało jest wiadomo na temat produktu transkrypcji genu *phyB*, kodującego cząsteczki barwnika funkcjonującego w tkankach roślin zielonych (tzw. fitochrom stabilny, phyB). Bardzo użytecznym "narzędziem" pomocnym w badaniach biologicznej funkcji każdej z form fitochromu są fitochromowe mutanty oraz rośliny transgeniczne. Mutanty fitochromowe można zakwalifikować do dwóch podstawowych grup: 1) mutanty pozbawione fitochromu lub mające fitochrom o zmienionej budowie, 2) rośliny, u których różne mutacje prowadzą do zakłóceń w funkcjonowaniu łańcucha transdukcji sygnału świetlnego. Badania prowadzone z użyciem mutantów fitochromowych i fitochromowych roślin transgenicznych wskazują, że *phyA* pełni główną rolę w procesie deetiolacji roślin, podczas gdy *phyB* reguluje procesy wzrostowe u roślin zielonych.

**Słowa kluczowe:** fitochrom, mutanty fitochromowe, fitochromowe rośliny transgeniczne

**Summary.** Phytochrome is a chromoprotein that exists in two spectrally distinct, photoreversible forms: Pr, the red absorbing form, and Pfr, the far-red absorbing form. In higher plants phytochrome is encoded by a small multigene family. *PhyA* encodes the well-characterized etiolated-tissue labile phytochrome (phyA). The product of the *phyB*, which has properties resembling those of green tissue (stable phytochrome; phyB) is as yet poorly characterized. To assign biological function of each of the molecular species of phytochrome, phytochrome mutants and transgenic plants would be of great help. There are two basic classes of phytochrome mutants: 1) phytochrome mutant either lacking or having a modified photoreceptor, and 2) phytochrome transduction chain mutants modified in some part of transduction chain leading to the array of physiological responses under its control. On the basis of studies with phytochrome mutants and transgenic plants, it is most likely that *phyA* plays a major role in the greening process whereas *phyB* regulates growth and developmental responses of green plants.

**Key words:** phytochrome, phytochrome mutants, phytochrome transgenic plants.

**Wykaz stosowanych skrótów:** P – fitochrom; Pr – forma fitochromu pochłaniająca światło czerwone; Pfr – forma fitochromu pochłaniająca światło dalekiej czerwieni; R – światło czerwone; FR – światło dalekiej czerwieni; *phyA* – fitochrom labilny; *phyB* – fitochrom stabilny; EOD-FR (ang. *End-Of-Day-FR*) – końcowodniowe naświetlanie daleką czerwienią.



## 1. FITOCHROM W KONTROLI WZROSTU I ROZWOJU ROŚLIN

Wpływ energii świetlnej na organizmy roślinne jest bardzo zróżnicowany. Ogólnie jest znane wykorzystanie energii słonecznej przez system chlorofilowy w celu syntezy związków organicznych. Światło odgrywa jednak również decydującą rolę w procesach wzrostu i rozwoju roślin. Pod terminem fotomorfogeneza przyjmuje się niezależny od fotosyntezy wpływ światła na wzrost, rozwój i różnicowanie się roślin. Procesy fotomorfogenetyczne zachodzą podczas całego cyklu życiowego rośliny i obejmują dojrzwienie i kiełkowanie nasion, wzrost łodygi, powiększanie się liści, rozwój chloroplastów, syntezę chlorofilu oraz wielu ważnych związków organicznych, jak również kwitnienie, owocowanie i starzenie się roślin [25]. Światło modyfikuje normalny, wynikający z realizacji programu genetycznego wzrost i rozwój roślin. Rośliny reagują na szeroki zakres światła, od bliskiego ultrafioletu poczynając, a na dalekiej czerwieni kończąc. Procesy indukowane u roślin przez światło czerwone i daleką czerwień kontrolowane są przez fitochrom. Obecność tego fotoreceptora stwierdzono u przedstawicieli wszystkich dotąd przebadanych roślin niższych i wyższych. Ponieważ fitochrom, poza czerwienią i daleką czerwienią, absorbuje również w zakresie światła niebieskiego i bliskiego ultrafioletu, w pewnych typach reakcji barwnik ten może pełnić również funkcję receptora promieniowania krótkofalowego. Oprócz fitochromu u roślin stwierdzono obecność fotoreceptorów absorbujących światło niebieskie i bliski ultrafiolet. Najlepiej poznanym z nich jest kryptochrom, który występuje w komórkach grzybów, roślin niższych i wyższych [45].

Fitochrom występuje w dwóch, różniących się właściwościami spektralnymi, lecz wzajemnie fotoodwracalnych formach molekularnych: Pr i Pfr. Pierwsza z tych form absorbując światło czerwone przekształca się w drugą i odwrotnie, Pfr pod wpływem dalekiej czerwieni ulega konwersji do Pr. Tylko forma Pfr fitochromu jest fizjologicznie aktywna [44].

Fitochrom jest chromoproteiną zbudowaną z otwartej, tetrapirolowej grupy chromoforowej i w zależności od gatunku rośliny 116–128-kilodaltonowego polipeptydu. W przypadku najlepiej dotąd poznanej cząsteczki fitochromu owsa w skład jego domeny białkowej wchodzi 1128 aminokwasów. Grupa chromoforowa połączona jest z białkiem fitochromu poprzez wiązanie tioeterowe przy 321 aminokwasie łańcucha polipeptydowego [44]. Natywna cząsteczka fitochromu jest homodimerem, którego podjednostki wiążą się ze sobą poprzez wiązania jonowe i siły elektrostatyczne [44].

Fitochrom jest syntetyzowany w ciemności w formie Pr, która akumulowana jest w tkankach roślin etiolowanych. Ta forma barwnika jest jedynie trwała w ciemności. Naświetlaniu rośliny R towarzyszy fotokonwersja Pr do Pfr i szybko postępująca destrukcja fitochromu. Niemniej jednak nawet u roślin rosnących na ciągłym świetle obserwuje się obecność stałego, niskiego poziomu P (ok. 5% w porównaniu do ilości fitochromu występującego w tkankach etiolowanych roślin). Biorąc za podstawę tempo degradacji fitochromu wyróżniono dwie jego fizjologiczne formy: labilną – oznaczoną jako phyA i stabilną – określaną jako phyB [42]. Analiza komplementarnych do mRNA odcinków DNA (tzw. cDNA) potwierdziła możliwość istnienia u kilku przebadanych gatunków roślin odmiennych transkryptów kodujących białkowe składniki (oznaczane jako PHYA i PHYB) obu wymienionych typów fitochromu. Wykazano ponadto, że u rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) mogą funkcjonować co najmniej trzy różne geny: *phyC*, *phyD* i *phyE* kodujące odmienne fitochromy [40]. W genomie owsa stwierdzono natomiast występowanie wielu kopii genu *phyA* kodują-

cego izoformy phyA [16]. Obecnie uważa się, że u roślin funkcjonuje nie jeden a kilka typów fitochromów.

Światło wywiera znaczący wpływ na rozwój rośliny i jej wewnątrzkomórkowy metabolizm. Siewki etiolowanych (wyrosłych w ciemności) roślin dwuliściennych charakteryzują się wydłużonym hypokotylem, małymi, zwiniętymi liśćmi, obecnością etioplastów oraz niskim lub zerowym poziomem ekspresji genów jądrowych kodujących białka chloroplastowe: białko wiążące chlorofil a-b (LHCP) i małą podjednostkę karboksylazy rybulozobisfosforanowej (RBCS) [48]. Z drugiej strony rośliny rosące na świetle mają krótkie hypokotyle oraz w pełni rozwinięte liście. Ponadto ekspresja genów kodujących dwa wyżej wymienione białka (LHCP i RBCS) ulega u roślin rosnących na świetle ponad 100-krotnej stymulacji w porównaniu do roślin etiolowanych [46]. Przejście się rośliny z rozwoju w ciemności (skotomorfogeneza) do przebiegającego na świetle (fotomorfogeneza) jest szybkie, lecz proces ten może ulec zahamowaniu, a nawet częściowemu odwróceniu w wyniku przeniesienia siewki ponownie ze światła do ciemności (reetiolacja lub ciemniowa adaptacja).

Oprócz procesu deetioloacji (zielenienia) fitochrom reguluje całokształt procesów wzrostu i rozwoju w trakcie ontogenezy roślin. Biorąc pod uwagę, że u roślin wyższych P występuje w dwóch formach molekularnych, a każda z nich może być reprezentowana przez kilka jego odmiennych typów, poznanie mechanizmu działania fitochromu jest zadaniem niezwykle skomplikowanym.

Włączenie do badań nad procesami fotomorfogenezy naturalnie pojawiających się i sztucznie uzyskiwanych mutantów fitochromowych oraz fitochromowych roślin transgenicznych daje nadzieję na dalszy postęp w zrozumieniu roli i mechanizmu działania różnych form fitochromu.

## 2. MUTANTY FITOCHROMOWE

Pierwszy potencjalny mutant fitochromowy został wykryty ponad 10 lat temu w pracowni C.J.P. Spruita przez M. Koornneef i innych [23]. U części siewek, wyrosłych z naświetlanych promieniowaniem X nasion *Arabidopsis thaliana* nie stwierdzono hamującego wpływu światła białego na wydłużanie się ich hypokotyli. Mutanty te, oznaczone jako *hy* (od ang. *hypocotyl*), swym pokrojem przypominały etiolowane siewki *Arabidopsis*.

Mutanty fitochromowe podzielić można na dwie zasadnicze grupy: 1) mutanty charakteryzujące się zmienioną budową cząsteczek fotoreceptora oraz 2) mutacje dotyczące różnych elementów indukowanego przez światło i regulowanego przez P łańcucha transdukcji sygnału [20]. Ponadto w pierwszym przypadku można rozgraniczyć mutacje dotyczące phyA lub phyB.

### 2.1. MUTACJE DOTYCZĄCE FITOCHROMU LABILNEGO (phy-A)

Do tej grupy należą mutanty *hy1*, *hy2*, *hy6* i *hy8 Arabidopsis* [9, 20, 37] oraz *au* (*aurea*) pomidora [3, 4] (tab. 1). Roszące w ciemności siewki tych mutantów nie odbiegają w wyglądzie od siewek form dzikich. Jednakże ich przeniesieniu na światło nie towarzyszy zahamowanie wzrostu hypokotyli, synteza chlorofilu i akumulacja antocyjanin (u *au*). Dojrzałe okazy omawianych mutantów są wyższe od form dzikich (np. *au*), ponadto w stosunku



do nich charakteryzują się wzmoczoną dominacją wierzchołkową, wytwarzaniem mniejszej ilości żółto-zielonych liści oraz przedwczesnym zakwitaniem [7]. Obniżona zawartość chlorofilu u *hy* i *au* wynika z ograniczonej ekspresji genów kodujących białko wiążące chlorofil (LHCP).

Spektrofotometrycznie wykazano, że w etiolowanych siewkach *au* następuje ok. 95-procentowe obniżenie zawartości fitochromu w porównaniu do siewek pomidora dzikiego [24]. Doświadczenia przeprowadzone z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw *phyA* potwierdziły wyniki badań spektrofotometrycznych [41]. Parks i Quail [32] wykryli, że u dwóch, spośród trzech badanych linii mutantów *hy8 Arabidopsis* nie występuje *phyA*, podczas gdy poziom *phyB* i *phyC* jest podobny jak u form dzikich. W przeciwieństwie do *hy8* mutanty *Arabidopsis* typu *hyl* i *hy2* charakteryzują się normalnym poziomem białkowego składnika *phyA* [32].

Jak dotąd, nie znany jest molekularny mechanizm obniżenia poziomu *phyA* (*hy6*, *hy8* i *au*) lub utraty biologicznej aktywności (*hyl*, *hy2*) u mutantów *Arabidopsis* i pomidora. Wydaje się, że omawiane mutacje są wynikiem błędów powstających bądź to podczas syntezy grupy chromoforowej, bądź na etapie przyłączania chromoforu do apoproteiny. Parks i Quail [31] wykazali, że egzogenne podawanie biliwerdyny IXa, prekursora grupy chromoforowej P, powodowało, iż u mutantów *hyl* i *hy2* pojawiał się spektrofotometrycznie i immunochemicznie wykrywalny *phyA*. Tak traktowane mutanty charakteryzowały się podobnym poziomem fitochromu labilnego jak rośliny dzikie. Fitochrom ten wykazywał normalne fotochemiczne właściwości (ulegał fotokonwersjom), jak również podlegał stymulowanej przez światło destrukcji. Sugeruje się, że mutacje typu *long hypocotyl* powstają w wyniku zahamowania, przed etapem powstawania biliwerdyny IXa, biosyntezy grupy chromoforowej [31]. Oczywiście, brak obecności grupy chromoforowej hamująco również wpływa na poziom syntezy *phy-B* i przebieg procesów regulowanych przez stabilną pulę fitochromu. Okazało się, że jedynie mutanty *hyl* i *hy3 Arabidopsis* nie wykazują wrażliwości na EOD-FR, proces regulowany przez *phy-B*. Z drugiej strony zarówno u mutantów *au* pomidora [3], jak i *hy8 Arabidopsis* [32] EOD-FR powodowało stymulację wzrostu elongacyjnego hypocotyli w porównaniu do siewek tych mutantów nie traktowanych daleką czerwienią.

## 2.2. MUTACJE DOTYCZĄCE FITOCHROMU STABILNEGO (*phy-B*)

Jednym ze zjawisk kontrolowanych przez stabilną pulę fitochromu (*phyB*) jest tzw. efekt końcowego naświetlania daleką czerwienią (EOD-FR). Jeżeli siewki rosnące na normalnym fotoperiodzie (światło-ciemność lub dzień-noc), tuż przed przeniesieniem do ciemności naświetla się FR, to po kilku takich cyklach traktowane FR rośliny są znacznie wyższe niż kontrolne. Spowodowane jest to tym, że na świetle (w trakcie dnia) funkcjonuje tylko *phyB*, w hamującej wzrost elongacyjny formie Pfr. Jeżeli przed okresem ciemności (nocą) rośliny naświetli się FR, następuje fotokonwersja Pfr do Pr. Rośliny wchodząc w okres nocy nie mają więc hamującej wzrost formy Pfr *phyB*, co w konsekwencji powoduje również przyspieszenie akumulacji Pr *phyA* (*phyB* Pfr poprzez sprzężenie zwrotne hamuje transkrypcję *phyA*). Wszystko to prowadzi do podwyższenia tempa wzrostu rośliny [25]. W warunkach naturalnych sytuacja taka może występować podczas zacinienia jednych roślin przez inne (tzw. reakcja baldachimowania) [11], ponieważ filtracja światła poprzez liście (pochłanianie czerwieni) roślin wysokich prowadzi do relatywnego zwiększenia ilości dalekiej czerwieni (w stosunku do czerwieni) docierającej do roślin rosnących niżej.

Stosowanie EOD-FR służy m.in. do selekcjonowania mutacji dotyczących stabilnej puli fitochromu.

Do tej pory poznano kilka mutantów *phy-B*. Wśród nich najlepiej scharakteryzowanymi jest mutant *hy3* u *Arabidopsis* [23, 37, 42] i *lh* u ogórka [1, 22, 26–28] (tab. 1). Wykryta u ogórka mutacja (*lh* – od ang. *long hypocotyl*) prowadziła do nadmiernego wzrostu hypokotyli siewek rosnących na białym świetle [22, 39]. Zarówno mutanty *lh*, jak i rośliny typu dzikiego są podobne do siebie pod względem szybkości kiełkowania, tempa wzrostu hypokotyli w ciemności i fotoodwracalnego wpływu R/FR na ten proces oraz zawartości fitochromu w nasionach i etiolowanych siewkach [1, 33]. Różnice między omawianym mutantem a roślinami typu dzikiego dają się dopiero zauważyć podczas procesu deetiolacji i w czasie wzrostu siewek na świetle. W przeciwieństwie do form dzikich mutanty *lh* nie wykazują wrażliwości (hamowania wzrostu) na światło białe czy czerwone i brak jest fotoodwracalnego wpływu R/FR na kontrolę wzrostu hypokotyli [1]. Ponadto nie reagują na EOD-FR oraz zawierają zmniejszoną ilość chlorofilu [2, 26]. Na podstawie szeregu obserwacji Peters i inni [35] zaproponowali, że u ogórka mutacja *lh* dotyczy stabilnego fitochromu. Sugestie te zostały bezpośrednio potwierdzone przez Lopez-Jueza i in. [28]. Z biblioteki cDNA tytoniu wyizolowano sekwencję DNA homologiczną do *phyB*. Na jej podstawie w komórkach *Escherichia coli* uzyskano C-końcowy, 677 aminokwasowy fragment PHYB, który posłużył do wyprodukowania przeciwciał monoklonalnych. Stosując jedno z takich przeciwciał (mAT1) wykazano, że w przeciwieństwie do form dzikich mutant *lh* nie produkuje białkowego składnika *phyB* [28]. Jednocześnie stosując przeciwciała specyficzne względem PHYA wykazano, że w etiolowanych siewkach form dzikich i zmutowanych występuje podobna zawartość białkowego składnika fitochromu labilnego, który ulega zależnej od światła destrukcji [28].

Mutacje w loci *l* podobne do *lh* ogórka wykryto u grochu [29]. Etiolowane lub traktowane FR siewki mutantu były podobne do roślin typu dzikiego, lecz charakteryzowały się znacznie dłuższymi międzywęzłami w przypadku, gdy ich wzrost odbywał się na białym, czerwonym lub niebieskim świetle. Liście *lv* zawierały mniej chlorofilu, a chloroplasty mniejszą ilość gran i podwyższoną zawartość ziarn skrobiowych w porównaniu do roślin typu dzikiego. Przy użyciu metod spektrofotometrycznych i immunochemicznych wykazano, że mutanty mają podobną ilość *phyA*, *phyB* oraz białkowego składnika obu form fitochromu jak odmiany dzikie. Siewki *lv* nie reagowały na EOD-FR [29].

Mutacja w loci *hy3* prowadzi do wielu zaburzeń rozwojowych u *Arabidopsis*. U tego mutantu w porównaniu do roślin typu dzikiego zaobserwowano obniżenie siły kiełkowania [10], znacznie dłuższe pędy i komórki włóknikowe korzeni [37], obniżoną zawartość chlorofilu [9], wcześniejsze wytwarzanie zawiązków kwiatowych [15], jak również brak reakcji na EOD-FR.

Przy pomocy wektora pET-3c Somers i inni [42] wprowadzili do komórek *E. coli* cDNA zawierające sekwencje *phyA*, *phyB* i *phyC* wyizolowane z siewek *Arabidopsis thaliana*. Uzyskane tą drogą białka (PHYA, PHYB i PHYC) posłużyły do produkcji odpowiednich przeciwciał monoklonalnych. Przy ich użyciu wykazano, że naświetlaniu etiolowanych roślin typu dzikiego towarzyszy 200-krotny spadek ilości zawartego w nich fitochromu labilnego (*phyA*). W etiolowanych siewkach *Arabidopsis* stwierdzono również obecność fitochromu typu *phyB* i *phyC* (stabilne formy barwnika), lecz ich zawartość nie uległa zmianie w wyniku naświetlania siewek R. W tkankach etiolowanych siewek mutantu *hy3* stwierdzono podobną zawartość odpowiedniego mRNA i białka PHYA jak u roślin typu dzikiego. W obu przypadkach odnotowano również zbliżoną zawartość PHYC. W przeciwieństwie do wymienionych



TABELA 1. Charakterystyka mutantów fitochromowych; symbolami "+" i "-" określano obecność immunochemicznie wykrywalnego białkowego składnika fitochromu (PHY-A i PHY-B); w nawiasach w podobny sposób zaznaczono obecność w badanych mutantach fizjologicznie aktywnej labilnej (phy-A) i stabilnej (phy-B) formy fitochromu; skrót nb – nie badano (na podstawie [1, 3, 6, 7, 13, 20–24, 26–28, 31–35, 41, 42])

Rosлина	M*	Fenotyp	PHY-A (phy-A)	PHY-B (phy-B)
Rzodkiewnik ( <i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	<i>hy1</i>	długi hypokotyl u siewek rosnących na świetle, białym, siewki o żółto-zielonym zabarwieniu, podwyższona dominacja wierzchołkowa, wcześniejsze zakwitanie; brak wrażliwości na EOD-FR	+ (-)	+ (nb)
	<i>hy2</i>	jak <i>hy1</i> , bardziej zielone	+ (-)	+ (nb)
	<i>hy3</i>	jak <i>hy1</i> , słabe kiełkowanie nasion, długie komórki włosnikowe korzeni	+ (+)	- (nb)
	<i>hy6</i>	jak <i>hy1</i> , wrażliwy na EOD-FR	+ (-)	+ (nb)
	<i>hy8</i>	długi hypokotyl u siewek rosnących w świetle dalekiej czerwieni	- (-)	+ (+)
Groch ( <i>Pisum sativum</i> L.)	<i>lv</i>	wydłużone międzywęzła u roślin rosnących na białym, czerwonym i niebieskim świetle, obniżona zawartość chlorofilu	+ (+)	+ (-?)
Kapusta ( <i>Brassica rapa</i> L.)	<i>ein</i>	wydłużone międzywęzła, podwyższona zawartość kwasu giberelowego	+ (+)	+ (-?)
Ogórek ( <i>Cucumis sativus</i> L.)	<i>lh</i>	długi hypokotyl u siewek rosnących na białym świetle	+ (+)	- (-)
Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> L. Moench)	<i>ma3R</i>	wydłużony pęd, słabo rozwinięte blaszki liściowe, podwyższona zawartość giberelin, zakwitanie niezależne od fotoperiodu	+ (+)	-? (nb)
Pomidor ( <i>Lycopersicon esculentum</i> L.)	<i>au</i>	długi hypokotyl u roślin rosnących na białym świetle, obniżona zawartość antocyjanin i chlorofilu, żółto-zielony kolor siewek	- (-)	+ (+)

\* M – nazwa mutantu

typów fitochromu zarówno poziom mRNA kodującego białko fitochromu B, jak i zawartość białkowego składnika phyB były zdecydowanie niższe (o 95–98%) u mutantu *hy3* niż u roślin typu dzikiego. Na podstawie przedstawionych wyników Somers i in. [42] sugerują, że mutacja w loci *hy3* dotyczy genu kodującego jedną ze stabilnych form fitochromu – phyB.

Przypuszczenie to zostało potwierdzone przez Reeda i in. [37], którzy dokonali porównania zsekwencjonowanych przez nich *phyB* (zbudowanego z 3 egzonów i 2 intronów) i cDNA kilku odmiennych mutantów *hy3*. Okazało się, że cztery spośród pięciu badanych mutacji dotyczyło pojedynczych substytucji zachodzących w pierwszym egzonie *phyB*. W trzech przypadkach punktowe mutacje prowadziły do powstania kodonów typu STOP. Czwararty rodzaj mutacji polegał na zamianie kodonu histydynowego na tyrozynowy. Wszystkie cztery wymienione mutacje uzyskano w wyniku traktowania nasion *Arabidopsis* roztworem metanosulfonianu etylowego (EMS). Piątą z opisanych mutacji otrzymano w wyniku wprowadzenia T-DNA pomiędzy sekwencje wchodzące w skład trzeciego egzonu i odcinek leżący poza genem *phyB* [37]. Omawiane wyniki badań są pierwszymi bezpośrednimi dowodami wskazującymi, że mutanty fitochromowe mogą powstawać w wyniku zmian na poziomie genów kodujących odpowiednie typy fitochromów (w tym przypadku phyB).

Poza ogórkiem i *Arabidopsis* mutacje dotyczące stabilnej formy fitochromu wykryto u *Brassica rapa* [13] i sorgo [6] (tab. 1).

Pierwsza z wymienionych mutacji (*ein* od ang. *elongated internode*) prowadziła m.in. do utraty wrażliwości siewek na EOD-FR oraz zaniku immunologicznie wykrywalnego PHYB [13]. Mutanty sorgo (*ma3R*) charakteryzowały się wydłużonymi pędami, podwyższoną zawartością kwasu giberelowego oraz niezależnym od fotoperiodu zakwitaniem [6].

### 2.3. MUTACJE DOTYCZĄCE ŁAŃCUCHA TRANSDUKCJI SYGNAŁU

Poznano szereg mutacji, które bezpośrednio nie wpływając na poziom fitochromu labilnego i stabilnego mają jednak zasadniczy wpływ na przebieg indukowanych przez fitochrom procesów fotomorfogenezy (tab. 2). Niektóre z tych mutacji, jak np. *hp* (od ang. *high pigment*) [4, 33] ujawniają się w obecności światła, inne natomiast dają o sobie znać w etiolowanych siewkach. Wiele mutacji typu *det* (od ang. *deetiolated*) [7–9] i *cop* (od ang. *constitutively photomorphogenic*) [12, 17, 48] u *Arabidopsis* oraz mutacja *lip* (od ang. *light-independent photomorphogenesis*) u grochu [14] prowadzą do unikalnej inicjacji procesów morfogenezy bez udziału światła. Wyrosłe w ciemności siewki charakteryzują się krótkim hypokotylem i rozwiniętymi liścieniami (u *Arabidopsis*) oraz obecnością antocyjanin bądź krótkim epikotylem i rozwiniętymi liśćmi (u grochu). Ponadto w ich tkankach obserwuje się podwyższoną ekspresję jądrowych genów *cab*, *rbcS*, *chs* i *fedA* kodujących odpowiednio białko wiążące chlorofil (LHCP), małą podjednostkę karboksylazy rybulozobisfosforanowej (SSU) oraz cząsteczki syntazy chalkonowej (CHS) i ferredoksyny typu A [7–9, 14]. U wymienionych mutantów nie obserwuje się obecności chlorofilu (ostatni etap syntezy tego barwnika jest reakcją fotochemiczną wymagającą udziału światła), stąd mają żółte zabarwienie. Po przeniesieniu *lip1* na światło rejestruje się w jego tkankach znacznie szybsze tempo akumulacji chlorofilu niż u form niezmutowanych grochu [14]. Jedynie u mutantów *cop1* [12], *cop9* [48], *det1* [8, 9] i *lip1* [14] dochodzi w ciemności do różnicowania się plastydów, co uwidacznia się w postaci rozwoju systemu błon tylakoidalnych. U innych roślin rozwój tych struktur komórkowych zatrzymany jest na etapie proplastydów [7, 17].

Spontaniczna mutacja prowadząca do wzmoczonej syntezy chlorofilu i antocyjanin u pomidora znana jest już od kilkudziesięciu lat [33]. Etiolowane siewki tego mutantu, określanego jako *hp* (od ang. *high pigment*), nie różnią się od wyrosłych w ciemności roślin typu dzikiego. Po ich przeniesieniu na światło obserwuje się zahamowanie wzrostu elongacyjnego hypokotyli, podwyższoną w nich zawartość antocyjanin [4, 33], wzrost zawartości chlorofilu w liściach i niedojrzałych owocach. Z drugiej strony dojrzałe owoce *hp* są bardziej czerwone od owoców roślin typu dzikiego [33]. Jest to spowodowane wyższą w nich zawartością likopenów i karotenoidów. Zarówno w etiolowanych, jak i zielonych siewkach *hp* obserwuje się podobną zawartość fitochromu jak u form niezmutowanych pomidora [20]. Uważa się, że mutacja w loci *hy* prowadzi do wzrostu wrażliwości roślin na działanie światła oraz stymuluje procesy regulowane przez fitochrom stabilny [33].

Poza siewkami *lip1*, w których stwierdza się kilkudziesięcioprocentowy spadek zawartości fitochromu w porównaniu z formami dzikimi [14], u innych typów omawianej grupy mutantów nie obserwuje się zmian w zawartości P [7]. Tak więc są to mutanty regulowanego przez fitochrom szlaku transdukcji sygnału.



U niektórych z nich obserwuje się również pewne anomalie rozwojowe. Na przykład mutacja w loci *cop9* prowadzi do karłowacenia siewek *Arabidopsis* i hamowania jego kwitnienia [48]. Mutanty *cop4* nie wykazują reakcji grawitacyjnych [17].

TABELA 2. Mutanty fitochromowe z zaburzeniami łańcucha transdukcji sygnału (na podstawie [7–9, 12, 14, 17, 34, 36, 48])

Roślina	Nazwa mu-tanta	Fenotyp i nowe właściwości
Rzodkiewnik ( <i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	<i>det1</i>	różnicowanie się liści i chloroplastów etiolowanych roślin aktywacja genów jądrowych w ciemności regulowanych normalnie przez światło obniżenie dominacji wierzchołkowej i tempa wzrostu pędów chloroplasty w komórkach korzeni
	<i>det2</i>	opóźnione starzenie się liści i chloroplastów; inne cechy jak u <i>det1</i> z wyjątkiem ostatniej
	<i>det3</i>	niezależny od światła rozwój liści
	<i>det4</i>	obniżenie dominacji wierzchołkowej i tempa wzrostu pędów różnicowanie się liści i chloroplastów etiolowanych roślin
	<i>cop1</i>	obniżenie dominacji wierzchołkowej i tempa wzrostu pędów cechy jak u <i>det1</i>
	<i>cop2</i>	krótki hypokotyl różnicowanie się liści i etiolowanych roślin
	<i>cop3</i>	zahamowanie wzrostu hypokotyli przez światło cechy jak u <i>cop2</i>
	<i>cop4</i>	karłowacenie siewek aktywacja genów jądrowych w ciemności regulowanych normalnie przez światło brak reakcji geotropicznych inne cechy jak u <i>cop2</i>
	<i>cop9</i>	cechy jak u <i>det1</i> , karłowacenie siewek, hamowanie kwitnienia
	Groch ( <i>Pisum sativum</i> L.)	<i>lip</i>
Pomidor ( <i>Lycopersicon esculentum</i> L.)	<i>hp</i>	podwyższona zawartość antocyjanin obniżone tempo wzrostu hypokotyli na świetle owoce intensywnie czerwone

### 3. FITOCHROMOWE ROŚLINY TRANSGENICZNE

Do tej pory przeprowadzono transformację trzech gatunków roślin dwuliściennych, do których wprowadzono geny fitochromowe izolowane z roślin jedno- i dwuliściennych (tab. 3). I tak do tytoniu wprowadzono *phyA* owsa [19] i ryżu [18, 30], do pomidora *phyA* owsa [5], a do *Arabidopsis phyB* ryżu lub dodatkowy gen *phyB* rzodkiewnika [47]. Transformacji wymienionych roślin dokonano podobną metodą. Wpierw otrzymano komplementarne DNA (cDNA) kodujące PHYA owsa [5, 19], ryżu [18, 30] lub PHYB owsa i *Arabidopsis* [47]. Wspomniane DNA klonowano do roślinnych plazmidów transformacyjnych, które wprowadza-

TABELA 3. Charakterystyka fitochromowych roślin transgenicznych (na podstawie [5, 18, 19, 47])

Roślina transformowana	Nazwa genu użytego do transformacji	Fenotyp rośliny transgenicznej	Nowe właściwości rośliny transgenicznej
Tytoń ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	<i>phyA</i> owsa	rośliny częściowo karłowate, o obniżonej dominacji wierzchołkowej i ciemno-zielonych liściach	podwyższenie zawartości spektralnie wykrywalnego fitochromu w roślinach etiolowanych wpływa na przyspieszenie procesu deetiolacji
Tytoń ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	<i>phyA</i> ryżu	rośliny karłowate, ciemnozielone, o krótkich międzywęzłach	2,5-krotne podwyższenie poziomu fitochromu w roślinach etiolowanych powoduje zwiększenie wrażliwości siewek na działanie światła, a u roślin zielonych powoduje opóźnienie procesu starzenia
Pomidor ( <i>Lycopersicon esculentum</i> L.)	<i>phyA</i> owsa	rośliny karłowate, ciemnozielone liście i owoce, podwyższona zawartość antocyjanin	podwyższenie poziomu fitochromu w roślinach etiolowanych wpływa na przyspieszenie procesu deetiolacji, opóźnienie dojrzewania owoców i starzenie się roślin
Rzodkiewnik ( <i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	<i>phyB</i> ryżu <i>phyB</i> rzodkiewnika	u młodych siewek krótkie hypokotyle i ciemnozielone liścienie	6-krotne podwyższenie poziomu <i>phyB</i> powoduje zahamowanie wzrostu siewek na świetle

dzano do komórek *Escherichia coli*. W celu włączenia plazmidów do komórek *Agrobacterium tumefaciens* stosowano układy kointegracyjne w połączeniu z koniugacją trójrodzicielską [43]. Przy pomocy *A. tumefaciens* transfekowano krążki liściowe tytoniu [18, 30], liścienie pomidorów [5] lub korzenie *Arabidopsis* [47].

We wszystkich dotąd uzyskanych roślinach transgenicznych wprowadzony obcy gen fitochromowy włączany był do genomu gospodarza i ulegał transkrypcji. Syntetyzowane w tkankach roślin transgenicznych białkowe składniki (PHYA lub PHYB) obcych cząsteczek fitochromu identyfikowano za pomocą specyficznych względem nich przeciwciał monoklonalnych [5, 18, 30, 47]. Metodami spektrofotometrycznymi wykazano, że do wspomnianych białek włączana była grupa chromoforowa. Powstające tą drogą cząsteczki fitochromowe wykazywały charakterystyczne dla omawianego barwnika właściwości spektralne (widmo absorbcyjne) i ulegały stymulowanym przez R i FR procesom fotokonwersji. W komórkach roślin transgenicznych cząsteczki fitochromu obcego pochodzenia podlegały podobnym przemianom metabolicznym jak rodzime, tj. ulegały akumulacji w roślinach etiolowanych i podlegały indukowanej światłem destrukcji [5, 18, 30, 47].

Rośliny transgeniczne, do których wprowadzono *phyA*, charakteryzowały się podobnym fenotypem (tab. 3). Były znacznie niższe od form dzikich. W wyniku obniżonej dominacji wierzchołkowej intensywnie krzewiły się oraz miały ciemnozielone liście [5, 18, 19]. Transgeniczne pomidory, poza wspomnianymi cechami, zawierały podwyższoną zawartość antocyjanin. Ich niedojrzałe owoce były koloru ciemnozielonego [5].

Rosnące na świetle transgeniczne siewki *Arabidopsis* wykazujące nadekspresję *phyB* miały znacznie krótsze hypokotyle oraz w porównaniu do siewek typu dzikiego bardziej zielone liścienie [47].

Podwyższenie poziomu *phyA* w roślinach transgenicznych prowadziło do przyspieszenia w porównaniu z roślinami typu dzikiego procesu deetiolacji co m.in. wiązało się z podwy-



zszą ekspresją genów jądrowych kodujących niektóre białka chloroplastowe [2, 3]. Rośliny te wykazywały nadwrażliwość na działanie światła [47]. U roślin zielonych charakteryzujących się nadekspresją *phyA* obserwowano opóźnienie procesu dojrzewania owoców [5] oraz starzenie się liści i owoców [5, 18, 19, 30] (tab. 3).

#### 4. UWAGI KOŃCOWE

Użycie fitochromowych mutantów oraz roślin transgenicznych jest przełomowym momentem w badaniach roli i mechanizmu działania fitochromu w kontroli wzrostu i rozwoju roślin. Badania te prowadzą do bliższego poznania mechanizmów regulacji fotomorfogenezy roślin. Aczkolwiek daleko jeszcze do całkowitego wyjaśnienia tych zagadnień, to jednak już obecnie sądzić można, że *phyA* pełni główną rolę w procesie deetiolacji roślin, podczas gdy *phyB* reguluje różne procesy wzrostowo-rozwojowe w roślinach zielonych.

Tak daleko idące uogólnienie wydaje się jednak dużym uproszczeniem [20, 21]. Dla przykładu nadekspresja *phyA* w roślinach transgenicznych ma również duży wpływ na procesy zachodzące w roślinach zielonych [5, 19]. Z drugiej strony u transgenicznego rzodkiewnika mającego podwyższoną zawartość *phyB* obserwowano przyspieszenie procesu deetiolacji [47]. Na tej podstawie można wnioskować, że między różnymi formami fitochromu istnieją skomplikowane współzależności w regulacji morfogenezy roślin. Podejmowane ostatnio badania nad podwójnymi mutantami (np. *au-hp*, *cop-det*) przyniosą prawdopodobnie nowe w tym względzie propozycje [21].

Badania mechanizmów fotomorfogenezy roślin oprócz fitochromu dotyczą również w dużej mierze roli hormonów roślinnych. Między fitochromem a hormonami istnieją wielorakie współzależności w regulacji morfogenezy roślin [25]. Intensywnie rozwijają się badania nad mutantami auksyn, giberelin, cytokinin, etylenu oraz kwasu abscysynowego [38]. Badania te w sposób naturalny łączą się z badaniami fitochromowymi, ponieważ w wielu przypadkach zaburzenie biosyntezy bądź funkcji fitohormonów leży u podstaw wyselekcjonowania określonych mutantów fitochromowych.

Praca wykonana w ramach Grantu KBN numer 6-6068-92-03.

#### LITERATURA

- [1] ADAMSE P, JESPER P, KENDRICK RE, KOORNNEEF M. Photophysiology of phytochrome content of long-hypocotyl mutant and wild-type cucumber seedlings. *Plant Physiol* 1988; **87**: 264–268.
- [2] ADAMSE P, JESPER P, KENDRICK RE, KOORNNEEF M. Photomorphogenetic responses of a long hypocotyl mutant of *Cucumis sativus* L. *J Plant Physiol* 1987; **127**: 481–491.
- [3] ADAMSE P, JESPER P, BAKKER JA, WESSELIUS JC, HEERINGA GH, KENDRICK RE, KOORNNEEF M. Photoregulation of a tomato mutant deficient in labile phytochrome. *J Plant Physiol* 1988; **133**: 436–440.
- [4] ADAMSE P, PETERS JL, JESPER P, van TUINEN A, KOORNNEEF M, KENDRICK RE. Photocontrol of anthocyanin synthesis in tomato seedlings: genetic approach. *Photochem Photobiol* 1989; **50**: 107–111.
- [5] BOYLAN MT, QUAIL PH. Oat phytochrome is biologically active in transgenic tomatoes. *Plant Cell* 1989; **1**: 767–773.
- [6] CHILDS KL, PRATT LH, MORGAN PW. Genetic regulation of development in *Sorghum bicolor*. VI. The *ma3<sup>R</sup>* allele results in abnormal phytochrome physiology. *Plant Physiol* 1991; **97**: 714–719.

- [7] CHORY J. Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants. *TIG* 1993; **9**: 167–172.
- [8] CHORY J, PETO CA. Mutation in *DET1* gene affect cell-type-specific expression of light-regulated genes and chloroplast development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 8776–8780.
- [9] CHORY J, PETO CA, FEINBAUM R, PRATT L, AUSUBEL F. *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* 1989; **58**: 991–999.
- [10] CONE JW, KENDRICK RE. Fluence-response curves and action spectra for promotion and inhibition of seed germination in wild-type and long-hypocotyl mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 1985; **163**: 43–54.
- [11] CYMERSKI M. Ekologiczne aspekty fotomorfogenezy (W) Fitochrom i Morfogeneza Roślin, Kopcewicz J (red.) PWN, Warszawa 1992: 236–243.
- [12] DENG X-W, MATSUI M, WEI N, WAGNER D, CHU AM, FELDMAN KA, QUAIL PH. COP1, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G<sub>γ</sub> homologous domain. *Cell* 1992; **71**: 791–801.
- [13] DEVLIN PF, ROOD SB, SOMERS DE, QUAIL PH, WHITELAM GC. Photophysiology of the elongated internode (*ein*) mutant of *Brassica rapa*: *ein* mutant lacks a detectable phytochrome B-like polypeptide. *Plant Physiol* 1992; **100**: 1442–1447.
- [14] FRANCES S, WHITE MJ, EDGERTON MD, JONES AM, ELLIOT RC, THOMPSON WF. Initial characterization of a pea mutant with light-independent photomorphogenesis. *Plant Cell* 1992; **4**: 1519–1530.
- [15] GOTO N, KUMAGAI T, KOORNNEEF M. Flowering responses to light-breaks in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana*, a long-day plant. *Physiol Plant* 1991; **83**: 209–215.
- [16] HERSHEY HO, BAKER RF, IDLER KB, LISSEMORE JL, QUAIL PH. Analysis of cloned cDNA and genomic sequences for phytochrome: complete amino acid sequences for two gene products expressed in etiolated *Avena*. *Nucl Acid Res* 1985; **13**: 8543–8559.
- [17] HOU Y, von ARNIM AC, DENG X-W. A new class of *Arabidopsis* constitutive photomorphogenic genes involved in regulating cotyledon development. *Plant Cell* 1993; **5**: 329–339.
- [18] KAY SA, NAGATANI A, KEITH B, DEAK M, FURUYA M, CHUA N-H. Rice phytochrome is biologically active in transgenic tobacco. *Plant Cell* 1989; **1**: 775–782.
- [19] KELLER JM, SHANKLIN J, VIERSTRA RD, HERSHEY PH. Expression of a functional monocotyledonous phytochrome in transgenic tobacco. *EMBO J* 1989; **8**: 1005–1012.
- [20] KENDRICK RE, NAGATANI A. Phytochrome mutants. *Plant J* 1991; **1**: 133–139.
- [21] KOORNNEEF M, KENDRICK RE. Photomorphogenic mutants in higher plants. (W) *Photomorphogenesis in Plants*, wyd. 2., Kendrick RE (red.) w druku.
- [22] KOORNNEEF M, van der KNAPP BJ. Another long hypocotyl mutant at the *lh* locus. *Cucurbit Genet Coop Rep* 1983; **6**: 13.
- [23] KOORNNEEF M, ROLFF E, SPRUIT CJP. Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* L. *Heynh Z Pflanzenphysiol* 1980; **100**: 147–160.
- [24] KOORNNEEF M, CONE JW, DEKENS RG, O'HERNE-ROBERS EG, SPRUIT CJP, KENDRICK RE. Photomorphogenic responses of long hypocotyl mutants of tomato. *J Plant Physiol* 1985; **120**: 153–165.
- [25] KOPCEWICZ J, TRETYN A, CYMERSKI M. Fitochrom i Morfogeneza Roślin. PWN Warszawa 1992.
- [26] LOPEZ-JUEZ E, BUURMEIJER WF, HEERINGA GH, KENDRICK RE, WESSELIUS JC. Response of light-grown wild-type and long-hypocotyl mutant cucumber plants to end-of-day far-red light. *Phytochem Photobiol* 1990; **52**: 143–150.
- [27] LOPEZ-JUEZ E, NAGATANI A, BUURMEIJER WF, PETERS JL, FURUYA M, KENDRICK RE, WESSELIUS JC. Response of light-grown wild-type and *aurea*-mutant tomato plants to end-of-day far-red light. *J Photochem Photobiol B Biology* 1990; **4**: 391–405.
- [28] LOPEZ-JUEZ E, NAGATANI A, TOMIZAWA KI, DEAK M, KERN R, KENDRICK RE, FURUYA M. The cucumber long hypocotyl mutant lacks a light-stable PHYB-like phytochrome. *Plant Cell* 1992; **4**: 241–251.
- [29] NAGATANI A, REID JB, ROSS JJ, DUNNEWIJK A, FURUYA M. Internode length in *Pisum*. The response to light quality, and phytochrome type I and II levels in *lv* plants. *J Plant Physiol* 1990; **135**: 667–674.
- [30] NAGATANI A, KAY SA, DEAK M, CHUA N-H, FURUYA M. Rice type I phytochrome regulates hypocotyl elongation in transgenic tobacco seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 5207–5211.
- [31] PARKS BM, QUAIL PH. Phytochrome-deficient *hy1* and *hy2* long hypocotyl mutants *Arabidopsis* are defective in phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant Cell* 1991; **3**: 1177–1186.
- [32] PARKS BM, QUAIL PH. *hy8*, a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome. *Plant Cell* 1993; **5**: 39–48.
- [33] PETERS JL. Photomorphogenic mutants of higher plants. Ph D Thesis Agricultural University Wageningen, The Netherlands 1992.



- [34] PETERS JL, van TUINEN A, ADAMSE P, KENDRICK RE, KOORNNEEF M. High pigment mutant of tomato exhibit high sensitivity for phytochrome action. *J Plant Physiol* 1989; **134**: 661–666.
- [35] PETERS JL, KENDRICK RE, MOHR H. Phytochrome content and hypocotyl growth of long-hypocotyl mutant and wild-type cucumber seedlings during de-etiolation. *J Plant Physiol* 1991; **137**: 291–296.
- [36] REED JW, NAGPAL P, CHORY J. Searching for phytochrome mutants. *Photochem Photobiol* 1992; **56**: 833–838.
- [37] REED JW, NAGPAL P, POOLE DS, FURUYA M, CHORY J. Mutation in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 1993; **5**: 147–157.
- [38] REID JB. Phytohormone mutants in plant research. *J Plant Growth Regul* 1990; **9**: 97–111.
- [39] ROBINSON RW, SHALL JW. A cucumber mutant with increased hypocotyl and internode length. *Cucurbit Genet Coop Rpt* 1981; **18**: 34–35.
- [40] SHAROCK RA, QUAIL PH. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Develop* 1989; **3**: 1745–1757.
- [41] SHAROCK RA, PARKS BM, KOORNNEEF M, QUAIL PH. Molecular analysis of the phytochrome deficiency in an *aurea* mutant of tomato. *Mol Gen Genet* 1988; **213**: 9–14.
- [42] SOMERS DE, SHAROCK RA, TEPPERMAN JM, QUAIL PH. The *hy3* long hypocotyl mutant of *Arabidopsis* is deficient in phytochrome B. *Plant Cell* 1991; **3**: 1263–1274.
- [43] SZCZYGŁOWSKI K, BORON L. Wektory transformacyjne. (W) Transformowanie i Regeneracja Roślin, Legocki AB (red.) Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań 1990; III: 1–15.
- [44] TRETYN A. Fitochrom (W) Fitochrom i Morfogeneza Roślin, Kopcewicz J (red.) PWN Warszawa 1992; 58–107.
- [45] TRETYN A. Inne barwniki fotomorfogenetyczne. (W) Fitochrom i Morfogeneza Roślin. Kopcewicz J (red.) PWN Warszawa 1992; 108–119.
- [46] TRETYN A. Światło i ekspresja genów. (W) Fitochrom i Morfogeneza Roślin. Kopcewicz J (red.) PWN Warszawa 1992; 120–137.
- [47] WAGNER D, TEPPERMAN JM, QUAIL PH. Overexpression of phytochrome B induces a short hypocotyl phenotype in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1991; **3**: 1275–1288.
- [48] WEI N, DENG X-W. *COP9*: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1992; **4**: 1507–1508.

Otrzymano: 17.08.1993 r.

Przyjęto: 20.11.1993 r.

Adres autorów: ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

## AKUMULACJA CZYNNIKÓW WZROSTU W JĄDRACH KOMÓREK DOCELOWYCH\*

### ACCUMULATION OF GROWTH FACTORS IN NUCLEI OF TARGET CELLS

Paweł P. JAGODZIŃSKI, Wiesław H. TRZECIAK

Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

*Streszczenie.* Ważną rolę w procesie proliferacji oraz różnicowania się fenotypu odgrywają czynniki wzrostu. Wiążą się one ze specyficznymi receptorami powierzchniowymi, są internalizowane w kompleksie z receptorem i przenieszone do jąder komórek docelowych, gdzie wiążą się z białkami niehistonowymi chromatyny. Powoduje to pobudzenie szeregu procesów m.in. replikacji DNA, a także selektywnej ekspresji genów. W pracy przedstawiono i usystematyzowano dane z piśmiennictwa dotyczące transportu czynników wzrostu do jąder komórek docelowych, wiązanie się tych czynników z białkami chromatyny oraz oddziaływanie czynników wzrostu na proces replikacji DNA i proliferacji komórek. Wykazano, że niektóre z efektów czynników wzrostu mają charakter oddziaływań intrakrynowych [25].

*Summary.* An important role in the process of proliferation as well as differentiation of cell phenotype is executed by growth factors. They bind specifically to cell surface receptors, are internalized in complexes with receptors and transferred into nuclei of target cells, where they bind to nonhistone chromatin proteins. This causes stimulation of a number of processes incl. DNA replication and selective expression of genes. In this paper are reviewed data from literature regarding transport of growth factors to nuclei of target cells, binding to chromatin proteins and influence of growth factors on processes of DNA replication and cell proliferation. It has been pointed out that some of growth factor effects are of intracrine nature.

*Stosowane skróty:* ATP – adenzyno-5-trifosforan, DG – diacyloglicerol, DNAaza – egzonukleaza, AGF (ang. *epidermal growth factor*) – czynnik wzrostu naskórka, aFGF (ang. *acidic fibroblast growth factor*) – kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów; bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*) – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów,  $G_1$  (ang. *gap 1*) – faza cyklu komórkowego, IP3 – trifosfoinozytol,  $K_d$  – stała dysocjacji kompleksu receptor czynnik wzrostu, kDa – międzynarodowa jednostka masy atomowej i cząsteczkowej, NGF (ang. *nerve growth factor*) – czynnik wzrostu nerwu, PIP<sub>2</sub> – fosfatydyloinozytylobisfosforan, PDGF (ang. *platelet derived growth factor*) – czynnik wzrostu wyizolowany z płytek, S – faza cyklu komórkowego, w której następuje synteza DNA, SW 948 – linia komórkowa raka okrężnicy, Triton X-100 – detergent niejonowy używany do frakcjonowania komórek.

\*Praca finansowana z projektu badawczego nr 6 6323 92 03.



## WPROWADZENIE

Czynniki wzrostu są to substancje, które poprzez oddziaływanie na metabolizm komórek docelowych pobudzają ich wzrost lub różnicowanie się ich fenotypu. Ponadto oddziałują one na wiele innych procesów fizjologicznych i patologicznych, m.in. gojenie się ran, nowotworzenie i in. [18]. Odkrywcami czynników wzrostu była Levi-Montalcini i Cohen [8], który oczyścił i scharakteryzował czynnik wzrostu nerwu (NGF) i czynnik wzrostu naskórka (EGF), a także wykazał, że wewnątrzkomórkowa domena receptora EGF ma aktywność tyrozynoswoistej kinazy białkowej [9].

Przyłączenie czynników wzrostu do receptorów powierzchniowych zapoczątkowuje łańcuch reakcji prowadzących do odpowiedzi komórkowej, m.in. stymulacji przepływu jonów, selektywnej ekspresji genów, a także replikacji DNA i proliferacji komórek [18].

Obecnie znanych jest ok. 100 czynników wzrostu, które grupuje się w kilka rodzin. Oddziaływanie czynników wzrostu z komórkami docelowymi oraz efekty biologiczne tych czynników były przedmiotem szeregu prac przeglądowych [22]. Dotąd jednak nie omówiono wyczerpująco zagadnienia internalizacji kompleksów czynnika wzrostu-receptor oraz akumulacji czynników wzrostu w chromatynie komórek docelowych.

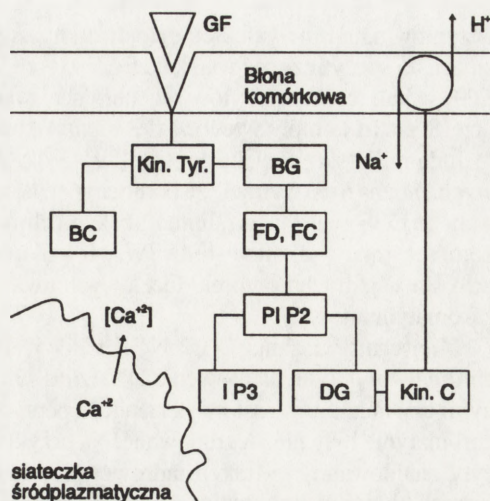
Celem pracy jest usystematyzowanie i przedstawienie doniesień z piśmiennictwa dotyczących akumulacji czynników wzrostu w jądrach komórek docelowych oraz wskazanie na jej rolę w procesie proliferacji komórek.

## MECHANIZM DZIAŁANIA CZYNNIKÓW WZROSTU

Pierwszym etapem oddziaływania z komórkami docelowymi jest wiązanie czynników wzrostu ze specyficznymi receptorami. Towarzyszy temu stymulacja aktywności tyrozynoswoistej kinazy białkowej, prowadząc do autofosforylacji receptora oraz do wybiórczej fosforylacji białek cytoplazmatycznych [7, 21, 32]. Substratem tej tyrozynoswoistej kinazy jest także podjednostka  $\beta$  białek wiążących nukleotydy guanylowe (białka G) [46]. Białka G oprócz modulacji aktywności cykazy adenylowej podwyższają aktywność fosfodiesterazy i fosfolipazy C [7]. W latach 1983–1984 wykazano udział inozytofosfatydów i bisacyloglicerolu w wewnątrzkomórkowym przenoszeniu sygnałów [4, 27, 44]. Dowiedziono, że przyłączenie czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF) do receptorów powierzchniowych powoduje przejściowe podwyższenie wewnątrzkomórkowego stężenia 1,2-bisacyloglicerolu (DG) i 1,4,5-trisfosfoinozytolu (IP3), w wyniku hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP2) przez fosfolipazę C [4, 7, 31]. Powstały bisacyloglicerol aktywuje kinazę białkową C [31], która stymuluje m.in. występujący w błonie komórkowej układ transportowy odpowiedzialny za wymianę jonów  $\text{Na}^+$  na  $\text{H}^+$  [31]. Prowadzi to do przejściowego podwyższenia pH w cytoplazmie o 0,2–0,3 jednostki [3]. Przyłączenie czynników wzrostu do receptorów zwiększa także wewnątrzkomórkowe stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  [4]. Tak więc w procesie transdukcji sygnałów do wzrostu i proliferacji komórek ważną rolę odgrywają kinazy białkowe powodujące kowalencyjną modyfikację struktury białek regulatorowych. Mechanizm działania czynników wzrostu przedstawiono na rysunku 1.

Działanie czynników wzrostu poprzez receptor powierzchniowy nie tłumaczy jednak, w jaki sposób sygnał dotyczący pobudzenia replikacji bądź transkrypcji DNA jest przenoszony do jąder komórkowych i dlaczego dochodzi do selektywnego pobudzenia ekspresji genów. Nie wyjaśniono też, w jaki sposób ten sam czynnik wzrostu, przyłączając się do receptora powierzchniowego, indukuje proliferację niektórych komórek, natomiast hamuje proliferację w innych liniach komórkowych [42].

Przypuszcza się, że obok receptorów powierzchniowych istnieją również receptory chromatynowe czynników wzrostu [36, 37], które mogą działać odmiennie niż receptory powierzchniowe. Stąd w ostatnich 10 latach zwrócono uwagę na możliwość transportu czynników wzrostu do jąder komórek docelowych jako alternatywę ich transportu do lizosomów [5].



Rys. 1. Mechanizm przekazywania sygnału mitogennego przez czynniki wzrostowe do wnętrza komórki: BC – białka cytoplazmatyczne; BG – białka G; CW – czynniki wzrostowe; DG – bisacyloglicerol; Kin. C – kinaza

## TRANSPORT CZYNNIKÓW WZROSTU DO JĄDER KOMÓREK DOCELOWYCH

Do połowy lat siedemdziesiątych uważano, że czynniki wzrostu wiążą się nieodwracalnie z receptorami na powierzchni błony cytoplazmatycznej i nie mogą czynnie lub biernie przenikać do wnętrza komórki. Przełom w tej dziedzinie stworzyły badania [6], które wykazały, że EGF, znakowany izotopem [ $^{125}$ I], jest aktywnie internalizowany. Zostało to wkrótce potwierdzone przy użyciu metod morfologicznych [14, 43]. Obecnie wiadomo, że czynniki wzrostu są pobierane przez komórki w drodze endocytozy. Internalizacja rozpoczyna się od tworzenia opłaszczonych klatryną pęcherzyków endocytarnych zawierających czynniki wzrostu i ich receptory. Kompleksy te są następnie przenoszone do wnętrza komórki w postaci nieopłaszczonych pęcherzyków określanych mianem receptosomów i degradowane w wyniku fuzji z lizosomami [45].

Wykazano ponadto, że w jądrach nabłonka rogowki i komórek ziarnistych jajnika znajduje się odpowiednio ok. 18% i 15% EGF pobieranego przez te komórki. Z tego 5% EGF (ok. 0,6% całkowitej akumulacji) było nieodwracalnie związane z białkiem o masie cząsteczkowej 185 kDa [41]. Akumulację EGF stwierdzono także w jądrach komórek przysadki mózgowej szczura [19]. Wyizolowane jądra komórkowe oczyszczono za pomocą wirowania przez warstwę 2,2 M sacharozy. W celu wykluczenia zanieczyszczeń oznaczono poziom aktywności



enzymów markerowych błon cytoplazmatycznych oraz wykonano analizę Scatcharda wskazującą na specyficzną wiązanie EGF w tych komórkach [19]. Wykazano także akumulację EGF w jądrach hepatocytów regenerującej wątroby szczura. Akumulacja EGF poprzedzała fazę S cyklu komórkowego. EGF identyfikowano techniką frakcjonowanego wirowania i metodą mikroskopii elektronowej [39], a ok. 70% EGF, ekstrahowanego z jąder komórkowych, można było wytrącić za pomocą specyficznych przeciwciał [5]. Obecność niezdegradowanego EGF związanego silnie z białkami chromatyny [35] stwierdzono także w chromatynie komórek raka okrężnicy (linii SW 948). Za dowód specyficzności akumulacji czynników wzrostu w jądrach komórek docelowych uważa się wykazanie obecności ich receptorów w chromatynie (tab. 1).

Miejscami wiązania EGF, NGF i PDGF na terenie jądra komórkowego są fragmenty chromatyny odporne na trawienie DNAzą II [35]. W wyniku inkubacji komórek ze znakowanymi czynnikami wzrostu wykazano, że peptydy te znajdujące w jądrach komórkowych lub chromatynie były niezdegradowane. Na przykład 95% insuliny internalizowanej przez limfocyty znajdowano we frakcji jądrowej [10, 11], podobnie 70% EGF było akumulowane w jądrach komórek regenerującej wątroby szczura [40]. Stwierdzono także akumulację zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF) w jądrach komórek nabłonka aorty wołu, przy czym najwyższą akumulację zaobserwowano w fazie G<sub>1</sub> cyklu komórkowego [2]. Wykazano także obecność niezdegradowanego EGF, NGF i PDGF w chromatynie jąder komórek nowotworowych [35]. Badania te dowodzą, że czynniki wzrostu są internalizowane w kompleksach ze specyficznymi receptorami i są przenoszone do jąder komórkowych, gdzie wiążą się z chromatyną. Przepływ substancji pomiędzy cytoplazmą a jądrem komórkowym został obszernie omówiony w pracy Horsta [15]. Lokalizację czynników wzrostu w strukturach jąder komórek docelowych przedstawiono w tabeli 2.

## WIĄZANIE CZYNNIKÓW WZROSTU Z JĄDRAMI KOMÓREK DOCELOWYCH

Wiązanie czynników wzrostu badano na izolowanych jądrach komórkowych [39], a pobieranie czynników wzrostu przez jądra komórkowe i chromatynę – stosując metody frakcjonowania komórek i autoradiografii [35, 40, 41] oraz metody cytochemiczne [29]. Wykazano, że ocena wiązania czynników wzrostu z izolowanymi jądrami komórek docelowych wymaga usunięcia zanieczyszczeń preparatów błonami cytoplazmatycznymi. Czystość preparatów jąder komórkowych oceniano przy użyciu mikroskopu fazowo-kontrastowego oraz elektronowego [1, 23, 26, 43]. W celu wykazania czystości frakcji jądrowej oznaczono także poziom aktywności enzymów markerowych: 5-nukleotyduazy [12, 40, 48], ATPazy transportującej Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> [12, 47], ATPazy zależnej od Mg<sup>2+</sup> [39] i alkalicznej fosfodiesterazy [26]. O niskim poziomie kontaminacji jąder komórkowych błonami cytoplazmatycznymi świadczy znacznie wyższy stosunek ilości ligandu związanego z jądrami komórkowymi do związanego z błoną cytoplazmatyczną niż iloraz aktywności enzymów markerowych w obu preparatach [12, 39].

Czystości frakcji jąder komórkowych dowodzą także różne stałe dysocjacji układu ligand receptor (K<sub>d</sub>) wyznaczone dla jąder komórkowych i błon cytoplazmatycznych metodą Scatcharda [1, 12, 33]. Zauważono, że przemywanie zawiesiny jąder komórkowych buforem

TABELA 1. Receptory peptydowych czynników wzrostu w jądrach i chromatynie komórek docelowych

Rodzaj komórek	Czynnik wzrostu	Metoda identyfikacji*	Masa cząsteczkowa	Pozycje literaturowe
Wątroba szczura	EGF	W	180 kDa	5
Czerniak ludzki HS 294	NGF	I	230 kDa	34

\*I – immunoprecypitacja przeciwciałem przeciwko receptorowi błony cytoplazmatycznej, W – metoda immunoblotting (*western blotting*) z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko domenie cytoplazmatycznej receptora błonowego

zawierającym 0,12% Triton X-100 redukuje o ponad 85% kontaminację błonami cytoplazmatycznymi [1, 39, 47]. Działanie na nieuszkodzone jądra komórkowe 2% roztworem Tritonu X-100 w buforze powoduje całkowitą dezintegrację obu blaszek otoczki jądrowej, co umożliwiło m.in. wykrycie gonadotropiny kosmówkowej w chromatynie komórek ziarnistych jajnika szczura [33]. Bufor zawierający 1% Triton X-100 usuwa tylko zewnętrzną blaszkę otoczki jądra komórkowego, co pozwoliło wykazać obecność receptorów dla insuliny i NGF w wewnętrznej blaszce otoczki jąder komórkowych [12, 47]. Wyniki omówionych wyżej badań wskazują, że internalizowane czynniki wzrostu są transportowane do jąder komórkowych i wiążą się silnie z chromatyną.

TABELA 2. Lokalizacja czynników wzrostu w strukturach jąder komórkowych

Źródło komórek	Czynnik wzrostu	Lokalizacja	Technika wykrywania*	Pozycje literaturowe
Wątroba szczura	insulina	otoczka jądrowa	ME, FW	13
	EGF	nieustalona	FW, ME, IP	5
Przysadka mózgowa szczura	EGF	nieustalona	FW, FM	19
Rak okrężnicy (linia SW 948)	EGF	chromatyna	FW	35
Neurony grzbietowe embrionów kurzych	NGF	chromatyna	FW, ME	1
Guz chromochłonny (linia PC 12)	NGF	otoczka jądrowa	MW, FW, A	29
Czerniak ludzki (linia Hs 294)	NGF	chromatyna	FW	35
Fibroblasty ludzkie (linia W1-38)	PDGF	chromatyna	FW	35
Tarczycza wołu	insulina	otoczka jądrowa	FW	13
Błona wewnętrzna	bFGF	nieustalona	FW, IF	2

## RECEPTORY CHROMATYNOWE CZYNNIKA WZROSTU NERWU I CZYNNIKA WZROSTU NASKÓRKA

Wykazano, że EGF i NGF wiążą się silnie "receptorem chromatynowym" z białkiem niehistonowym chromatyny [35]. Receptor chromatynowy NGF, wyizolowany z melanocytów i komórek czerniaka złośliwego za pomocą immunoprecypitacji przeciwciałem przeciwko receptorowi powierzchniowemu, jest białkiem o masie cząsteczkowej 230 kDa, natomiast receptor powierzchniowy ma masę cząsteczkową 75 kDa [34]. Technika immunofluorescencji wykazała, że NGF, gromadzący się głównie w jąderku, hamuje syntezę rRNA [36, 37]. Natomiast w komórkach, w których akumulacji NGF nie stwierdza się i komórki posiadają tylko receptor powierzchniowy, syntetaza rRNA nie jest hamowana [36, 37]. Analiza porównawcza składu aminokwasowego receptora chromatynowego wykazała, że zawiera on 28 reszt



metioniny i małą zawartość cysteiny [38]. Natomiast receptor powierzchniowy jest bardzo bogaty w reszty cysteiny, co sugeruje różną strukturę obu białek [38]. Immunoprecypitacja receptora chromatynowego przeciwciałem skierowanym przeciwko receptorowi powierzchniowemu sugeruje, że oba białka mają podobne determinanty antygenowe [38]. Pierwszym doniesieniem wskazującym na istnienie receptora EGF na obszarze jądra komórkowego było wykrycie trwałych połączeń [ $^{125}$ I]-EGF z białkiem o masie cząsteczkowej 185 kDa w jądrach komórek śródbłónka aorty wołu [41]. Technika *Western blotting* wykorzystująca przeciwciała przeciwko domenie cytoplazmatycznej receptora komórkowego, w jądrach komórek wątroby szczura stwierdzono obecność białka immunologicznie identycznego z receptorem powierzchniowym oraz o tej samej masie cząsteczkowej [5]. Bardzo interesujące jest spostrzeżenie grupy Cohena wykazujące [30], że kompleks receptor-EGF wiążący się z chromatyną ma właściwości topoisomerazy zależnej od ATP, która powoduje rozplatanie nici DNA, co może prowadzić do selektywnej ekspresji genów [30].

## PRZYPUSZCZALNY MECHANIZM DZIAŁANIA CZYNNIKÓW WZROSTU W JĄDRACH KOMÓRKOWYCH

Przypuszcza się, że interakcja czynników wzrostu z chromatyną komórek docelowych powoduje fosforylację histonów i białek matryksu jądrowej [5]. Receptory jądrowe czynników wzrostu mogą mieć właściwości kinaz białkowych, których obecność stwierdzono w otoczkach jądrowej [24]. Wykazano ponadto, że w wyniku ekspozycji hepatocytów wątroby szczura na insulinę następuje inhibicja fosforylacji białek i stymulacja aktywności fosfatazy nukleozydotrifosforanów w wyizolowanych jądrach komórkowych [13, 5]. Natomiast EGF hamował aktywność fosfatazy nukleozydotrifosforanów i zwiększał fosforylację białek jądrowych [13]. Nie wiadomo jednak, jakie białka były fosforylowane i w jaki sposób fosforylacja tych białek wpływała na pobudzenie transkrypcji genów.

## HIPOTEZA INTRAKRYNOWEJ STYMULACJI KOMÓREK

Przekazywanie informacji dotyczącej wzrostu i różnicowania komórek może odbywać się na drodze endokrynowej, parakrynowej i autokrynowej [18]. W drodze endokrynowej – gdy czynnik wzrostu jest syntetyzowany przez wyspecjalizowane komórki, wydzielany do krwiobiegu i przenoszony z krwią do komórek docelowych [18]. W drodze parakrynowej – gdy czynniki wzrostu są syntetyzowane w wyspecjalizowanych komórkach i przenoszone przez dyfuzję do płynu międzykomórkowego [18], a stamtąd do sąsiadujących komórek. W stymulacji autokrynowej komórkami docelowymi są te same komórki, które syntetyzują i jednocześnie reagują na syntetyzowany przez nie peptyd. Na podstawie badań akumulacji czynników wzrostu w jądrach komórek docelowych Logan [25] sugeruje istnienie mechanizmu intrakrynowego przekazywania informacji. Intrakrynowa stymulacja komórek jest szczególnym przypadkiem regulacji autokrynowej, w której peptydowy czynnik wzrostu nie wydostając się na zewnątrz komórki działa wewnątrzkomórkowo, przypuszczalnie na obszarze jądra komórkowego. Istnienie regulacji intrakrynowej umożliwiło wykrycie czynników

wzrostu nie mających sekwencji sygnałowych, które warunkują przejście przez błony komórkowe. Do czynników wzrostu pozbawionych sygnałowych sekwencji sekrecyjnych należą prekursorzy interleukiny-1 $\alpha$ , interleukiny-1 $\beta$  [25], rzęskowy czynnik neurotroficzny, PDGF [16, 20], a także kwasny (aFGF) i zasadowy (bFGF) czynnik wzrostu fibroblastów (cyt. wg [25]). Tak więc jest bardzo prawdopodobne, że oddziaływanie niektórych czynników wzrostu ma charakter intrakrynowy.

## UWAGI KOŃCOWE

W świetle danych z piśmiennictwa należy sądzić, że mechanizm działania czynników wzrostu w komórkach docelowych nie został dotąd wyczerpująco poznany i wymaga dalszych intensywnych badań. Dotyczy to zwłaszcza transportu czynników wzrostu do jąder docelowych, wiązania z chromatyną, a także efektów pobudzania replikacji DNA i selektywnej ekspresji genów. Nie wyjaśniono dotąd, jaką rolę w pobudzeniu obu tych procesów odgrywa fosforylacja białek jądrowych, nie zidentyfikowano substratów kinaz białkowych oraz nie wykazano, na czym polega oddziaływanie kompleksów receptorów jądrowych czynników wzrostu z chromatyną. Wyniki dotychczasowych badań wskazują ponadto, że obok oddziaływań parakrynowych i autokrynowych oddziaływanie czynników wzrostu na procesy replikacji oraz transkrypcji DNA może mieć charakter intrakrynowy, a więc w pewnym sensie niezależny od czynników zewnętrznych bezpośrednio. Oddziaływania te odgrywają ważną rolę w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych.

## LITERATURA

- [1] ANDRES RY, JENG I, BRANSHAW RA. Nerve growth factor receptors: Identification of distinct classes in plasma membranes and nuclei of embryonic dorsal root neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 2785–2789.
- [2] BALDIN V, ROMAN AM, BOSCH-BIERNE I, ALMARIC F, BOUCHE G. Translocation of bFGF to nucleus is G<sub>1</sub> phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells. *EMBO J* 1990; **9**: 1511–1517.
- [3] BURNS CP, ROZENGURT B. Serum, platelet derived growth factor, vasopresin and phorbol ester increase intracellular pH in Swiss 3T3. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; **116**: 931–938.
- [4] BERRIDGE MJ, IRVINE RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984; **312**: 315–321.
- [5] BURWEN SJ, JONES AL. The association of polypeptide hormones and growth factors with the nuclei of target cells. *TIBS* 1987; **12**: 159–162.
- [6] CARPENTER G, COHEN S. <sup>125</sup>I-labelled human epidermal growth factor. Binding internalization and degradation in human fibroblasts. *J Cell Biol* 1976; **71**: 159–171.
- [7] COCKCROFT S, GOMPERS BD. Role of guanine nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase. *Nature* 1985; **314**: 534–536.
- [8] COHEN S. Purification and metabolic effects of a nerve growth-promoting protein from snake-venom. *J Biol Chem* 1959; **234**: 1129–1137.
- [9] COHEN S, CARPENTER G, KING L. Epidermal growth factor- receptor protein kinase interactions. *J Biol Chem* 1980; **225**: 4834–4842.
- [10] GOLDFINE ID, SMITH GJ, WONG KY, JONES AL. Cellular uptake and nuclear binding of insulin in human cultured lymphocytes: Evidence for potential intracellular sites at in insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 1368–1372.
- [11] GOLDFINE ID, JONES AL, HRADEK GT, WONG KY, MOONEY JS. Entry of insulin into human cultured lymphocytes; Electron microscope autoradiographic analysis. *Science* 1978; **202**: 760–763.



- [12] GOLDFINE ID, CLAWSON GA, SMUCKLER EA, PURRELLO F, VIGNERI R. Gene therapy. *Mol Cell Biochem* 1982; **48**: 3–14.
- [13] GOLDFINE ID, PURRELLO F, VIGNERI R, CLAWSON GA. Insulin and the regulation of isolated nuclei and nuclear subfractions: potential relationship to mRNA metabolism. *Diabetes Metab Rev* 1985; **1**: 119–137.
- [14] HAIGLER HT, McKANNA JA, COHEN S. Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A431. *J Cell Biol* 1979; **81**: 382–395.
- [15] HORST A. Przepływ substancji pomiędzy cytoplazmą a jądrem komórkowym. w druku.
- [16] ISHIKAWA F, MIYAZONO K, HELLMAN U, DREXLER H, WERNSTED C, HAGIWARA K, USUKI K, TAKAKU F, RISAU W, HELDIN CH. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 1989; **338**: 557–561.
- [17] JACOBS S, KULL FC, EARP HS, SVOBODA ME, VAN WYK J, CNATRECASAS P. Somatomedin-C stimulates the phosphorylation of  $\beta$ -subunit of its own receptor. *J Biol Chem* 1983; **258**: 9581–9584.
- [18] JAMES R, BRADSHAW RA. Polypeptide growth factors. *Annu Rev Biochem* 1984; **53**: 259–292.
- [19] JOHNSON LK, VLODAVSKY I, BAXTER JD, GOSPODAROWICZ D. Nuclear accumulation of epidermal growth factor in cultured rat pituitary cells. *Nature* 1980; **287**: 340–343.
- [20] JAYE M, HOWK R, BURGESS W, RICCA GA, CHIU IM, RAVERA WM, O BRIEN SJ, MODI WS, MACIAG T, DROHAN WN. Human endothelial cell growth factor: cloning nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* 1986; **233**: 541–547.
- [21] KASUGA M, ZICK Y, BLITHE DL, KARLSONN FA, WARING HU, KAHN CR. Somatomedin-C stimulates the phosphorylation of the  $\beta$ -subunit of its own receptor. *J Biol Chem* 1982; **257**: 9891–9894.
- [22] KLEIN A. Growth factors a new family of regulatory peptides. *Post Bioch* 1987; **33**: 125–150.
- [23] KUSHNARYOV VM, MACDONALD HS, SEDMAK JJ, GROSBERG SE. Murine interferon- $\beta$  receptor-mediated endocytosis and nuclear membrane binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 3281–3285.
- [24] LAM KS, KASPER CB. Selective phosphorylation of nuclear envelope polipeptide by endogenous protein kinase. *Biochemistry* 1979; **18**: 307–311.
- [25] LOGAN A. Intracrine regulation at the nucleus – a further mechanism of growth factor activity. *J Endocrin* 1990; **125**: 339–343.
- [26] MacDONALD HS, KUSHNARYOV VM, SEDMAK JJ, GROSBERG SE. Transport of  $\beta$  interferon into the cell nucleus may be mediated by nuclear membrane receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **138**: 254–260.
- [27] MAJERUS PW, NEUFELD EJ, WILSON DB. Production of phosphoinositide-derived messengers. *Cell* 1984; **37**: 701–703.
- [28] MARCH JC, MOSLEY B, LARSEN A, CRRETI DP, BRAED G, PRICE V, GILLIS S, HENNEY SCH, KRONHEIM SR, GRABSTEIN K, CONLON PJ, HOPP TP, COSMAN D. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 1985; **315**: 641–645.
- [29] MARCHISIO PC, NALDINI L, CALISSANO P. Intracellular distribution of nerve growth factor in rat pheochromocytoma PC12 cells. Evidence for a perinuclear and intranuclear location. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 1656–1660.
- [30] MROCZKOWSKI B, MOSIG G, COHEN S. ATP-Stimulated interaction between epidermal growth factor receptor and supercoiled DNA. *Nature* 1984; **309**: 270–273.
- [31] NISHIZUKA Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 1984; **308**: 693–698.
- [32] PIKE LJ, BOWEN-POPE DF, ROSS R, KREBS EG. Characterization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation in cell membranes. *J Biol Chem* 1983; **258**: 9383–9390.
- [33] RAJENDRAN KG, MENON KMJ. Evidence for the existence of gonadotropin receptors in the nuclei isolated from rat ovary. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; **111**: 127–134.
- [34] RAKOWICZ-SZULCZYŃSKA EM, KOPROWSKI H. Identification of NGF receptor in chromatin of melanoma cells using monoclonal antibody to cell surface NGF receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **140**: 174–180.
- [35] RAKOWICZ-SZULCZYŃSKA EM, RODECK U, HERLYN M, KOPROWSKI H. Chromatin binding of epidermal growth factor, nerve growth factor, and platelet-derived growth factor in cells bearing the appropriate surface receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 3728–3732.
- [36] RAKOWICZ-SZULCZYŃSKA EM, KOPROWSKI H. Antagonistic effect of PDGF and NGF on transcription of ribosomal DNA and tumor cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **163**: 649–656.
- [37] RAKOWICZ-SZULCZYŃSKA EM, LINNENBACH AJ, KOPROWSKI H. Intracellular receptor binding and nuclear transport of nerve growth factor in intact cells and cell-free system. *Mol Carcinogenesis* 1989; **2**: 47–58.

- [38] RAKOWICZ-SZULCZYŃSKA EM, KACZMARSKI W, MOZDANOWSKI J, SPIECHER, KOPROWSKI H. Chromatin receptor for nerve growth factor purified and characterized from melanoma cell line. The growth factors 1992, w druku.
- [39] RAO CHV, MITRA S. Gonadotropin and prostaglandins binding sites in nuclei of bovine corpora lutea. *Biochim Biophys Acta* 1979; **584**: 454–466.
- [40] RAPER SE, BURWEN SJ, BARKER ME, JONES AL. Translocation of epidermal growth factor to the hepatocyte nucleus during rat liver regeneration. *Gastroenterology* 1987; **92**: 1243–1250.
- [41] SAVION N, VLODAVSKY I, GOSPODAROWICZ D. Nuclear accumulation of epidermal growth factor in cultured bovine corneal endothelial and granulosa cells. *J Biol Chem* 1981; **256**: 1149–1154.
- [42] SPORN MB, ROBERTS AB. Autocrine growth factor and cancer. *Nature* 1985; **313**: 747–751.
- [43] SCHLESSINGER J, SHECHTER Y, WILLINGHAM MC, PASTAN I. Direct visualization at binding aggregation and internalization of insulin and epidermal growth factor on living fibroblastic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 2659–2663.
- [44] TAYLOR MV, METCALFE JC, HESKETH TR, SMITH GA, MOORE JO. Mitogens increase phosphorylation of phosphoinositides in thymocytes. *Nature* 1984; **312**: 462–465.
- [45] WILLINGHAM MC, PASTAN I. Cellular controls in differentiation. [red.] LLOYD CW, REES DA, Academic Press, London, 1981: 59–78.
- [46] VALENTINE-BRAUN KA, NORTHUP JK, HOLLENBERG MD. Epidermal growth factor (urogastrone)-mediated phosphorylation of a 35-kDa substrate in human placental membrane: Relationship to the  $\beta$ -subunit of the guanine nucleotide regulatory complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 236–240.
- [47] YANKNER BA, SHOOTER EM. Nerve growth factor in the nucleus: Interaction with receptor on the nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **73**: 1269–1273.
- [48] ZOLMAN JC, THEODOROPOULOS TJ. Localization of putative gonadotropin releasing hormone receptor protein in the anterior pituitary. *Cell Biochem Funct* 1984; **2**: 208–212.

Otrzymano: 10.01.1993 r.

Przyjęto: 20.11.1993 r.

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





## NAGRODY NOBLA 1993 ZDOMINOWANE PRZEZ GENETYKÓW

### THE NOBEL PRIZES FOR 1993 DOMINATED BY GENETICISTS

Regina OSIECKA

Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego

Tegoroczne nagrody Nobla zarówno w dziedzinie chemii jak i fizjologii i medycyny zostały przyznane za fundamentalne odkrycia z biologii molekularnej.

49-letni Dr Kary B. Mullis wynalazł technikę prostego namnażania wybranego odcinka DNA w liczbie wielu milionów kopii. W tej metodzie, znanej jako łańcuchowa reakcja polimerazy (*polimerase chain reaction*, PCR), do zainicjowania reakcji wystarcza tylko jedna cząsteczka DNA. Metoda PCR ułatwiła praktyczne prace w biologii molekularnej, znalazła również zastosowanie np. w medycynie sądowej; nawet znikome ilości tkanki, nasienia czy krwi umożliwiają rozpoznanie ich pochodzenia (tzw. genetyczne odciski palców – *genetic fingerprinting*). Reakcję łańcuchową polimerazy stosuje się również m.in. w diagnostyce nowotworów, do wykrywania chorób dziedzicznych oraz zakażeń bakteryjnych i wirusowych. Dzięki metodzie PAR możliwe jest np. wykrycie kwasów nukleinowych wirusa HIV u nosicieli, u których rutynowe testy diagnostyczne dają ujemne lub niejednoznaczne wyniki.

Drugim noblistą w dziedzinie chemii jest 61-letni obywatel kanadyjski urodzony w Anglii, Michael Smith. Opracował on metodę przeredagowywania informacji genetycznej zwartej w DNA poprzez tzw. ukierunkowaną mutagenezę (*site directed mutagenesis*). Metoda ta przyczyniła się do postępu w inżynierii genetycznej dając możliwość dokonywania metodami chemicznymi wymiany nukleotydów w DNA, a w efekcie – precyzyjną modyfikację składu i struktury białek. Dzięki ukierunkowanej mutagenie można wyprodukować np. bardziej stabilne formy hemoglobiny do produkcji sztucznych substytutów krwi czy enzymy o większej wydajności i odporności np. na wysoką temperaturę. Duże nadzieje wiąże się również z zastosowaniem ukierunkowanej mutageny w medycynie: w terapii genowej i produkcji przeciwciał.

Obie techniki zrewolucjonizowały metody w pracowniach naukowych i znalazły już szerokie zastosowanie w przemyśle biofarmaceutycznym.



Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny uhonorowano 50-letniego Richarda J. Robertsa i 49-letniego Philipa A. Sharpa za wykazanie, że pojedyncza cząsteczka mRNA adenowirusa odpowiada 4 różnym obszarom kodującego go DNA.

Roberts i Sharp pracowali niezależnie od siebie, a wyniki swoich badań opublikowali w odstępie zaledwie tygodnia, wiosną 1977 roku. Richard J. Roberts jest Anglikiem; w 1969 r. wyjechał do USA, aby pracować w Cold Spring Harbor Laboratory w Nowym Jorku. Obecnie jest dyrektorem naukowym w New England Biolabs w Beverly, Massachusetts. Philip A. Sharp, Amerykanin, jest kierownikiem Department of Biology, Institute of Technology w Massachusetts. Na spotkaniu w Cold Spring Harbor w czerwcu 1977 r. obaj przedstawili oddzielnie wyniki swych badań, co wywołało prawdziwą sensację oraz rewolucję w dotychczasowych poglądach na strukturę genów. Aż do tego spotkania niepodzielnie panował pogląd, że geny stanowią ciągłą cząsteczkę DNA służącą jako wzorzec dla mRNA, a z kolei ta cząsteczka jest matrycą podczas syntezy białka. Taki pogląd był zrozumiały, ponieważ wszystkie badania na modelowych organizmach prokariotycznych popierały tę teorię. Biologowie molekularni oczekiwali więc, że analogiczny system odnajdą w organizmach wyższych. Nikt nawet nie przypuszczał, że zamiast istnienia ciągłej sekwencji DNA, geny eukariotyczne mogą składać się z kilku części oddzielonych od siebie długimi odcinkami DNA nie zawierającego informacji genetycznej.

Roberts i Sharp wykazali jednak, że przynajmniej w odniesieniu do adenowirusów, dotychczasowy model budowy genów jest nieprawdziwy; mRNA składa się z oddzielnych obszarów wirusowego DNA. W DNA sekwencje kodujące (eksony) są oddzielone sekwencjami nie odnajdywanymi w mRNA (introny). Ujawnienie ich wyników spowodowało dosłownie lawinę badań, a następnie publikacji, które dowodziły istnienia podobnej budowy niemal wszystkich genów *Eukaryota*. Philip A. Sharp wspomina, że nie miał nawet czasu, aby nacieszyć się swoim odkryciem, nad którym pracował przez 10 lat, ponieważ w ciągu dwóch miesięcy od ogłoszenia wyników jego i Robertsa wszyscy dookoła mówili, jakby to było oczywiste, że taką samą strukturę zobaczyli w wielu genach *Eukaryota*. Sekwencje intronowe wykryto nie tylko w genach struktury, lecz również w genach dla rRNA i tRNA zarówno w genomie jądrowym, jak i mitochondrialnym oraz plastydowym.

Można powiedzieć, że Roberts i Sharp mieli szczęście odkrywając podzieloną strukturę genów jako pierwsi. Szybkie udoskonalanie technik badawczych w tym czasie, m.in. sekwencjonowania nukleotydów, wykazałoby z pewnością wkrótce taką budowę genów. Jednak to oni właśnie uświadomili sobie ten fakt, zanim zrobił to ktokolwiek inny "widząc" składanie mRNA w mikroskopie elektronowym. Inni naukowcy patrząc na takie same obrazy po prostu ich nie rozumieli.

Większość genów zawiera zaledwie kilka eksonów, ale niektóre z nich mają ich ponad 50. Najdłuższym poznanym u człowieka genem jest zlokalizowany w chromosomie X gen DMD wywołujący dystrofię mięśniową Duchenna. Zawiera on 2,5 miliona par zasad, co stanowi ponad 1% DNA chromosomu X. Gen DMD zbudowany jest z ponad 75 eksonów przedzielonych intronami o średniej wielkości 35 kb. Strukturę ciągłą mają tylko nieliczne geny *Eukaryota*, jak np. geny dla histonów czy niektórych interferonów.

Introny podlegają transkrypcji razem z sekwencjami kodującymi genu, a wszystkie typy transkryptów (pre-mRNA, pre-rRNA lub pre-tRNA w zależności od rodzaju genu) przepisywanych z DNA przez odpowiednie polimerazy ulegają w jądrze modyfikacjom. Zespół zdarzeń zachodzących w jądrze po transkrypcji i prowadzących do przetworzenia pre-RNA w cytoplazmatyczne formy RNA określane jest terminem "dojrzewianie" (*processing*). W tym

czasie następuje "składanie" (*splicing*) RNA, podczas którego introny są precyzyjnie wycinane, a sekwencje kodujące łączone razem. Innym mechanizmem zmiany struktury pierwszorzędowej pierwotnego transkryptu jest "redagowanie" (*editing*) RNA, podczas którego zachodzą inne niż wycinanie intronów modyfikacje, jak np. przyłączenie sekwencji CCA do końca 3' transkryptów tRNA lub tzw. czapeczki (*cap*) do końca 5' większości eukariotycznych mRNA.

Odkrycie dokonane przez Roberta i Sharpa było fundamentalne w dziedzinie biologii molekularnej i stanowiło podstawę, bez której przyznanie kilku ostatnich nagród Nobla nie byłoby możliwe. David Baltimore, który otrzymał nagrodę Nobla za odkrycie odwrotnej transkryptazy, łamiąc w ten sposób również zasadnicze dogmaty na temat związku pomiędzy DNA, RNA i białkami, powiedział, że "...wszystko co się stało w biologii molekularnej od tego czasu było zależne od odkrycia procesu składania RNA i stało się motorem do podjęcia badań na tym polu przez wielu naukowców".

Wpływ odkrycia tegorocznych noblistów dokonanego 16 lat temu był ogromny; nastąpił bowiem przełom w badaniach w zakresie biologii komórki, zarówno na poziomie podstawowym w sensie zrozumienia zasadniczych mechanizmów molekularnych, jak i pewnych dziedzin medycyny, takich jak choroby dziedziczne i nowotwory. Około 1/4 z 5000 badanych chorób dziedzicznych wynika z mutacji, które powstają podczas procesu składania RNA. Klasycznym już dzisiaj przykładem są niektóre rodzaje  $\beta$ -talasemii spowodowane defektami w składaniu genów globinowych. Błędy podczas składania RNA mogą również prowadzić do powstania pewnych form nowotworów oraz przypadkowo transformować normalne geny w onkogeny.

Z drugiej jednak strony istnienie genów podzielonych pozwala na bardziej elastyczne i twórcze wykorzystanie materiału genetycznego. Przede wszystkim proces składania RNA może zachodzić kilkoma różnymi drogami i w ten sposób gen zbudowany z kilku eksonów może być składany na kilka różnych sposobów, a więc kodować odmienne białka, jak np. ma to miejsce przy formowaniu dwóch form tropomiozyny, z których jedna występuje w fibroblastach, a druga w komórkach mięśniowych. Istnieją również dane wskazujące, że w obszarach intronów zlokalizowane są sekwencje pełniące rolę modulatorów transkrypcji. Możliwe również, że sam proces ewolucji mógł być przyspieszony w wyniku istnienia genów podzielonych i procesów związanych z ich składaniem. Walter Gilbert z Uniwersytetu Harvarda w ciągu roku od odkrycia Roberta i Sharpa zaproponował ewolucyjny model znany jako "składanie genów o różnych kombinacjach" (*exon shuffling*) oparty na wspomnianym powyżej alternatywnym mechanizmie składania RNA. Według tego modelu połączenie w nową konstrukcję kilku eksonów pochodzących z różnych źródeł może wytworzyć natychmiast nowy gen kodujący nową funkcję. Potencjalnie jest to znacznie szybsza droga niż stopniowa akumulacja długich serii mutacji w już istniejącym genie.

Powstanie intronów jest wciąż zagadką. Czy były one obecne na samym początku tworzenia się życia, lecz zostały usunięte z prostych szybko replikujących DNA organizmów jako akt molekularnej ekonomii, czy też są formą "molekularnego pasożyta", który "zainfekował" tylko komórki eukariotyczne? Zwolennicy obu idei mają pewne dowody na ich poparcie, lecz wciąż jeszcze nie dość przekonujące.

Z pewnością przyznanie tegorocznej nagrody Nobla za odkrycie sprzed 16 lat było opóźnione. Nie po raz pierwszy zresztą; wystarczy przypomnieć chociażby Barbarę McClintock uhonorowaną tym wyróżnieniem w 1984 roku, po 33 latach od przedstawienia w 1951 roku w Cold Harbor wyników jej 6-letnich badań nad ruchomymi elementami genetycznymi



u kukurydzy. Pierre Chambon będący jednym z naukowców, który odkrył podzieloną strukturę innego genu – owoalbuminy kurzej, powiedział, że nie miał wątpliwości, że któregoś dnia P.A. Sharp zdobędzie nagrodę Nobla; nie tylko za odkrycie z 1977 r., lecz także za późniejsze prace będące jego kontynuacją, dotyczące w szczególności badań nad mechanizmami procesu składania RNA, regulacji i przebiegu procesu transkrypcji. Zarówno Roberts, jak i Sharp pracowali oczywiście w grupie badawczej i każdy z członków ich zespołów miał znaczny udział w dokonaniu tego przełomowego dla biologii odkrycia, jednak tradycyjnie w nagrodzie Nobla nie uwzględnia się tego faktu.

W piśmiennictwie polskim ukazało się szereg artykułów przeglądowych na temat budowy genów eukariotycznych i procesów związanych z dojrzewaniem RNA, między innymi:

Boguta M, Putrament A: Geny globinowe człowieka: ich budowa i układ w chromosomach. *Postępy Biochemii* 1984; 30: 27–52,

Filipowicz W.: Geny podzielone i składanie RNA. *Kosmos* 1985; 34: 41–66,

Fronk J.: Geny mozaikowe – struktura, ekspresja, ewolucja. *Postępy Biochemii* 1982; 28: 3–245,

Hübner H., Dzwonkowska A., Osiecka R.: Postępy w poznaniu struktury materiału genetycznego u *Eukariota*. II. Struktura genów. *Postępy Biologii Komórki* 1982; 9: 149–176,

Krzanowska H.: Ewolucja genów. *Kosmos* 1987; 36: 297–313,

Sieliwanowicz B.: Składanie jądrowych prekursorów mRNA. *Postępy Biochemii* 1988; 34: 351–360,

Swat W., Bułaj G., Szopa J.: Ekspresja eukariotycznych genów rDNA. *Postępy Biochemii* 1990; 1–2: 4–13.

Szala S.: Ekspresja i budowa genu u *Eukaryota*. *Postępy Biologii Komórki* 1990; 15: 413–430,

Szymański M., Barciszewski J.: Redagowanie RNA – nowoodkryty mechanizm zmian informacji genetycznej. *Postępy Biochemii* 1990; 1–2: 1–4.

## Z KRONIKI

### V OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA BIOLOGII KOMÓRKI – Wrocław 2–4 lipiec 1993

W dniach od 2 do 4 lipca 1993 r. odbyła się we Wrocławiu V Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki. Została ona zorganizowana przez Katedrę Fizyki i Biofizyki Akademii Rolniczej we Wrocławiu wraz z Komitetem Cytobiologii PAN (i dzięki jego inspiracji), Polską Sieć Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO i Fundację Biologii Komórki i Biologii Molekularnej. Główna pomoc finansowa pochodziła z Polskiej Sieci Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej, a główna pomoc rzeczowa – z Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Pewna pomoc została również udzielona przez Polskie Towarzystwo Biofizyczne, Wrocławski Oddział PAN i, w ogólności, Wrocławskie Środowisko Naukowe.

Członkami Komitetu Honorowego byli: prof. dr Zdzisław Bubnicki (Przewodniczący Wrocławskiego Oddziału PAN), prof. dr Zbigniew Knapik (Rektor Akademii Medycznej we Wrocławiu), prof. dr Aleksander Koj (Dyrektor Wydziału Nauk Przyrodniczych PAU), prof. dr Jerzy Kowalski (Rektor Akademii Rolniczej we Wrocławiu), prof. dr Leszek Kuźnicki (Prezes Polskiej Akademii Nauk), prof. dr Stanisław Miękis (Przewodniczący Miejskiej Rady m. Wrocławia), prof. dr Marian Nordarski (Dyrektor Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN), prof. dr Wojciech Wrzesiński (Rektor Uniwersytetu Wrocławskiego).

Do Komitetu Naukowego należeli: prof. dr Jan Doroszewski, prof. dr Jerzy Fabiszewski, prof. dr Janina Kaczanowska, prof. dr Włodzimierz Korohoda, prof. dr Janina Kuczera, prof. dr Andrzej Legocki, prof. dr Maciej Nałęcz, prof. dr Maria Olszewska, prof. dr Stanisław Przystański, prof. dr Czesław Radzikowski.

Komitet Organizacyjny stanowili: Andrzej Fogt, Janina Gabrielska, Jerzy Hładyszowski, Mieczysław Kilian, Halina Kleszczyńska, Teresa Kral, Krystian Kubica, Janina Kuczera (zastępca przewodniczącego), Stanisław Przystański (przewodniczący), Bożenna Różycka-Roszak, Janusz Sarapuk (zastępca przewodniczącego), Zenon Trela, Bogdan Tomicki.

W Konferencji uczestniczyło ponad 400 osób, w tym 50 zaproszonych wykładowców. Prof. Leszek Kuźnicki, Prezes PAN, wygłosił wykład inauguracyjny pt.: "Ewolucja pierwotniaków jako swoista droga rozwoju komórki eukariotycznej". Pozostałe wykłady zostały zaprezentowane na 7 sympozjach:

- 1) Biomatematyka (Przewodniczący prof. dr Jan Doroszewski),
- 2) Błony biologiczne (Przewodnicząca prof. dr Janina Kuczera),
- 3) Cytoszkielek i ruchy komórkowe (Przewodniczący prof. Andrzej Grębecki),



- 4) Komórka w środowisku skażonym (Przewodniczący prof. dr Jerzy Fabiszewski),
- 5) Patologia komórki (Przewodniczący Prof. dr Czesław Radzikowski),
- 6) Procesy różnicowania komórki (Przewodnicząca Prof. dr Janina Kaczanowska),
- 7) Regulacja i proliferacja cyklu komórkowego (Przewodnicząca Prof. dr Maria Olszewska).

Wykłady sympozjalne zostały przedstawione przez następujących wykładawców: prof. prof.: L. Badura, M. Bartoszkiewicz, S.M. Biliński, Z. Błach-Olszewska, J. Chmielowski, J. Bogusławska-Jaworska, J. Doroszewski, S. Fabczak, M. Fikus, L. Grębecka, A. Grębecki, B. Grzelakowska-Sztabert, E.A. Gwóźdź, J. Hładyszowski, A. Horst, A.D. Inglot, P. Janik, Z. Józwiak, P. Karolewski, J. Kawiak, W. Korohoda, W.M. Krajewska, J.L. Kulikowski, A. Lipińska, G. Lorenc-Plucińska, J. Małuszyńska, L.E. Mejnartowicz, J. Michejda, M.J. Nałęcz, W. Prus-Głowacki, C. Radzikowski, M.Z. Ratajczak, J. Skierski, T. Skórski, H. Strzelecka-Gołaszewska, J. Siewiesiuk, W. Swat, K. Turnau, T. Tyrakowski, M. Ugorski, Z. Walter, A. Woźny, L. Zamorska, T. Zawadzki.

Poza wykładami zaprezentowano ok. 250 plakatów i krótkich doniesień ustnych oraz przeprowadzono dyskusje okrągłego stołu. Streszczenia wykładów, komunikatów i plakatów zostały ujęte w tomie o 358 stronach.

Poruszona tematyka była bardzo różnorodna. Jednakże pewne problemy były dominujące. Według opinii przewodniczących Sympozjów należały do nich następujące problemy:

Sympozjum 1: Komputerowe przetwarzanie obrazów i analiza obrazów w biologii komórki.

Sympozjum 2: Mechanizmy transportu substancji przez błony biologiczne i modelowe oraz wpływy różnych substancji biologicznie czynnych (leki, pestycydy, zanieczyszczenia) na strukturę i funkcje błon.

Sympozjum 3: Wpływ czynników skażonych (a zwłaszcza metali ciężkich, dwutlenku siarki i ozonu) na życie komórki i osobnika; zwracano szczególną uwagę na wrażliwość struktur komórkowych, na możliwość wytwarzania mechanizmów tolerancji na czynniki skażające i na możliwość wykorzystania wyników w praktycznych poczynaniach w dziedzinie ochrony środowiska.

Sympozjum 4: Dynamika filamentów aktynowych (rola ortofosforanu w polimeryzacji aktyny oraz białek regulujących jej polimeryzację), zachowanie się podbłonowego cytoskieletu aktynowego w mięśniowych komórkach ruchliwych (jego wsteczny transport w trakcie ruchu komórki i cykliczne rozszczepianie kompleksu cytoskielet – błona) i krytyczne omówienie tradycyjnych metod ilościowej analizy ruchów komórkowych.

Sympozjum 5: Patologia limfocyta i znaczenie badań podstawowych dla postępu w diagnostyce i leczeniu chorób nowotworowych – mechanizmy indukcji tolerancji immunologicznej w grasicy oraz zaburzenia w rozpoznawaniu antygeny i odpowiedzi limfocytów w immunopatologiach ludzkich, procesy rozrostowe układu limfatycznego oraz możliwości ingerencji terapeutycznych, zaburzenia cyklu komórkowego i rola receptorów, w tym enzymatycznych, antygenowych oraz struktur cukrowych w ekspresji i utrzymaniu fenotypu nowotworowego komórki, znaczenie prognostyczne oznaczania markerów cyklu komórkowego, plodii i wskaźników proliferacji oraz zaburzenia ekspresji i mutacja genu supresorowego p 53 w procesie nowotworowym.

Sympozjum 6: Genetyczna kontrola procesu różnicowania w trakcie rozwoju wraz z mechanizmami molekularnymi determinacji przestrzennej mitogenezy.

Sympozjum 7: Różnicowanie komórek na wybranych modelach zwierzęcych i roślinnych.

W trakcie Konferencji odbyły się, pomimo ogromnie napiętego programu, różne inne spotkania naukowe i naukowo-organizacyjne. Przede wszystkim należy podkreślić pierwsze Walne Zgromadzenie Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, powstałego przede wszystkim dzięki energii prof. W. Kilarskiego, który został wybrany pierwszym prezesem tego Towarzystwa.

Koszta Konferencji były dość niskie. Wpływy pochodziły głównie z dotacji Sieci Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej (ok. 130 milionów zł), z wpisowego uczestników (150 tysięcy zł od osoby) oraz z drobnych kwot pochodzących z Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biofizycznego i z dotacji firm prezentujących swoje wyroby. Główne wydatki dotyczyły opłacenia pobytu zaproszonych wykładowców, usług poligraficznych i ogólnych (pocztowe, usługi techniczne itp.). Organizatorzy sądzą, że korzyści wynikające z odbycia się Konferencji z nawiązką kompensują nakłady poniesione na jej organizację. Wydaje się, że spotkanie biologów komórki ze stosunkowo licznymi przedstawicielami biochemików, biofizyków, lekarzy, rolników, biotechnologów zaowocują nowymi współpracami. Sądząc po liczbie uczestników V Konferencji zainteresowanie biologią komórki wzrasta. Zwrócił na to uwagę prof. dr Włodzimierz Korohoda (Przewodniczący Komitetu Cytobiologii PAN), który zamykając Konferencję wyraził nadzieję, że zainteresowanie to znajdzie swój wyraz również w organizacji VI Konferencji Biologii Komórki w 1996 r.

Ja ze swej strony pragnę złożyć podziękowanie wszystkim, którzy przyczynili się do zorganizowania Konferencji, a w szczególności pracownikom Katedry Fizyki i Biofizyki Akademii Rolniczej we Wrocławiu.

*Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego  
prof. dr hab. Stanisław Przestalski*

## XXIII KONFERENCJA SZKOLENIOWA – REGULACJA SPERMATOGENEZY

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Anatomicznego i Polskiego Towarzystwa Historii i Cytochemików oraz Redakcja "Postępów Biologii Komórki" zorganizowały doroczną XXIII konferencję szkoleniową z zakresu biologii komórki na temat: REGULACJA SPERMATOGENEZY w dniu 20 listopada 1993 r. w Warszawie. Obrady odbyły się w sali wykładowej im. L. Paszkiewicza w Anatomicum Akademii Medycznej przy ul. Chałubińskiego 5. Program konferencji przedstawiał się następująco:

Otwarcie konferencji i wprowadzenie – doc. dr hab. Paweł SYSA

Spermatogeneza u bezkręgowców – dr Jacek GODULA

Lokalne mechanizmy regulujące funkcje gonady męskiej w świetle badań *in vitro* nad efektami modulacji receptora LH w komórkach Leydiga – dr Marek NIEDZIELA, prof. dr hab. Andrzej ŁUKASZYK

Immunologiczne aspekty spermatogenezy u ssaków – doc. dr hab. Marek KURPISZ

Rola komórek Leydiga w lokalnej kontroli gonady męskiej – doc. dr hab. Barbara BILIŃSKA

Mechanizmy regulacyjne w najądrzach ssaków – prof. dr hab. Lidia RÓŻEWICKA

*Organizatorzy*



## RECENZJA

*Recenzja książki dr hab. biol. med. Krystyny Czyżewskiej pt.: "Funkcje mezotelium otrzewnej – studium problemu w medycynie eksperymentalnej" PWN, Warszawa-Poznań 1992, 131 s. 347 poz. bibl.*

Recenzowana książka dotyczy czynności otrzewnej i głównie omawia warstwę mezotelialną. Monografia stanowi ciekawe poznawczo ujęcie problematyki funkcji tak ważnej błony biologicznej. Zwraca ponadto uwagę aktualność tematyki w praktyce lekarskiej. Dzieło liczy 131 stron druku i podzielone jest na 4 rozdziały, poprzedzone wprowadzeniem. Autorka uzasadnia w nim sens podjęcia analiz, podaje syntetyczne dane dotyczące morfologicznych, czynnościowych i leczniczych aspektów badań błony otrzewnej. Tego rodzaju wstępne zorientowanie czytelnika o istocie i metodyce pracy uważam za słuszne i pożyteczne.

W rozdziale I opisano budowę i czynności mezotelium ssaków, które można zgrupować w ramach trzech głównych funkcji tej tkanki: ochronnej, syntetyzująco-sekrecyjnej oraz transportowej. Tym ostatnim funkcjom mezotelium przede wszystkim jest poświęcona oceniana praca.

W rozdziale II przedstawiono rolę błony otrzewnej w procesie wydalania i absorpcji cząsteczek i to głównie w warunkach *in vivo*. To szczegółowe i kompetentne opisanie struktury i funkcji otrzewnej ze szczególnym uwzględnieniem mezotelium w warunkach fizjologicznych, a także podczas dializy otrzewnej i zapalenia otrzewnej oraz wpływu środków farmakologicznych na wydajność tego zabiegu leczniczego (I i II rodz.) jest dobrym przeglądem aktualnej wiedzy w tym zakresie. Można je uważać za wprowadzenie do badań doświadczalnych zawartych w następnym rozdziale, ale opracowanie to samo w sobie stanowi także znakomitą lakturę dla każdego nefrologa, a szczególnie dla kogoś, kto rozpoczyna badania w zakresie morfologii lub funkcji otrzewnej. Rozdział II zawiera opis badań własnych przeprowadzonych *in vitro*, dotyczących funkcji transportowej mezotelium otrzewnej zwierzęcej oraz człowieka. Badania te są dobrze udokumentowane 10 tabelami oraz 20 rycinami.

Porównanie funkcji transportowych błony otrzewnej w badaniach *in vivo* oraz *in vitro* Autorka zamieściła w rozdziale IV. Omówienie dynamiki i kierunków transferu oraz czynników modyfikujących ten proces jest bardzo obszerne na tle współczesnego piśmiennictwa przedmiotu. Podsumowanie zawiera 20 akapitów zawierających syntetyczny opis badań wykonanych przez Autorkę oraz dotychczasowych osiągnięć teorii i praktyki medycznej w zakresie funkcji mezotelium otrzewnej. Przy całościowej ocenie książki uważam za konieczne stwierdzić, że każdego czytelnika dobrze zorientowanego w omawianych zagadnieniach uderza erudycja autorki i wszechstronne wykorzystanie wyników badań własnych dla uzyskania danych, ważnych dla klinicysty. Poza więc oryginalnością wielu wymienionych spostrzeżeń jest to dodatkowy walor tej pracy, wnoszącej dużo nowych informacji dla lecznictwa nefrologicznego.

*prof. dr hab. Kazimierz Bączyk*

## TREŚĆ

## Zeszyt 1

W tym zeszycie Postępów Biologii Komórki	1
Z kroniki	2
WÓJCIK C.: Znaczenie metylacji DNA u eukariontów	3
KSIĄŻKIEWICZ-KAPRALSKA .: Oogeneza owadów	25
HRABIEC E., PŁUCIENNICZAK A.: Budowa i rola histonu H1	35
SĄCZYŃSKA V.: Molekularny mechanizm fotoinhibicji	45
KOWALCZYK S.: Fruktozo-2,6-bisfosforan, efektor integrujący metabolizm cukrów i pirofosforanu w przedziałach subkomórkowych roślin	67
KAWIAK J., JAKÓBISIAK M.: Niektóre funkcje kinaz białkowych i fosfotaz białkowych związanych z regulacją cyklu komórkowego	87
SIKORSKI A.F., DIAKOWSKI W., KUCZEK M.: Szkielet błony erytrocytu	93
WITKOWSKI J.M.: Zmiany w błonie jako składnik procesu starzenia się	111

## Zeszyt 2

W tym zeszycie Postępów Biologii Komórki	133
PIEŃKOWSKA 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., GWÓZDŹ E.A.: Białka szoku termicznego i ich rola w komórkach roślinnych	155
WÓJCICKA-BARTŁOMIEJCZYK 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 modyfikownie genomu ssaków	217
Statut Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki	239
Z kroniki	244
Recenzja	244



### Zeszyt 3

KOPIECZNA-GRZEBIENIAK E., GRABOWSKA-BOCHENEK R.: Funkcje biologiczne $\alpha_2$ -makroglobuliny i jej receptora	245
SZWECH P.: Czynniki pobudzające kolonie granulocytarno-makrofagalne (GM-CSF) i jego kliniczne zastosowanie	257
RATAJCZAK M., GEWIRTZ A.M.: Rola receptorów obdarzonych wewnętrzną aktywnością kinazy tyrozynowej w regulacji krwiotworzenia u człowieka	279
JACKOWSKI G.: Organizacja strukturalna anten energetycznych fotosystemu II	297
HORST A.: Działanie produktów genów przeciwnowotworowych w aspekcie cyklu komórkowego	311
WÓJCIK C.: Mechanizmy regulacji cyklu komórkowego	331

### Zeszyt 4

W tym Zeszycie Postępów Biologii Komórki	353
JAWORSKA-ADAMU J., CYBULSKA R., WAWRZY尼亚K-GACEK A.: Rola astrocytów w ośrodkowym układzie nerwowym	355
ZAWADA M., LATOS-BIELEŃSKA A.: Hybrydyzacja in situ (ISH) w cytogenetyce	363
GOŹDZICKA-JÓZEFIAK A.: Składanie kompleksu preinicjującego transkrypcję genów eukariotycznych	373
OSTROWSKA H.: N-końcowe peptydazy komórkowe. II. Peptydazy dipeptydylowe, tripeptydylowe i omega peptydazy	389
BUTOWT R., BEDNARSKA E.: Metoda mikroanalizy rentgenowskiej w badaniach biologicznych	403
WALOSZEK A.: Współzależności pomiędzy fotosyntetycznym i oksydacyjnym transportem elektronów u pro- i eukariontów	421
TRETYN A., KOPCEWICZ J.: Mutanty fitochromowe w badaniach mechanizmów fotosyntezy roślin	435
JAGODZIŃSKI P.P., TRZECIAK W.H.: Akumulacja czynników wzrostu w jądrach komórek docelowych	447
OSIECKA R.: Nagrody Nabla 1993 zdominowane przez genetyków	457
Z kroniki	461
Recenzja	464

## 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 zamieszcza:

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 nadbityki, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, 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*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

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



## TREŚĆ

W tym Zeszycie Postępów Biologii Komórki	353
JAWORSKA-ADAMU J., CYBULSKA R., WAWRZYNIAK-GACEK A.: Rola astrocytów w ośrodkowym układzie nerwowym	355
ZAWADA M., LATOS-BIELEŃSKA A.: Hybrydyzacja in situ (ISH) w cytogenetyce	363
GOŹDZICKA-JÓZEFIK A.: Składanie kompleksu preinicjującego transkrypcję genów eukariotycznych	373
OSTROWSKA H.: N-końcowe peptydazy komórkowe. II. Peptydazy dipeptydylowe, tripeptydylowe i omega peptydazy	389
BUTOWT R., BEDNARSKA E.: Metoda mikroanalizy rentgenowskiej w badaniach biologicznych	403
WALOSZEK A.: Współzależności pomiędzy fotosyntetycznym i oksydacyjnym transportem elektronów u pro- i eukariotów	421
TRETYN A., KOPCEWICZ J.: Mutanty fitochromowe w badaniach mechanizmów fotosyntezy roślin	435
JAGODZIŃSKI P.P., TRZECIAK W.H.: Akumulacja czynników wzrostu w jądrach komórek docelowych	447
OSIECKA R.: Nagrody Nabla 1993 zdominowane przez genetyków	457
Z kroniki	461
Recenzja	464

***Prenumerata na rok 1994***

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1994 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 + ew. 1 i 2 suplement) na rok 1994:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 400 000 zł,

a dla odbiorców indywidualnych 160 000 zł.

W 1993 r. zostaną wydane dwa suplementy:

1. A. Klein – Peptydowe czynniki wzrostowe, 96 str., ukazał się we wrześniu 1993 r.

2. H. Gabryś (red.) – Postęp w badaniach ruchów komórek, ukaze się w styczniu 1994

Cena pojedynczego zeszytu suplementu 60 000 zł (płatne na konto Fundacji), dla prenumeratorów bezpłatnie.

*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**