

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 21 NR-1'94
(1-96)

Postępy Biologii Komórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki oraz Polskiej Sieci UNESCO 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*

W tym Zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- Bogate w lizynę histony H1 uważane są za regulatory ekspresji genów. Można je rozdzielić na kilka subfrakcji, o czym można przeczytać na stronach 3–14.
- W artykule „Chromosom B – pasożyt czy funkcjonalny składnik genomu?” (s. 15–26) omówiono przypuszczalne pochodzenie, strukturę, wyposażenie genetyczne i rolę biologiczną tych znanych od dawna dodatkowych składników wielu genomów roślin i zwierząt.
- Nowe doniesienia na temat izolowania i subfrakcjonowania matriks jądrowej zreferowano na stronach 27–42.
- Aktywowane trombocyty uwalniają wiele czynników ważnych dla rozwoju zmian miażdżycowych. O ich roli w rozwoju miażdżycy można przeczytać na stronach 43–52.
- Hormony krwiotworzenia, zwane czynnikami pobudzającymi powstawanie i wzrost kolonii komórkowych (CSF), należą do cytokin, czyli białek regulujących przeżycie, rozmnażanie i funkcje komórek. O jednej z cytokin CSF-1 (M-CSF) można przeczytać na stronach 53–68.
- Endoteliny są grupą peptydów obecnych w wielu tkankach i narządach. O fizjologicznej regulacji ich aktywności można się dowiedzieć na stronach 69–78.
- Badania procesów wzrostowych jajnika wskazują na istotną rolę miejscowych regulatorów wzrostu, co omówiono na stronach 79–92.
- Zwięzłe omówienie struktury rodziny centromerowych sekwencji alfoidalnych można znaleźć na stronach 93–96.

HETEROGENNOŚĆ HISTONÓW H1 SSAKÓW

MAMMALIAN H1 HISTONES HETEROGENEITY

*Elżbieta HRABEC, **Andrzej PŁUCIENNICZAK

*Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi; **Centrum Mikrobiologii i Wirusologii Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

Streszczenie. Bogate w lizynę histony H1 uważane są za regulatory ekspresji genów. Uczestniczą w tym procesie poprzez indukowanie zwartej struktury chromatyny oraz przez bezpośrednie lub pośrednie blokowanie wiązania czynników transkrypcyjnych. Postępując się technikami chromatograficznymi i elektroforetycznymi wykazano, że histony H1 można rozdzielić na kilka subfrakcji różniących się składem aminokwasowym i masą cząsteczkową. Poszczególne tkanki danego organizmu mogą różnić się zestawem wariantów H1 oraz ilością poszczególnych subfrakcji, a także dla danej tkanki można zaobserwować różnice gatunkowe w składzie H1. Niektóre tkanki ssaków zawierają dodatkowo inne rodzaje bogatych w lizynę histonów: H1 - H1⁰ i H1t. H1⁰ jest odnajdowany głównie w tkankach o małej aktywności proliferacyjnej czy też nie dzielących się, natomiast H1t jest białkiem specyficznym tkankowo, związanym ze spermatogenezą.

Słowa kluczowe: histon H1, heterogenność histonów, histon H1⁰, histon H1t.

Summary. The lysine rich H1 histones are proposed to serve as general repressors of gene expression by inducing the formation of a compact chromatin structure and by directly or indirectly preventing the binding of transcription factors. Chromatographic and electrophoretic studies demonstrated that the H1 histones can be resolved into several closely related subtypes that vary in amino acid sequence and molecular size. The number of H1 histone variants and relative amounts of each variant can differ from tissue to tissue and for a given tissue can differ from one species to another. Some mammalian cells, however, contain also other types of lysine rich histones, e.g. H1⁰ and H1t. H1⁰ histone is predominantly found in tissues showing little or no cellular proliferation, whereas H1t is the tissue specific protein associated with spermatogenesis.

Key words: H1 histone, heterogeneity of histones, H1⁰ histone, H1t histone.

I. WSTĘP

Spośród wszystkich klas histonów heterogenność jest zdecydowanie największa wśród histonów H1 [11,16,19,28,48]. Mimo, że heterogenność tej klasy białek odkryto już pod koniec lat pięćdziesiątych, długo jeszcze nie przypisywano temu zjawisku znaczenia funkcjonalnego.

Dopiero wyniki badań ostatnich piętnastu lat pozwoliły na wysunięcie hipotezy, w myśl której histony H1 poza tym, że umożliwiają upakowanie DNA w jądrze komórkowym, ze względu na swą zmienność mogą pełnić rolę ogólnego regulatora procesu transkrypcji [22,23,27,-31,41,45,62,69,100]. Ostatnio sugerowano także, że mogą stabilizować struktury mikrotubularne [61].

Heterogenną rodzinę histonów H1 z komórek ssaków można podzielić na podklasy różniące się strukturą oraz funkcją [40].

A) **Histony typu H1 z grasicy cielęcia** stanowią dominujący rodzaj histonu H1; występują powszechnie we wszystkich komórkach ssaków [16,19].

B) **Histon H1^o** – szeroko rozpowszechniony wariant H1 podobny sekwencyjnie do tkankowo specyficznego histonu H5 występującego w jądrzastych erytrocytach ptaków [3,29].

C) **Histon H1t** – specyficzny tkankowo wariant H1, występujący w czynnych spermatogenetycznie jądrach ssaków [33,34,84].

Poza heterogennością wynikającą z różnic w strukturze I rzędowej, źródłem zmienności histonów H1 są modyfikacje potranslacyjne. Najważniejszą modyfikacją, jakiej ulegają histony H1 ssaków, jest fosforylacja [1,13,42,50,58,63,73,76,79]. Częsteczki H1 mogą być także poli(ADP-rybo)zylowane, przy udziale polimerazy poli(ADP-rybozy) [2,72,75,95]. U niższych *Eukaryota* (*Physarum polycephalum*, *Euglena gracilis*) obserwuje się także metylację reszt lizyny [43,90]. Poza tym *in vitro*, a przypuszczalnie także *in vivo* histony H1 ulegają nieenzymatycznej glikozylacji. Jon AlF_4^- stymuluje glikozylację H1 w regionie wiążącym nukleotydy [92]. Ponieważ glin jest pierwiastkiem neurotoksycznym, a jego podwyższony poziom zaobserwowano w neuronach osób cierpiących na chorobę Alzheimera, glikozylacja histonu H1 lub innych białek wiążących nukleotydy może być jednym z czynników, które należy brać pod uwagę rozważając etiologię tej choroby [65,68,92].

II. HISTONY TYPU H1 Z GRASICY CIEŁĘCIA

Z bogatych w lizynę histonów ssaków najlepiej poznanym białkiem jest histon H1 z grasicy cielęcia. Frakcja H1 z tej tkanki jest heterogenna i zawiera 6 składników, w tym cztery dominujące ilościowo [16]. Generalnie, w tkankach ssaków można wyróżnić 5–8 wariantów sekwencyjnych H1 [11,20,49,70]. U myszy i szczura wykryto pięć do sześciu wariantów H1 [54]. Histon H1 z grasicy królika można rozdzielić na osiem subfrakcji. Heterogenność tego histonu obserwuje się także u roślin [5,30] oraz u większości gatunków zwierząt stojących ewolucyjnie niżej niż ssaki [46,71], ale wśród *Eukaryota* są i takie gatunki, które mają tylko jeden wariant sekwencyjny H1 (*Physarum polycephalum*, *Tetrahymena pyriformis* [15,60]), a u *Saccharomyces cerevisiae* w ogóle nie stwierdzono obecności tego histonu. Występuje tam silnie zasadowe białko z charakterystyczną dla histonów H1 sekwencją aminokwasów – PAAKK, ale poza tym brak między nimi podobieństw [21].

Różnice sekwencyjne między subfrakcjami nie dotyczą całych cząsteczek H1. Z porównania poznanych sekwencji subfrakcji histonów H1 grasicy cielęcia, królika oraz śledziony człowieka wynika, że w obrębie 42 początkowych reszt jest ok. 80% zgodności sekwencyjnej, podczas gdy kolejne 80 reszt aminokwasowych (domena globularna) wykazuje niezwykle konserwatywność i dopiero w resztach aminokwasowych obejmujących 2/3 sekwencji C-końcową

można zaobserwować wzrastającą zmienność sekwencyjną [8,64,67]. Homologia między domeną globularną H1 grasicy cielęcia i śledziony człowieka jest całkowita [67], podczas gdy między domeną globularną H1 grasicy królika i śledziony człowieka wynosi 95% [64,67]. Konserwatywność regionu globularnego jest uderzająca (92% zgodności sekwencyjnej), nawet jeśli porównuje się histony H1 tak odległych ewolucyjnie zwierząt jak ptaki (*Gallus sp.* - kura domowa) i ssaki (*Bos taurus* – bydło domowe). W każdym jednak przypadku niezestrukturalizowane domeny cząsteczek H1 wykazują mniejszą konserwatywność sekwencyjną niż region globularny, co nie oznacza przypadkowości w rozmieszczeniu poszczególnych reszt aminokwasowych [52,89]. Region C-końcowy histonów H1 grasicy królika i śledziony człowieka wykazuje zaledwie 75% homologii sekwencyjnej [64,67]. Przypuszczalnie, zmienne regiony cząsteczek H1 ukształtowały się ewolucyjnie zgodnie z pełnioną funkcją, lub też wykazują tak mały stopień specyficzności funkcji, że podlegają niewielkiej presji selekcyjnej [19]. W tym kontekście jest niezwykle interesujące, że w przypadku znacznie bardziej niż H1 konserwatywnych histonów H4 czy H2A i H2B usunięcie dużych fragmentów z N-końca cząsteczki wydaje się nie wpływać na upośledzenie funkcji tych białek [4].

Pomimo znacznej homologii sekwencyjnej między różnymi wariantami H1 różnice strukturalne, które występują między nimi, mają najprawdopodobniej istotne znaczenie funkcjonalne. W roztworze 150 mM NaCl, a więc w warunkach fizjologicznej siły jonowej, subfrakcja H1-3b z grasicy cielęcia jest zestruturalizowana w 75%, podczas gdy subfrakcje H1-1 i H1-2 jedynie w 60%. Stwierdzono ponadto, że między subfrakcjami H1 występują znaczne różnice w ich zdolności do kondensowania DNA. Efekt kondensacyjny z udziałem poszczególnych subfrakcji można uszeregować w następujący sposób: H1-3 < H1-2 < H1-1 [51]. Tak więc subfrakcja H1, która w roztworze ma największą zdolność do strukturalizacji, jest jednocześnie najbardziej efektywna w kondensowaniu DNA.

Różnice między subfrakcjami H1 w ich zdolności do kondensowania DNA wydawały się zaskakujące, skoro wiadomo, że w tworzeniu kompleksu H1-DNA szczególne znaczenie ma konserwatywna sekwencyjnie domena globularna. Zatem, skoro ten region jest identyczny w obrębie subfrakcji H1 z grasicy cielęcia, najprawdopodobniej zewnętrzne domeny cząsteczek H1, różniące się sekwencyjnie mogą wywierać wpływ bądź bezpośredni, bądź też działać pośrednio poprzez wpływ na strukturalizację regionu globularnego.

Poza różnicami w strukturze i rzędowej funkcjonalne znaczenie mogą mieć także różnice w długości poszczególnych wariantów H1. Między subfrakcjami H1 mogą występować różnice w masie cząsteczkowej rzędu 1000 Da. Analizując histony H1 w żelu poliakryloamidowym zawierającym SDS, można zaobserwować, że dla większości tych białek widoczne są dwa pasma różniące się ruchliwością elektroforetyczną. Wydaje się więc prawdopodobne, że różnice w masie cząsteczkowej są powszechne i mogą reprezentować funkcjonalną odrębność między klasą subfrakcji o pełnej długości i klasą krótszych cząsteczek H1. Stwierdzono, że krótsze cząsteczki są mniej efektywne w kondensowaniu DNA i chromatynie.

Mimo że postępując się wyizolowanym DNA wykazano znaczne różnice między subfrakcjami H1 w efekcie kondensacyjnym (subfrakcja H1-1 z grasicy cielęcia słabiej kondensuje DNA niż subfrakcja H1-3), nie było oczywiste, czy zjawiska zachodzące w tak uproszczonym modelu wiernie odzwierciedlają procesy mające miejsce w chromatynie. Jednakże Huang i Cole [39] wykazali, że rozmieszczenie histonów H1 w chromatynie jest niejednolite, a ponadto klasa agregującej chromatyny była wzbogacona w wariant H1 który, jak stwierdzono we wcześniejszych badaniach [51], był najbardziej efektywny w kondensowaniu DNA. Poza tym

Hannon i wsp. [36] wykazali, że subfrakcja H1-3 z grasicy cielęcia silniej hamuje wiązanie polimerazy RNA do DNA niż subfrakcja H1-1.

W kontekście omawianej heterogenności histonów H1 ssaków interesujące są także różnice metaboliczne pomiędzy poszczególnymi wariantami H1 danego organizmu. Wykazano, że zestaw wariantów H1 zmienia się podczas rozwoju i różnicowania [37,46,80,93,96,98], przy czym we wczesnych stadiach rozwojowych ilość histonu H1 mierzona jako procent całkowitego histonu jest mniejsza niż u dojrzałych osobników. Uboższy jest także zestaw subfrakcji H1. Valkonem [93] badając histon H1 z wątroby wołu w różnych stadiach rozwoju tego narządu wykazał, że ilość H1 wzrastała w czasie ontogenezy z ok. 9,2% u 1 miesięcznych embrionów do 21,4% u dojrzałych osobników (procent H1 podano w stosunku do histonu całkowitego). Poza tym u wczesnych embrionów rozróżniano elektroforetycznie jedynie dwa komponenty H1, podczas gdy u osobników dorosłych H1 z wątroby rozdzielał się elektroforetycznie na cztery komponenty. Zmiany w proporcji wariantów H1 są także obserwowane po indukcji hormonami [32], po transformacji nowotworowej [91] oraz w wyniku zmiany tempa podziałów komórkowych [74]. Przypuszcza się, że zmiany te mogą być spowodowane różnicami w szybkości zarówno syntezy, jak i rozpadu poszczególnych subfrakcji H1 [74,96] oraz faktem, że synteza niektórych wariantów H1 nie jest ściśle powiązana z syntezą DNA [74,96] i może przebiegać poza fazą S cyklu komórkowego.

Wiadomo, że rozmieszczenie histonów H1 w chromatynie jest niejednolite [11,25], ale jak dotąd nie są poznane czynniki, które determinują rodzaj odkładanych wariantów H1 w różnych regionach chromatyny. Jednym z tych czynników może być dostępność danej subfrakcji H1 w momencie, kiedy replikowany jest określony gen czy odcinek DNA, a więc kontrola rozłożenia poszczególnych wariantów H1 w chromatynie mogłaby być związana z kontrolą szybkości ich syntezy. Podobnie jak dla histonów rdzeniowych, w fazie S cyklu komórkowego zwiększa się poziom syntezy większości wariantów H1. Jednakże Sizemore i Cole [85] wykazali, że podczas kilku godzin fazy S warianty H1 są syntetyzowane w sposób asynchroniczny. Jedne subfrakcje H1 były syntetyzowane preferencyjnie podczas wczesnej fazy S cyklu komórkowego, czyli w czasie, kiedy w chromatynie opornej na agregację ma miejsce synteza aktywnych genów, podczas gdy inne subfrakcje H1 były preferencyjnie syntetyzowane w późnej fazie S, kiedy odbywa się replikacja nieaktywnych genów i heterochromatyny. W podobnych eksperymentach Ohba i wsp. [66] wykazali, że z pięciu wariantów H1 wątroby myszy dwa były syntetyzowane we wczesnej fazie S cyklu komórkowego. Tak więc Cole [19] wnioskuje, że DNA replikowany we wczesnej fazie S dysponuje innym zestawem subfrakcji H1 niż DNA replikowany w późnej fazie S cyklu komórkowego.

III. HISTON H1⁰

W 1969 r odkryto nowy rodzaj histonu, określony jako H1⁰. Białko to wzbudziło duże zainteresowanie, ponieważ odnajdowano je jedynie w tkankach o małej aktywności mitotycznej, a jego obecność łączono z zahamowaniem syntezy DNA i przypisywano mu funkcję represora podziałów komórkowych [55]. Po zablokowaniu podziałów komórkowych maleje synteza wszystkich histonów, ale dotyczy to w znacznie większym stopniu histonów rdzeniowych niż H1. Jak już dyskutowano wcześniej, niektóre warianty H1 mogą powstawać poza fazą S cyklu komórkowego, a poziom H1⁰ może zwiększać się po zahamowaniu syntezy DNA

3–7-krotnie, co wykazano w kulturach jednorodnych linii komórkowych [35,80]. Badając regenerujące lub rozwijające się tkanki wykazano, że poziom $H1^0$ jest obniżony tak długo, jak długo przebiega synteza DNA, a po jej ustaniu ilość $H1^0$ wraca do normy [94]. Jednakże odwrotnie proporcjonalna zależność pomiędzy ekspresją $H1^0$ a poziomem syntezy DNA nie jest powszechna. Białko to można również odnaleźć w komórkach aktywnie proliferujących [32], natomiast w pewnych niedzieliących się komórkach nie obserwowano jego ekspresji [32]. W niektórych tkankach poziom $H1^0$ jest regulowany przez hormony, niezależnie od proliferacji komórek [32]. Zahamowanie podziałów komórek erytroleukemii Friend bez pobudzenia tych komórek do różnicowania nie jest czynnikiem wystarczającym do zaindukowania syntezy histonu $H1^0$ (białko IP25), podczas gdy czynnik powodujący różnicowanie (np. n-maślan) może indukować syntezę tego białka w komórkach, które kontynuują podziały. Wynika z tego, że synteza DNA nie jest jedynym czynnikiem modulującym ekspresję histonu $H1^0$. Weiss i wsp. [94] zaobserwowali wyraźną korelację między pojawieniem się $H1^0$ a acetylacją histonów (rdzeniowych) i maksymalną aktywnością acetylotransferazy histonowej.

Wzrost ilości $H1^0$ regulowany jest na dwu etapach. Pierwszy, to zwiększenie poziomu transkrypcji genu $H1^0$, co daje w efekcie kilkunastokrotny wzrost poziomu komórkowego $H1^0$ mRNA. Nowo zsyntetyzowany mRNA jest odnajdowany jedynie we frakcji polisomalnej o wysokiej masie cząsteczkowej, co wskazuje że cały $H1^0$ mRNA wykorzystywany jest przez aparat translacyjny [80]. Drugi poziom kontroli syntezy $H1^0$ występuje na etapie translacji. Jakkolwiek wydawałoby się, że zsyntetyzowany $H1^0$ mRNA powinien być wykorzystany w procesie translacji, w istocie wzrost ilości białka (3–4-krotny) jest niższy, niż można by oczekiwać po wzroście poziomu mRNA. Tak więc wydaje się, że po indukcji komórek do różnicowania, synteza $H1^0$ jest regulowana na dwu etapach: pozytywnie na etapie transkrypcji genu i negatywnie na etapie translacji [80].

Dość długo panował pogląd, że histon $H1^0$ jest białkiem charakterystycznym dla tkanek ssaków, ale okazało się, że występuje również w innych organizmach. Poza tkankami ssaków stwierdzono jego obecność u tak odległych ewolucyjnie gatunków, jak: śluzowiec *Physarum polycephalum* [99], małż *Anodonta cygnea* [57] i żaba *Xenopus laevis* [47].

Procentowa zawartość histonu $H1^0$ w tkankach jest niejednakowa i zależy od aktywności proliferacyjnej danej tkanki. W grasicy cielęcia brak jest tego białka lub jego poziom jest niezwykle niski (poniżej 0,5% w stosunku do histonu H1) [86], natomiast komórki łożyska ludzkiego charakteryzują się bardzo wysoką zawartością histonu $H1^0$ (33% w stosunku do histonu H1) [14]. Stwierdzono, że ilość $H1^0$ w obrębie danej tkanki wzrasta z wiekiem [86,93], a ponadto u ssaków w grupie histonów bogatych w lizynę białko to najpóźniej pojawia się w czasie rozwoju embrionalnego [93].

Podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym zawierającym mocznik histon $H1^0$ wykazuje heterogenność i dzieli się na dwie frakcje (określane jako $H1^0a$ i $H1^0b$), obie o nieco większej ruchliwości elektroforetycznej niż histon H1 [87], natomiast poddany elektroforezie w żelu zawierającym SDS wędruje jako pojedyncze pasmo usytuowane przed pasmem histonu H1 [87].

Analiza składu aminokwasowego wykazała znaczne różnice między histonami $H1^0$ i H1 [14,87]. Między innymi histon $H1^0$ ma mniej alaniny niż H1, a także zawiera aminokwasy nie wchodzące w skład H1 ssaków lub występujące tam niezwykle rzadko, takie jak histydyna i metionina. Ponadto, w $H1^0$ wykazano obecność przynajmniej dwu reszt tyrozylowych [87], podczas gdy we wszystkich zbadanych pod tym kątem histonach H1 ssaków tyrozyna występuje jako pojedyncza reszta aminokwasowa, zajmująca 72 pozycję w subfrakcji RTL-3

z grasicy królika [64]. Po określeniu sekwencji histonu $H1^{\circ}$ okazało się, że w istocie białko to bardziej przypomina histon H5 z erytrocytów ptasich niż $H1$ ssaków [26]. Zwłaszcza w obrębie najbardziej konserwatywnej domeny globularnej podobieństwo między $H1^{\circ}$ i $H1$ ssaków jest niewielkie (ok. 50% homologii), podczas gdy homologia sekwencyjna tego regionu między $H1^{\circ}$ człowieka i H5 kurczęcia, czy gęsi, a więc przedstawicielami odległych ewolucyjnie gatunków jest znacznie wyższa, rzędu 75% [26]. O dużym podobieństwie sekwencyjnym między $H1^{\circ}$ i H5 świadczy również fakt, że monoklonalne przeciwciała przeciw histonowi H5 reagują z histonem $H1^{\circ}$ wątroby myszy [83], ale nie dają takiej reakcji z histonem H1.

Z pomiarów jądrowego rezonansu magnetycznego i dichroizmu kołowego [12] wynika, że domena globularna histonu $H1^{\circ}$ ma podobną wielkość jak odpowiadający region histonów H1 i H5 i podobnie do nich spina dwa zwoje DNA, wchodzący i schodzący z nukleosomu, jednakże pod względem konformacji i stabilności przypomina raczej odpowiadający region histonu H5 erytrocytów ptasich. W przeprowadzonych eksperymentach rekonstrukcyjnych wykazano, że chromatyna pozbawiona histonu H1 i zrekonstruowana z histonem $H1^{\circ}$ ma zmienione właściwości. $H1^{\circ}$ w mniejszym stopniu niż H1 chroni DNA chromatysomu przed działaniem nukleazy, a ponadto chromatyna związana z $H1^{\circ}$ ma prawdopodobnie inną strukturę i stabilność niż chromatyna związana z H1 [7,53,77]. Powodem może być mniej efektywne wiązanie DNA z $H1^{\circ}$ czy też słabsza neutralizacja ujemnych ładunków DNA przez cząsteczki tego histonu. Zmniejszenie elektrostatycznych oddziaływań między histonem a DNA nadaje pewną giętkość włóknom chromatyny. Można więc sobie wyobrazić, że *in vivo*, funkcja cząsteczek $H1^{\circ}$ byłaby realizowana poprzez lokalną zmianę struktury chromatyny w obszarze, w którym histony H1 zostały podstawione $H1^{\circ}$.

Smith i Johns [86] badali, czy $H1^{\circ}$ zastępuje cząsteczki H1 w chromatynie, podobnie jak H5 zastępuje H1 podczas dojrzewania erytrocytów ptaków, czy też jest histonem dodatkowym. Uzyskane wyniki sugerują raczej wymianę tych histonów niż dołączanie dodatkowego białka w postaci $H1^{\circ}$ do puli histonów H1 związanych z chromatyną, ponieważ stosunek $H1+H1^{\circ}$ /histony rdzeniowe pozostawał względnie stały mimo wzrostu ilości $H1^{\circ}$ postępującego wraz z dojrzewaniem danej tkanki [80,86]. Wykazano, że w wątrobie myszy poziom $H1^{\circ}$ zostaje ustabilizowany w 6 miesiącu życia i w tym czasie stosunek $H1^{\circ}$ /H1 wynosi ok. 0.5, a więc mniej więcej w co trzecim nukleosomie histon H1 jest podstawiony $H1^{\circ}$ [86]. Zamiana histonu H1 na $H1^{\circ}$ niewątpliwie ma jakieś znaczenie funkcjonalne, aczkolwiek problem ten nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Smith i Johns [86] trawiąc chromatynę nukleazą ze *Staphylococcus aureus* wykazali, że histon $H1^{\circ}$ można odnaleźć w regionach aktywnych transkrypcyjnie, a więc raczej wyklucza to możliwość, aby podobnie jak histon H5 pełnił on funkcję represora procesu transkrypcji. Ponadto z prac przeprowadzonych przez Huang'a i Cole'a [39] wynika, że rozmieszczenie histonów H1 w chromatynie jest nierównomierne i że są one preferencyjnie związane z frakcją heterochromatyny, podczas gdy euchromatyna, zawierająca aktywne geny jest zubożona w H1. Badając rozmieszczenie cząsteczek $H1^{\circ}$ w różnych regionach chromatyny, wykazano, że białko to nie jest preferencyjnie odkładane w żadnej z funkcjonalnie odrębnych klas [44], co również nie przemawia za jego udziałem w represji transkrypcji genów, natomiast fakt, że ilość $H1^{\circ}$ jest w większości przypadków skorelowana z aktywnością mitotyczną danej tkanki (wysoki poziom $H1^{\circ}$ w niedzieliących się komórkach), sugeruje rolę tego białka w represji replikacji DNA. Z drugiej strony, przyjmuje się obecnie, że chromatyna aktywna transkrypcyjnie nie musi być pozbawiona histonu H1 [45,62].

Wnioskowano ponadto, że histon H1^o wpływa na proces różnicowania komórek poprzez zablokowanie genów, których ekspresja ma miejsce we wczesnych stadiach rozwoju. Wykazano, że w wątrobie myszy białko to jest związane z nukleosomami zawierającymi gen-fetoproteiny, którego ekspresja ma miejsce w tkankach embrionalnych i jest zahamowana wkrótce po urodzeniu [78]. Spokrewniony z nim gen kodujący albuminę nie był według Roche'a i wsp. [78] połączony z H1^o. Delabar [24] oraz Mendelson i wsp. [56] uważają jednak, że nukleosomy zawierające gen albuminowy nie są pozbawione histonu H1^o. Wyniki badań przeprowadzonych z zastosowaniem techniki immunofrakcjonowania chromatyny przy pomocy unieruchomionych monoklonalnych przeciwciał przeciw histonowi H5 (reagujących z H1^o ale nie z H1) wykluczają możliwość, aby wszystkie nietranskrybowane geny były związane z H1^o [56]. Wydaje się, że region chromatyny zawierający geny indukcyjne (np. dla cytochromu P-450) jest stosunkowo ubogi w to białko [56].

Tak więc, wyjaśnienie roli histonu H1^o w genomie komórkowym wymaga niewątpliwie dalszych badań.

IV. HISTON H1t

W połowie lat siedemdziesiątych zwrócono uwagę na niezwykley układ histonów H1 występujący w gonadach samców. Sugerowano, że dodatkowe białko określane obecnie mianem histonu H1t związane jest ze spermatogenezą [84]. Początkowo sądzono, że białko to jest charakterystyczne dla gryzoni, ale jak wykazano, towarzyszy spermatogenezie także u innych ssaków, w tym również u człowieka [82].

Podobnie jak somatyczne warianty H1, histon H1t jest uwalniany z chromatyny 0,6 M NaCl, ale w odróżnieniu od typowych H1 nie można go wyekstrahować z chromatyny 5% TCA [81]. Podczas elektroforezy w żelach poliakryloamidowych zawierających mocznik, histon H1t wędruje znacznie wolniej niż somatyczne warianty H1, ale wykazuje większą od nich ruchliwość elektroforetyczną w obecności SDS [81].

Szczegółowo zbadano histony H1 z jąder szczura. Wykazano, że spermatogeneza pociąga za sobą złożone zmiany w populacji histonów bogatych w lizynę [81]. Zmieniają się wzajemne proporcje somatycznych wariantów H1, przy czym najistotniejszą zmianą jest zwiększenie ilości subfrakcji H1a i prawie całkowite zniknięcie subfrakcji H1b. Poza tym, pojawia się nowy, niewykrywalny w organach somatycznych rodzaj histonu – H1t. Także analiza H1t mRNA wskazuje na jego obecność jedynie w jądrach [33]. Białko to pojawia się około dwudziestego pierwszego dnia życia zwierzęcia. Badania histologiczne wykazały, że dwudziestojednodniowe szczury mają w jądrach głównie komórki we wczesnym stadium mejozy (spermatocyty), ale brak jeszcze komórek o zakończonym podziale mejotycznym (spermatydy) [81].

Po chirurgicznym umieszczeniu jąder w brzuchu zwierzęcia olbrzymia większość komórek rozrodczych degeneruje w ciągu dwu tygodni z powodu panującej tam wyższej temperatury. Cewki nasienne wyścielone są małą ilością spermatogonii i komórek Sertoliego. Badanie jąder pozostających w jamie brzusznej przez dwa tygodnie wykazało całkowity zanik histonu H1t, jak również znaczne zmniejszenie ilości H1a i HMG2 [81]. Przemawia to niewątpliwie za powiązaniem obecności histonu H1t ze spermatogenezą i wskazuje, że jest on białkiem tkankowo specyficznym.

Wyniki funkcjonalnej analizy genu H1t sugerują, że blokowanie syntezy histonu H1t odbywa się na etapie transkrypcji, poprzez wiązanie w regionie promotorowym tego genu niezidentyfikowanego jak dotąd białka jądrowego o charakterze represora [33]. Ostatnio Grimes i wsp. [34] wykazali, że niezwykle konserwatywny fragment promotora H1t (o długości 18 par zasad) wiąże w sposób specyficzny polipeptydy o masie 13 i 30 kDa. Polipeptydy te występują jedynie w komórkach rozrodczych w stadium spermatocytów i nie stwierdzono ich obecności (podobnie jak histonu H1t) we wcześniejszych etapach procesu spermatogenezy. Zbieżność czasowa pojawiania się tych wiążących się z DNA białek i H1t mRNA sugeruje, że mogą one być ważnymi czynnikami transkrypcyjnymi oddziałującymi bądź bezpośrednio z promotorem, bądź z innymi czynnikami transkrypcyjnymi (SP1, H1TH2, H1TF1, TF2D) i tą drogą uczestniczyć w tworzeniu kompleksu inicjacyjnego.

Opisano także inne bogate w lizynę histony specyficzne dla pewnych tkanek, np. histon H5 [38], którego występowanie ogranicza się do jądrzystych erytrocytów ptaków i kilku zimnokrwistych kręgowców, czy histony H1 ze spermy jeżowca morskiego [19]. Jednym z pierwszych opisanych wariantów H1 charakterystycznych dla komórek rozrodczych był wariant H1 wykryty w sporocytach lilii i tulipanów. Białka wymienionych gatunków znacznie różnią się składem aminokwasowym od typowych wariantów H1 i są związane z transkrypcyjnie nieaktywną, niedzielną się chromatyną. H1t wykazuje pewne podobieństwo w składzie aminokwasowym zarówno do H5, jak i do H1 ze spermy jeżowca, np. wszystkie trzy wymienione histony mają więcej argininy niż typowe H1 [9,88]. H1t różni się od somatycznych wariantów H1 także mniejszą ilością reszt lizylowych w cząsteczce.

Uderzającą różnicą między somatycznymi subfrakcjami H1 a histonem H1t jest dość wysoka zawartość metioniny w tym ostatnim [18,81]. Histon H1t z jąder szczura ma pięć reszt metionylowych w cząsteczce, podczas gdy w większości subfrakcji H1 ssaków ten aminokwas w ogóle nie występuje. Do wyjątków raczej należy subfrakcja H1c z wątroby szczura, która ma w swoim składzie pojedynczą resztę metionylową [59].

Z analizy sekwencji histonu H1t z jąder knura wynika, że w obrębie domeny globularnej H1t jest bardziej spokrewniony z somatycznymi wariantami H1 niż z H1^o [17]. W regionie między 61 a 92 resztą aminokwasową ma miejsce całkowita zgodność sekwencyjna między H1t a somatycznymi H1, podczas gdy histon H1^o w tej części cząsteczki różni się od wariantów H1 w wielu pozycjach. Jednakże w pozostałych obszarach domeny globularnej występują różnice sekwencyjne między histonami H1t i H1, w sumie w 15 pozycjach. Są to więc znacznie większe różnice niż obserwowane między histonami H1 z tak odległych ewolucyjnie gatunków, jak kura domowa i królik. Jeszcze większe różnice sekwencyjne między H1t a H1 można zaobserwować w obrębie domeny C-końcowej [17]. Na początku tej domeny (pierwsze 25 reszt aminokwasowych) występuje względna homologia, zwłaszcza dotycząca rozmieszczenia reszt lizylowych, ale dalej w kierunku C-końca homologia wyraźnie maleje. W omawianym obszarze, w cząsteczkach H1t z jąder knura występuje 10 reszt arginylowych, podczas gdy w żadnym z dotychczas zsekwencjonowanych histonów H1 ssaków nie wykazano obecności argininy w tym regionie. W subfrakcji RTL-3 z grasicy królika, w domenie C-końcowej występuje 48 zasadowych reszt aminokwasowych, ale wszystkie są resztami lizyny [64]. Z kolei porównując sekwencję aminokwasową histonów H1t z jąder szczura [18] i knura [17] można zaobserwować między nimi stosunkowo wysoki stopień homologii, zwłaszcza w regionie domeny globularnej. Stanowi to dodatkową podstawę do wydzielenia histonów H1t jako odrębnej rodziny białek.

Jak dotąd funkcja tego białka w chromatynie męskich gruczołów rozrodczych nie została jeszcze w pełni poznana. W sposób nie budzący zastrzeżeń wykazano, że ma ono związek ze spermatogenezą, ale jaki jest jego udział w tym niezwykle złożonym procesie, nie zostało jak dotąd wyjaśnione. Być może obecność tego białka jest niezbędna na którymś etapie podziału mejjotycznego, np. histon H1t może być jednym z czynników kontrolujących kondensację chromatyny w stopniu wymaganym do przebiegu mejozy. Stwierdzono, że spermatogenezie u ssaków towarzyszą także zmiany w składzie histonów rdzeniowych [6,97].

Należy podkreślić, że H1t zanika podczas rozwoju spermatyd i nie występuje w jądrach komórkowych dojrzalej spermy [10,33].

LITERATURA

- [1] ADACHI Y, LUKE M, LAEMMLI UK. Chromosome assembly in vitro topoisomerase-II is required for condensation. *Cell* 1990; **64**: 137–148.
- [2] ALTHAUS FR. Poly ADP-ribosylation: a histone shuttle mechanism in DNA excision repair. *J Cell Sci* 1992; **102**: 663–670.
- [3] BANCHEV T, SREBREVA L, ZLATANOVA J. Purification of histone H1⁰ and its subfractions under non-denaturing conditions. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1273**: 230–232.
- [4] BEHE MJ. Histone deletion mutants challenge the molecular clock hypothesis. *TIBS* 1990; **15**: 374–376.
- [5] BERS EP, SINGH NP, PARDONEN VA, LUTOVA LA, ZALENSKY AO. Nucleosomal structure and histone H1 subfractional composition of pea (*Pisum sativum*) root nodules, radicles and callus chromatin. *Plant Mol Biol* 1992; **20**: 1089–1096.
- [6] BHATNAGAR YM, McCULLAR K, FAULKNER RD, GHAI RD. Biochemical and immunological characterization of a histone variant associated with spermatogenesis in the mouse. *Biochim Biophys Acta* 1983; **760**: 25–33.
- [7] BIARD-ROCHE J, GORKA C, LAWRENCE JJ. The structural role of histone H1: properties of reconstituted chromatin with various H1 subfractions (H1-1, H1-2 and H1⁰). *EMBO J* 1982; **1**: 1487–1492.
- [8] BOHM Z, MITCHELL TC. Sequence conservation in the N-terminal domain of histone H1. *FEBS Letters* 1985; **193**: 1–4.
- [9] BRIAND G, KMIĘCIK D, SAUTIERE P, WOUTERS D, BORIE-LOY O, BISERTE G, MAZEN A, CHAMPAGNE M. Chicken erythrocyte histone H5. *FEBS Lett* 1980; **112**: 147–151.
- [10] BUCCI LR, BROCK WA, MEISTRICH ML. Distribution and synthesis of histone 1 subfractions during spermatogenesis in the rat. *Exp Cell Res* 1982; **140**: 111–118.
- [11] BURFEIND P, HOYER-FENDER S, DOENECKE D, TSAOUSIDOU S, ENGEL W. Expression of a histone H1 gene (H1.1) in human testis and Hassall's corpuscles of the thymus. *Thymus* 1992; **19**: 245–251.
- [12] CARY PD, HINES ML, BRADBURY EM, SMITH BJ, JOHNS EW. Conformational studies of H1⁰ in comparison with H1 and H5. *Eur J Biochem* 1981; **120**: 371–377.
- [13] CHAMBERS TC, LANGAN TA. Purification and characterization of growth-associated H1 histone kinase from Novikoff hepatoma cells. *J Biol Chem* 1990; **265**: 16940–16947.
- [14] von CHRISMAR AM, BRITO M, BURZIO LO. Isolation and characterization of histone H1⁰ from human placenta. *Biochem Int* 1982; **5**: 263–269.
- [15] COLAVITO-SHEPANSKI M, GOROVSKY MA. The histone content of *Tetrahymena* ribosomal gene containing chromatin. *J Biol Chem* 1983; **258**: 5944–5954.
- [16] COLE RD. A minireview of microheterogeneity in H1 histone and its possible significance. *Anal Biochem* 1984; **136**: 24–30.
- [17] COLE RD, YORK RG, KISTLER WS. The amino acid sequence of boar H1t, a testis-specific H1 histone variant. *J Biol Chem* 1984; **259**: 13695–13702.
- [18] COLE KD, KANDALA JC, KISTLER WS. Isolation of the gene for the testis-specific H1 histone variant H1t. *J Biol Chem* 1986; **261**: 7178–7183.
- [19] COLE RD. Microheterogeneity in H1 histones and its consequences. *Int J Peptide Protein Res* 1987; **30**: 433–449.
- [20] COLE KD, KANDALA JC, KREMER E, KISTLER WS. Isolation of a genomic clone encoding the rat histone variant, H1d. *Gene* 1990; **89**: 265–269.

- [21] COLLEAUX L, RICHARD GF, THIERRY A, DUJON B. Sequence of a segment of yeast chromosome XI identifies a new mitochondrial carrier, a new member of the G protein family, and a protein with the PAAK motif of the H1 histones. *Yeast* 1992; **8**: 325–336.
- [22] DANEHOLT B, GROSSBACH U. Histone H1 and transcription. *TIBS* 1990; **15**: 463.
- [23] DEDON PC, SOULTS JA, ALLIS CD, GOROVSKY MA. Formaldehyde cross-linking and immunoprecipitation demonstrate developmental changes in H1 association with transcriptionally active genes. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 1729–1733.
- [24] DELABAR JM. Nonrandom location of H1-H1⁰ histones on chromatin of mouse liver and brain. *J Biol Chem* 1985; **260**: 12622–12628.
- [25] DJONDJUROWL, TSVETKOV S, IVANOVA E. Mode of deposition of the histone subtypes during replication. *Exp Cell Res* 1991; **193**: 291–296.
- [26] DOENECKE D, TONGES R. Differential distribution of lysine and arginine residues in the closely related histones H1⁰ and H5. Analysis of a human H1⁰ gene. *J Mol Biol* 1986; **187**: 461–464.
- [27] DUSSEYRE Y, MERMOD N. Purified cofactors and histone H1 mediate transcriptional regulation by CTF/NF-1. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 5228–5237.
- [28] EICK S, NICOLAI M, MUMBERG D, DOENECKE D. Human H1 histones: conserved and varied sequence elements in two H1 subtype genes. *Eur J Cell Biol* 1989; **49**: 110–115.
- [29] FLICKINGER RA, BROOKS E, CHOI P, MORLOCK M, PARKER B, SNIDER J. Possible role of H1 histone in the differentiation of mouse erythroleukemia cells. *Cell Biol Int Rep* 1990; **14**: 457–462.
- [30] GANTT JS, LENVIK TR. *Arabidopsis thaliana* H1 histones. Analysis of two members of a small gene family. *Eur J Biochem* 1991; **202**: 1029–1039.
- [31] GARRARD WT. Histone H1 and the conformation of transcriptionally active chromatin. *BioEssays* 1991; **13**: 87–88.
- [32] GJERSETR, GORKA G, HASTHORPES S, LAWRENCEJ, EISEN H. Developmental and hormonal regulation of protein H1⁰ in rodents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 2333–2337.
- [33] GRIMES SR, WOLFE SA, ANDERSON JV, STEIN GS, STEIN JL. Structural and functional analysis of the rat testis-specific histone H1t gene. *J Cell Biochem* 1990; **44**: 1–17.
- [34] GRIMES SR, WOLFE SA, KOPPEL DA. Temporal correlation between the appearance of testis-specific DNA-binding proteins and the onset of transcription of the testis-specific histone H1t gene. *Exp Cell Res* 1992; **201**: 216–224.
- [35] HALL JM, COLE RD. Modulation in proportions of H1 histone subfractions by differential changes in synthesis and turnover during butyrate treatment of neuroblastoma cells. *Biochemistry* 1985; **24**: 7765–7771.
- [36] HANNON R, BATEMAN E, ALLAN J, HARBORNE N, GOULD H. Control of RNA polymerase binding to chromatin by variations in linker histone composition. *J Mol Biol* 1984; **180**: 131–149.
- [37] HELLIGER W, LINDNER H, GRÜBL-KNOSPO, PUSCHENDORF B. Alteration in proportions of histone H1 variants during the differentiation of murine erythroleukemia cells. *Biochem J* 1992; **288**: 747–751.
- [38] HNILICA LS. The specificity of histones in chicken erythrocytes. *Experientia* 1964; **20**: 13–17.
- [39] HUANG HC, COLE RD. The distribution of H1 histone is nonuniform and correlates with different degrees of condensation. *J Biol Chem* 1984; **259**: 1427–14242.
- [40] JERZMANOWSKI A. Rola histonu H1 w strukturze chromosomów. *Post Biochem* 1986; **32**: 97–128.
- [41] JERZMANOWSKI A, COLE RD. Flanking sequences of *Xenopus* 5S RNA determine differential inhibition of transcription by H1 histone *in vitro*. *J Biol Chem* 1990; **265**: 10726–10732.
- [42] JERZMANOWSKI A, COLE RD. Partial displacement of histone H1 from chromatin is required before it can be phosphorylated by mitotic H1 kinase *in vitro*. *J Biol Chem* 1992; **267**: 8514–8520.
- [43] JERZMANOWSKI A, MALASZEWSKI M. Phosphorylation and methylation of *Physarum* histone H1 during mitotic cycle. *Biochemistry* 1985; **24**: 2360–2363.
- [44] JIN Y, COLE RD. Histone H1⁰ is distributed unlike H1 in chromatin aggregation. *FEBS Letter* 1985; **182**: 455–458.
- [45] KAMAKAKA RT, THOMAS JO. Chromatin structure of transcriptionally competent and repressed genes. *EMBO J* 1990; **9**: 3997–4006.
- [46] KOSTER JG, DESTREE OHJ, RAAT NJH, WESTERHOFF HV. Histones in *Xenopus laevis*' early development: the race against time. *Biomed Biochim Acta* 1990; **49**: 855–877.
- [47] KUTLEDGE RG, NEELIN JM, SELIGY WL. Uncoupled synthesis of H1⁰-like histone H1⁵ during late erythropoiesis in *Xenopus laevis*. *Eur J Biochem* 1984; **144**: 191–198.
- [48] LA BELLA F, ZHONG R, HEINTZ N. Cell type specific expression of a human histone H1 gene. *J Biol Chem* 1988; **263**: 2115–2118.

- [49] LENNOX RW, COHEN LH. The alterations in H1 histone complement during mouse spermatogenesis and their significance for H1 subtype function. *Develop Biol* 1984; **103**: 80–84.
- [50] LEVIN B. Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners and substrates. *Cell* 1990; **61**: 743–752.
- [51] LIAO LW, COLE RD. Differences among H1 histone subfractions in binding to linear and superhelical DNA. Sedimentation velocity studies. *J Biol Chem* 1981; **256**: 11145–11150.
- [52] MAEDER DJ, BÖHM L. The C-domain in the H1 histone is structurally conserved. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1076**: 233–238.
- [53] MARION CH, ROCHE J, ROUX B, GORKA C. Differences in the condensation of chromatin by individual subfractions of histone H1: implications for the role of H1⁰ in the structural organization of chromatin. *Biochemistry* 1985; **24**: 6328–6335.
- [54] MATASUKAWA T, ADACHI H, OHBA Y. Phosphorylation of five histone H1 subtypes of L5178Y cells at the exponential growth and mitotic phases. *J Biochem* 1985; **98**: 695–704.
- [55] MEDVEDEW ZHA, MEDVEDEVA MN. Correlation between the increase of H1⁰ histone and the decrease of H1-2 histone in different tissues. *IRCS Medical Science* 1980; **8**: 848.
- [56] MENDELSON E, LANDSMAN D, DRUCKMANN S, BUSTIN M. Immunofractionation of chromatin regions associated with histone H1⁰. *Eur J Biochem* 1986; **160**: 253–260.
- [57] MILOSHEV G, ZLATANOVA J, SREBREVA L, TSANEV R. Presence of a H1⁰ type histone in an invertebrate - the bivalve mollusc *Anodonta cygnea*. *Comp Biochem Physiol* 1985; **82B**: 759–761.
- [58] MINSHULL J, GOLDSTEIN R, HILL CS, HUNT T. The A- and B- type cyclin associated cdc2 kinases in *Xenopus* turn on and off at different times in the cell cycle. *EMBO J* 1990; **9**: 2865–2875.
- [59] MITCHELL TC, SAUTIERE P, TURNER CH, BÖHM L. Structural properties of the methionine containing subfraction of rat liver histone H1. *Biochim Biophys Acta* 1985; **832**: 235–241.
- [60] MUELLER RD, YASUDA H, BRADBURY EM. Phosphorylation of histone H1 through the cell cycle of *Physarum polycephalum*. *J Biol Chem* 1985; **260**: 5081–5086.
- [61] MULTIGNER L, GAGNON J, VANDORSSELAER A, JOB D. Stabilization of sea urchin flagellar microtubules by histone H1. *Nature* 1992; **360**: 33–39.
- [62] NACHEVA GA, GUSCHIN DY, PREOBRAZHENSKAYA OV, KARPOV VL, EBRALIDSE KK, MIRZABEKOV AD. Change in the pattern of histone binding to DNA upon transcriptional activation. *Cell* 1989; **58**: 27–36.
- [63] NAITO K, TOYODA Y. Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. *J Reprod Fert* 1991; **93**: 467–473.
- [64] NEUBERGER A, van DEENEN LLM. Protein metabolism. Comprehensive Biochemistry. Academic Press, New York. 1982; **19B**, część II, 507–573.
- [65] NIEMELÄ O, MANNERMAA R-M, OIKARINEN J. Impairment of histone H1 DNA binding by adduct formation with acetaldehyde. *Life Sci* 1990; **47**: 2241–2249.
- [66] OHBA Y, HIGURASHI M, HAYASHI Y. Phosphorylation of H1 subtypes in regenerating rat liver. *J Biol Chem* 1984; **259**: 2942–2948.
- [67] OHE Y, HAYASHI H, IWAI K. Human spleen histone H1. Isolation and amino acid sequence of a main variant, H1b. *J Biochem* 1986; **100**: 359–368.
- [68] OIKARINEN J, MANNERMAA R-M, TARKKA T, YLI-MÄYRY N, MAJAMAA K. Interference of A1F₄- with nucleotide and DNA binding of rat histone H1 in vitro. Implication for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1991; **132**: 171–174.
- [69] OIKARINEN J. Histone H1 and the regulation of transcription by nuclear receptors. *FEBS Lett* 1991; **294**: 6–10.
- [70] PALYGA J. Variability of histone H1 in rabbit populations. *Int J Biochem* 1990; **22**: 1351–1361.
- [71] PALYGA J. Genetic polymorphism of erythrocyte histone H1 in Japanese quail. *Biochem Genet* 1991; **29**: 431–445.
- [72] PANZETER PL, REALINI CA, ALTHAUS FR. Noncovalent interactions of poly(adenosine diphosphate ribose) with histones. *Biochemistry* 1992; **31**: 1379–1385.
- [73] PAULSON JR, MESNER PW, DELROW JJ, MAHMOUD NN, CIESIELSKI WA. Rapid analysis of mitotic histone H1 phosphorylation by cationic disc electrophoresis at neutral pH in minigels. *Anal Biochem* 1992; **203**: 227–234.
- [74] PEHRSON JR, COLE RD. Histone H1 subfractions and H1⁰ turnover at different rates in nondividing cells. *Biochemistry* 1982; **21**: 456–460.
- [75] REALINI CA, ALTHAUS FR. Histone shutting by poli(ADP-ribosylation). *J Biol Chem* 1992; **267**: 18858–18865.

- [76] ROBERGE M, TH'NG J, HAMAGUCHI J, BRADBURY EM. The topoisomerase II inhibitor VM-26 induces marked changes in histone H1 kinase activity, histones H1 and H3 phosphorylation, and chromosome condensation in G2 phase and mitotic BHK cells. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1753–1762.
- [77] ROCHE J, MARION CH, GORKA C, ROUX B, LAWRENCE J. Electric birefringence of chromatin reconstituted with various histone H1 subfractions. *Biochem Biophys Res Comm* 1984; **121**: 530–537.
- [78] ROCHE J, GORKA C, GOELTZ P, LAWRENCE JJ. Association of histone H1⁰ with a gene repressed during liver development. *Nature* 1985; **314**: 197–198.
- [79] ROTH SY, ALLIS D. Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *TIBS* 1992; **17**: 93–98.
- [80] ROUSSEAU D, KHOCHBINS S, GORKA C, LAWRENCE J-J. Regulation of histone H1⁰ accumulation during induced differentiation of murine erythroleukemia cells. *J Mol Biol* 1991; **217**: 85–92.
- [81] SEYEDIN SM, KISTLER WS. Isolation and characterization of rat testis H1t. An H1 histone variant associated with spermatogenesis. *J Biol Chem* 1980; **255**: 5949–5954.
- [82] SEYEDIN SM, KISTLER WS. Histone H1 from mammalian testes. *Exp Cell Res* 1983; **143**: 451–454.
- [83] SHANNON MF, WIGLEY PL, WELLS JRE. Histone H5 and H1⁰ cross-reacting material is restricted to erythroid cells in chicken. *FEBS Letters* 1985; **186**: 180–186.
- [84] SHIRES A, CARPENTER MD, CHALKLEY R. New histones found in mature mammalian testes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 2714–2718.
- [85] SIZEMORE SR, COLE RD. Asynchronous appearance of newly synthesized histone H1 subfractions in HeLa chromatin. *J Cell Biol* 1981; **90**: 415–417.
- [86] SMITH BJ, JOHNS EW. Histone H1⁰: Its location in chromatin. *Nucl Acids Res* 1980; **8**: 6060–6079.
- [87] SMITH BJ, JOHNS EW. Isolation and characterization of subfractions of nuclear protein H1⁰. *FEBS Letters* 1980; **110**: 25–29.
- [88] STRICKLAND WN, STRICKLAND M, BRANDT WF, VON HOLT C, LEHMANN A, WITTMANN-LIEBOLD B. Primary structure of histone H1 from sperm of the Sea urchin *Parechinus angulosus*. *Eur J Biochem* 1980; **104**: 567–578.
- [89] SUBIRANA JA. Analysis of the charge distribution in the C-terminal region of histone H1 as related to its interaction with DNA. *Biopolymers* 1990; **29**: 1351–1357.
- [90] SYED S, RAJPUROHIT R, KIM S, PAIK WK. *In vivo* and *in vitro* methylation of lysine residues of *Euglena gracilis* histone H1. *J Prot Chem* 1992; **11**: 239–246.
- [91] TAN KB, BORUN TW, CHARPENTIER R, CRISTOFALO VJ, CROCE CM. Normal and neoplastic human cells have different histone H1 compositions. *J Biol Chem* 1982; **257**: 5337–5338.
- [92] TARKKA T, YLI-MÄYRY N, MANNERMAA R-M, MAJAMAA K, OIKARINEN J. Specific non-enzymatic glycation of the rat histone H1 nucleotide binding site *in vitro* in the presence of AlF₄⁻. A putative mechanisms for impaired chromatin function. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1180**: 294–298.
- [93] VALKONEM KH. Developmental changes in H1 histones from bovine liver. *Life Sci* 1980; **27**: 1217–1224.
- [94] WEISS G, TALASZ H, PUSCHENDORF B. Possible role of histone acetylation and histone H1⁰ replacement for the initiation of the replication in regenerating rat liver. *Biochem J* 1991; **280**: 777–781.
- [95] WIESIERSKA-GADEK J, SAUERMAN G. The effect of poly(ADP-ribose) on interactions of DNA with histones H1, H3 and H4. *Eur J Biochem* 1988; **173**: 675–679.
- [96] WINTER E, LEVY D, GORDON JS. Changes in the H1 histone complement during myogenesis I. Establishment by differential coupling of H1 species synthesis to DNA replication. *J Cell Biol* 1985; **101**: 167–174.
- [97] WOLFE SA, GRIMES SR. Protein-DNA interaction within the rat histone H4t promoter. *J Biol Chem* 1991; **266**: 6637–6643.
- [98] WUNSCH AM, LOUGH J. Histone variant pattern during vertebrate embryogenesis and limb development. *Cell Diff Develop* 1990; **30**: 19–25.
- [99] YASUDA H, MUELLER RD, LOGAN KA, BRADBURY M. Identification of histone H1⁰ in *Physarum polycephalum*. Its high level in the plasmodial stage increases in amount and phosphorylation in the sclerotial stage. *J Biol Chem* 1986; **261**: 2349–2354.
- [100] ZLATANOVA J. Histone H1 and the regulation of transcription of eukaryotic genes. *TIBS* 1990; **15**: 273–276.

Otrzymano: 20.10.1993 r.

Przyjęto: 23.11.1993 r.

Adresy autorów: E. Hrabec – 92-507 Łódź, ul. Gorkiego 1 m. 41. tel 73-06-33;

A. Plucienniczak – 98-200 Sieradz, ul. Sikorskiego 5 m. 32

CHROMOSOM B – PASOŻYT CZY FUNKCJONALNY SKŁADNIK GENOMU?

B CHROMOSOMES – ARE A PARASITE DNA OR HAVE AN ADAPTIVE FUNCTION?

Jolanta MAŁUSZYŃSKA

Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Śląski w Katowicach

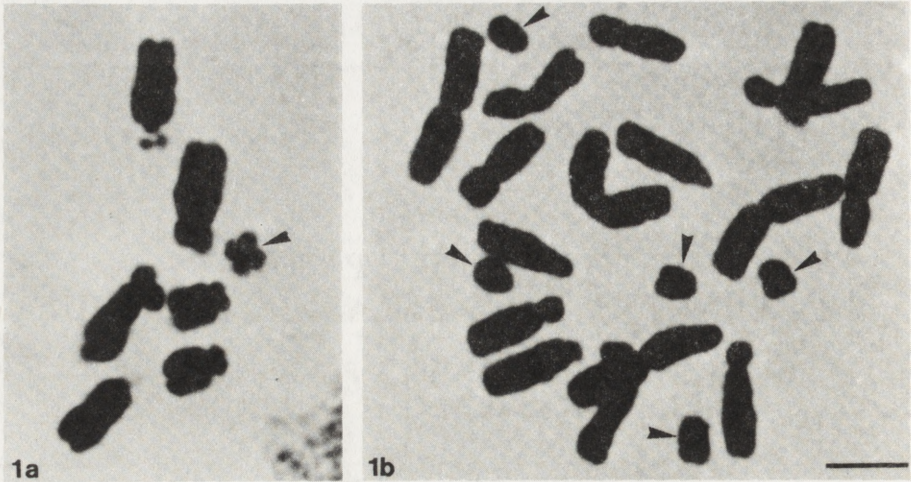
Streszczenie. Chromosomy B są dodatkowymi chromosomami, które występują w naturalnych populacjach wielu roślin i zwierząt. Nie są one niezbędne do życia organizmu, ale nie są też obojętne dla jego wzrostu i rozwoju, szczególnie gdy występują w dużej liczbie. Chromosomy B można odróżnić od chromosomów podstawowego zespołu, chromosomów A, na podstawie ich zachowania i cech morfologicznych. Są one zwykle mniejsze niż chromosomy A, w mejozie nie rekombinują ze standardowymi chromosomami i nie wykazują mendelowskiego dziedziczenia. Częstotliwość występowania chromosomów B w populacji jest wynikiem dwóch przeciwnych procesów, akumulacji i eliminacji w czasie wzrostu i rozwoju organizmu. Mimo że dość powszechnie występują, ich funkcja i pochodzenie są ciągle niewyjaśnione. Reprezentowane są dwa poglądy: jeden, że chromosomy B mają charakter pasożytniczy i drugi, że mają znaczenie przystosowawcze. W artykule przedstawione są wyniki badań przemawiające za każdym z tych poglądów.

Słowa kluczowe: chromosomy B, chromosomy dodatkowe, cytogenetyka

Abstract. B chromosomes are particular supernumerary chromosomes which are widely distributed in natural populations of many plants and animals. B chromosomes are unnecessary for the life of the organism but when present in high numbers they can be harmful for normal growth and development. It is difficult to formulate an exact definition which sharply distinguishes B chromosome from ordinary A chromosomes. B chromosomes are usually smaller than A and are never homologous with standard chromosomes. They display non-Mendelian inheritance. The maintenance of B chromosomes in the population is determined by the opposing forces of accumulation and elimination during growth and reproduction. Their origin, function and behavior are still an open problem. There have been discussions as to whether B chromosomes are a parasite, "selfish" DNA or if they have an adaptive function. The arguments for and against both this point of view are discussed.

Key words: B chromosomes, accessory chromosomes

Chromosomy B [58], zwane też chromosomami dodatkowymi lub nadliczbowymi, występują w naturalnych populacjach u wielu roślin i zwierząt należących do różnych grup systematycznych (rys. 1). Opublikowane zestawienie występowania chromosomów B obejmuje przeszło tysiąc gatunków roślin i więcej niż 260 gatunków zwierząt [32].



Rys. 1. Chromosomy B w komórkach merystematycznych roślin: a – *Crepis capillaris* $2n=6+1B$; b – *Ranunculus ficaria* $2n=16+5B$; strzałkami oznaczono chromosomy B, skala odpowiada $5\ \mu\text{m}$ [39]

Trudno jest podać krótką definicję chromosomów B. Można je odróżnić od chromosomów podstawowych (A) na podstawie ich zachowania i kilku charakterystycznych cech:

1. Mogą występować u niektórych tylko osobników danej populacji, a ich liczba może być zmienna nie tylko między osobnikami, ale również między tkankami i komórkami danego organizmu.

2. Podczas mejozy nie rekombinują z chromosomami A.

3. Nie wykazują mendlowskiego dziedziczenia, w czasie podziału komórkowego mogą być eliminowane lub akumulowane w drodze post- lub premejozycznej nondysjunkcji.

4. Są zwykle mniejsze od chromosomów standardowych (A), mają charakterystyczny, własny wzór rozmieszczenia heterochromatyny, czasami wykazują polimorfizm.

5. Jeżeli są obecne w małej liczbie, nie mają widocznego wpływu na fenotyp swoich nosicieli, a ich obecność może być stwierdzona tylko za pomocą analizy cytologicznej. Gdy są obecne w większej liczbie, mogą wpływać na cechy ilościowe, takie jak wigor czy płodność.

Występowanie, częstotliwość i zachowanie się chromosomów B jest uwarunkowane wieloma czynnikami. Ogólnie, częstotliwość ich występowania w populacji jest wypadkową dwóch procesów: eliminacji i akumulacji. Chromosomy B nie są niezbędne do życia danego organizmu, ale też nie są obojętne dla jego wzrostu i rozwoju. Efekt występowania chromosomów B może przejawiać się na różnym poziomie: populacyjnym, osobniczym, komórkowym i genowym.

Badania nad chromosomami B prowadzone są od przeszło sześćdziesięciu lat, a mimo to ich funkcja i pochodzenie są ciągle niewyjaśnione. Reprezentowane są dwa poglądy jeden, że chromosomy B mają znaczenie przystosowawcze i drugi, że mają charakter pasożytniczy. Istnieje wiele wyników badań przemawiających za każdym z nich. Ostatnio, badania z zastosowaniem metod biologii molekularnej i kultur *in vitro* przynoszą nowe dane o tych specjalnych chromosomach i powinny już wkrótce odpowiedzieć na postawione w tytule pytanie.

1. LICZBA CHROMOSOMÓW B

U niektórych gatunków, np. *Festuca pratensis* [9], *Secale cereale* [45] czy *Zea mays* [37], obecność chromosomów B stwierdzana była nieomal w każdej naturalnej populacji, u innych, np. *Lolium perenne* [12], bardzo rzadko. Populacje roślin uprawnych wykazują zwykle niską częstotliwość występowania chromosomów B, co wynika w dużej mierze z selekcji hodowlanej. U odmian uprawnych europejskiego żyta chromosomy B występują dużo rzadziej niż u dzikich i prymitywnych form azjatyckich.

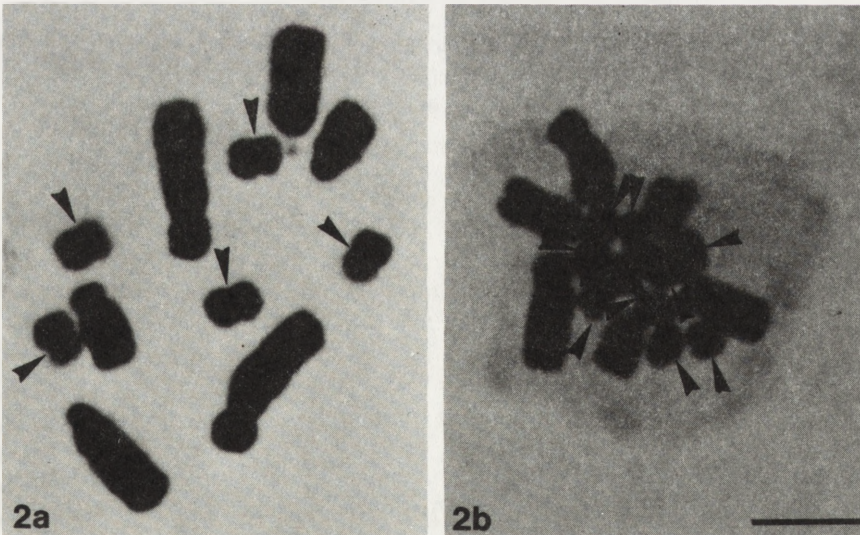
Liczba chromosomów B danego gatunku może być różna u różnych osobników populacji. Czasami przekracza ona liczbę chromosomów podstawowych, jak np. u *Haplopappus gracillis* czy *Zea mays* [32] (tab. 1).

Występowanie i liczba chromosomów B może nie tylko być różna w różnych tkankach, ale również może zmieniać się w czasie rozwoju danego osobnika. U niektórych gatunków liczba chromosomów B jest stała we wszystkich komórkach somatycznych. Są jednak gatunki (*Aegilops mutica*, *A. speltoides*, *Haplopappus gracilis*), u których chromosomy B występują tylko w części nadziemnej, a brak ich w korzeniach [32].

U *Crepis capillaris* liczba chromosomów B jest stała we wszystkich komórkach rośliny w okresie wzrostu wegetatywnego. Podwojenie liczby chromosomów B następuje w mitozie inicjującej zmianę fazy wegetatywnej w fazę generatywną (rys. 2). W wyniku non-dysjunkcji chromosomów B, w anafazie przechodzą one w podwojonej liczbie do komórki zapoczątkowującej linię generatywną. Stwierdzono, że komórki z podwojoną liczbą

TABELA 1. Liczba chromosomów B u wybranych gatunków roślin [32]

| Gatunek | 2n | B |
|-----------------------------|----|------|
| <i>Crepis capillaris</i> | 6 | 0-5 |
| <i>Haplopappus gracilis</i> | 4 | 0-6 |
| <i>Festuca pratensis</i> | 14 | 0-21 |
| <i>Secale cereale</i> | 14 | 0-8 |
| <i>Zea mays</i> | 20 | 0-34 |



Rys. 2. Pięć chromosomów B w komórce merystematycznej korzenia (a) i ich podwojona liczba w komórce linii generatywnej (b) u *Crepis capillaris*; strzałkami oznaczono chromosomy B, skala odpowiada 5 μm [39]

chromosomów B namnażają się szybciej niż komórki bez B [60]. Pre-mejotyczny wzrost liczby chromosomów B w linii generatywnej komórek jest dość powszechny u zwierząt. Przykładem może być akumulacja "B" w komórkach gonad *Helix pomatia* [17] czy spermato cytach *Locusta migratoria* [33].

U wielu roślin wyższych akumulacja chromosomów B występuje w gametoficie, a więc w okresie post-mejotycznym. U kukurydzy non-dysjunkcje stwierdzono w drugiej mitozie ziaren pyłku [6]. U żyta natomiast non-dysjunkcja występuje w pierwszej mitozie mikro- i megaspory, przy czym nierozdzielone w anafazie siostrzane chromatydy chromosomu B przechodzą do komórki generatywnej ziarna pyłku lub do komórki jajowej woreczka zalążkowego. Mamy więc tu do czynienia nie tylko z non-dysjunkcją chromosomów B, ale również z ich preferencyjnym przechodzeniem do komórek generatywnych [20, 23, 48]

2. MORFOLOGIA I STRUKTURA

Wielkość chromosomów B może być różna, ale u większości gatunków są one mniejsze od chromosomów A (rys. 1). U wielu gatunków występują dwa lub więcej typy morfologiczne chromosomów B, ale zwykle jeden jest dominujący w populacji. U żyta obok subteleromowego, standardowego typu chromosomu B, występuje pięć innych form, które powstały ze standardowego w drodze delekcji, nieprawidłowego podziału centromeru (*misdivision*) lub tworzenia izochromosomu. Opisane w rodzaju *Aster* występowanie 25 różnych morfologicznych form dodatkowych chromosomów jest skrajnym przykładem polimorfizmu chromosomów B [42].

Dokładniejsze omówienie struktury "B" można przedstawić na przykładzie chromosomów *Crepis capillaris* ($2n = 6 + B$), rośliny z rodziny *Compositae*. U gatunku tego opisano tylko jeden typ morfologiczny chromosomów B, które mogą występować w liczbie od 1 do 5 (rys. 2). Metafazowy chromosom B *C. capillaris*, najmniejszy w kariotypie, ma ok. 3 μm długości i zawiera 0,76 pg DNA, co wydaje się niewiele, jeżeli porównać z całkowitą zawartością jądrowego DNA ($4C \text{ DNA} = 8,69$) tego gatunku [39]. Wartość ta odpowiada jednak wielkości haploidalnego genomu *Lycopersicon esculentum* [18] i jest znacznie wyższa niż genom wielu innych roślin, jak np. *Arabidopsis thaliana* [7].

Chromosomy B *C. capillaris* są metacentryczne. Jest wiele danych wskazujących, że są to izochromosomy. Zawierają one stosunkowo duży blok centromerowej-przycentromerowej heterochromatyny, która zajmuje około jedną trzecią długości chromosomu (rys. 3c). Na ogół przyjmowano, że chromosomy B są heterochromatynowe. Nowe metody różnicowego barwienia wykazały jednak, że zawartość heterochromatyny może być różna u różnych gatunków albo w ogóle nie występuje, jak u *Allium flavum* [65] czy *Scilla vvedenskyi* [19]. Charakterystyczną cechą heterochromatyny jest jej replikacja w późnej fazie S. Autoradiograficzne badania syntezy DNA u takich gatunków, jak: *Zea mays*, *Crepis capillaris* i *Puschinia libanotica* [1, 2, 5] wykazały występowanie znakowania w chromosomach B pod koniec fazy S.

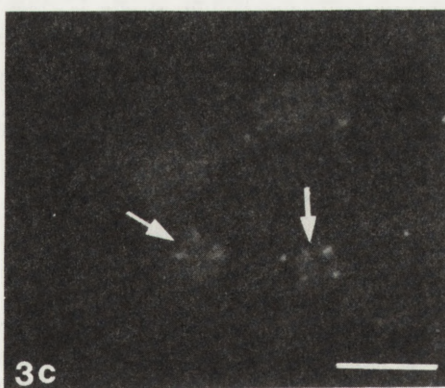
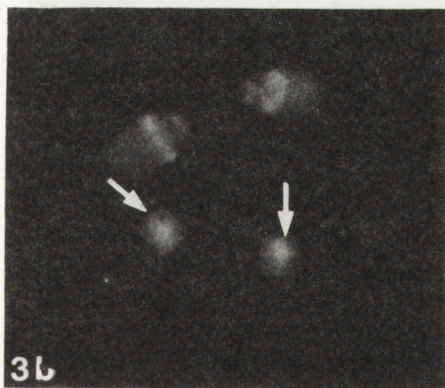
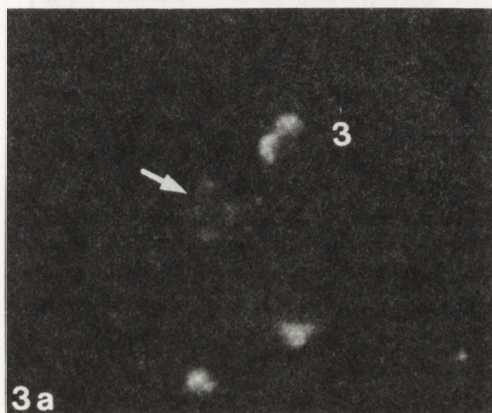
Niewiele jeszcze wiadomo o molekularnej naturze chromosomów B. Pierwsze prace dotyczyły porównania kinetyki reaturacji DNA, zawartości par zasad lub proporcji sekwencji powtarzalnych do niepowtarzalnych w DNA z roślin z różną liczbą chromosomów B [13, 35, 63]. Badania te nie wykazały istotnych różnic między DNA chromosomów A i B. W ostatnich

latach kilku autorom udało się wyizolować i scharakteryzować sekwencje DNA, specyficzne dla B chromosomów, u takich organizmów, jak: *Nasonia vitripennis* [8, 52], *Brachycome dichromosomatica* [28] i *Secale cereale* [61, 64].

Zastosowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* pozwoliło na wykrycie i zlokalizowanie genów rRNA w końcowych odcinkach obu ramion B chromosomów u *Crepis capillaris* (rys. 3a). Pozytywne barwienie azotanem srebra, które jest wskaźnikiem transkrypcyjnej aktywności rDNA, wykazało, że są to geny aktywne [40]. Używając telomerowych sekwencji DNA (TTTAGGG) do hybrydyzacji *in situ* z chromosomami *C. capillaris* wykazano również, że w chromosomach B wystąpiła specyficzna amplifikacja tych powtarzalnych sekwencji w obu telomerach (rys. 3b). Takie symetryczne ułożenie genów rybosomalnego RNA, jak również telomerowych sekwencji potwierdza wcześniejsze przypuszczenia o izochromosomowym charakterze B chromosomów tego gatunku [41].

Znajomość molekularnej struktury B chromosomów i jej porównanie ze strukturą chromosomów standardowych tego samego i pokrewnych gatunków może pomóc wyjaśnić pochodzenie dodatkowych chromosomów. Powinno również pomóc wyłumaczyć ich enigmatyczną funkcję w genomie.

Rys. 3. Lokalizacja sekwencji DNA w chromosomach B *Crepis capillaris* z zastosowaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*: a – jasne sygnały fluorescencji odpowiadające genom rRNA w końcowych odcinkach obu ramion chromosomu B i organizatorze jąderka chromosomu standardowego (3), b – jasne sygnały fluorescencji widoczne tylko w chromosomach B po hybrydyzacji *in situ* z telomerowym DNA wskazują na amplifikację tych sekwencji, c – te same chromosomy po barwieniu fluorescencyjnym DAPI (4'-6-diamidino-2-fenylindol), pozytywną fluorescencję wykazują prążki C; strzałkami oznaczono chromosomy B, skala odpowiada 5 μm [39, 40, 41]



3. WPŁYW CHROMOSOMÓW B NA FENOTYP

Obecność chromosomów B może mieć wpływ na wzrost i rozwój organizmu w różnych jego stadiach. U roślin można go obserwować od kiełkowania nasion do ich zawiązywania. Jest to na ogół wpływ na takie cechy ilościowe, jak: kiełkowanie, wzrost, wigor rośliny, liczba kwiatów, płodność, wielkość nasion. Zwykle obecność chromosomów B, szczególnie w większej liczbie, ma wpływ szkodliwy. I tak, u żyta, obecność czterech chromosomów B istotnie opóźnia kiełkowanie i obniża płodność, a rośliny z więcej niż sześcioma chromosomami B są całkowicie sterylne [44, 46]. U zwierząt obecność chromosomów B obniża wigor, na przykład u *Melanoplus femur-rubrum* [51] czy *Pseudococcus obscurus* [50], albo opóźnia rozwój zarodka i larwy *Myrmeleotettix maculatus* [22, 24]. Podobne "szkodliwe" efekty były obserwowane u wielu innych roślin i zwierząt. Stwierdzono jednak przypadki, w których obecność chromosomów B ma wpływ korzystny. U *Allium schoenoprasum* obecność chromosomów B stymuluje kiełkowanie nasion w warunkach stresowych [56].

Omawiając wpływ chromosomów B na cechy ilościowe należy zwrócić uwagę, że wpływ ten nie jest liniowo zależny od liczby chromosomów B, ale jest różny w zależności od tego czy występuje parzysta, czy nieparzysta liczba dodatkowych chromosomów. Müntzing [46] wykazał, że takie użytkowe cechy żyta, jak liczba kłosów i ciężar słomy, zmieniają się wraz z obecnością chromosomów B i osiągają największe wartości u roślin z parzystą liczbą dodatkowych chromosomów. Efekt parzystej/nieparzystej liczby chromosomów B, który przejawia się w wielu innych cechach omawianych w dalszej części artykułu, jest interesujący, ale trudny do wytłumaczenia.

Przenosząc chromosomy B z jednego gatunku do drugiego stwierdzono, że negatywny efekt na rośliny jest podobny jak u gatunku wyjściowego. Wyniki takie uzyskano przy przenoszeniu chromosomów B *Secale cereale* do blisko spokrewnionego gatunku *Secale vavilovii* lub odległego *Triticum aestivum* [47, 57]. Autorzy wnioskują, że efekt obecności chromosomów B w roślinie nie zależy od wielkości czy ploidalności jej podstawowego genomu, ale od bezwzględnej liczby chromosomów B.

Dotychczas opisano tylko trzy przypadki, w których obecność chromosomów B zmienia cechy jakościowe fenotypu rośliny. Paliwal i Hyde [55] obserwowali męską sterylność u roślin *Plantago coronopus* mających chromosom B. U *Haplopappus gracilis* obecność chromosomu B powoduje zmianę koloru kwiatu [25]. Rośliny *Zea mays* z pięcioma lub więcej chromosomami B wykazują białe paskowania na liściach [62].

4. WPŁYW CHROMOSOMÓW B NA JĄDRO KOMÓRKOWE

a. JĄDRO INTERFAZOWE

Omawiane dotychczas cechy, które mogą zmieniać się w zależności od występowania chromosomów B, dotyczą całego organizmu, jego egzofenotypu. Wpływ chromosomów B przejawia się również na poziomie komórki i jądra. Liczne badania na wielu organizmach wykazały istotny wpływ chromosomów B na różnorodne procesy w komórce, a głównie zachowanie się jądra i chromosomów zarówno w komórkach somatycznych, jak i generatywnych.

Obecność chromosomów B, które przecież czasami występują w liczbie przekraczającej liczbę ($2n$) chromosomów standardowych, powoduje istotny wzrost zawartości jądrowego DNA. Wzrost ten jest oczywiście proporcjonalny do liczby dodatkowych chromosomów [27, 49]. I tak na przykład obecność jednego chromosomu B *Crepis capillaris* zwiększa zawartość jądrowego DNA o 7%. Obecność pięciu chromosomów B w komórkach somatycznych odpowiada 25% jądrowego DNA [39].

Bardziej skomplikowany jest wpływ chromosomów B na zawartość innych składników jądra, takich jak RNA i białka. Szczegółowe badania u żyta i kukurydzy wykazały, że wraz ze wzrostem liczby chromosomów B wzrasta zawartość histonów, a obniża się zawartość całkowita białek jądrowych i RNA. Nie ma jednoznacznego wytłumaczenia takiego efektu, należy jednak pamiętać, że białka i RNA są nie tylko strukturalnym składnikiem chromosomów, ale przede wszystkim produktem ich genetycznej aktywności. Problem jest bardziej skomplikowany, gdyż i w tym przypadku obserwuje się zmienność zależną od parzystej i nieparzystej liczby chromosomów B. Parzysta liczba chromosomów B powoduje wzrost zawartości białek i RNA, a nieparzysta liczba "B" wzrost zawartości histonów [4, 34].

Wiadomo, że u roślin kwiatowych długość trwania cyklu komórkowego, przynajmniej częściowo, zależy od zawartości jądrowego DNA. Jak przedstawiono w tabeli 2, wzrost zawartości DNA w jądrze komórkowym wywołany obecnością chromosomów B wyraźnie wydłuża cykl komórkowy u kilku badanych gatunków roślin jednoliściennych [16].

TABELA 2. Wpływ chromosomów B na długość trwania faz cyklu komórkowego u wybranych gatunków roślin [16]

| Gatunek | B | DNA (pg) | Mitoza (h) | Faza S (h) |
|-----------------------|---|----------|------------|------------|
| <i>Lolium perenne</i> | 0 | 9,9 | 8,6 | 4,2 |
| | 3 | 12,0 | 10,0 | 5,5 |
| <i>Zea mays</i> | 0 | 11,0 | 10,5 | 4,2 |
| | 8 | 15,0 | 13,5 | 5,6 |
| <i>Secale cereale</i> | 0 | 18,9 | 11,7 | 6,0 |
| | 4 | 24,1 | 17,1 | 9,1 |

Chromosomy B, chociaż powszechnie uważane za "puste" genetycznie, gdyż na ogół nie niosą specyficznych, aktywnych genów, mogą mieć modyfikujące działanie na geny znajdujące się w innych chromosomach. Derepresorowy efekt chromosomów B na ekspresję genów esterazy zlokalizowanych w chromosomach A zaobserwowano u *Scilla autumnalis*. Metodami elektroforetycznymi i cytologicznymi stwierdzono związek między aktywnością tego enzymu a liczbą chromosomów B [53]. U konika polnego *Chorthippus binotatus* i *Eyprepocnemis plorans* opisano regulatorowy efekt chromosomów B na aktywność organizatora jąderka w autosomach [11].

b. MITOZA

Interesującym i ważnym z genetycznego punktu widzenia jest wpływ chromosomów B na zachowanie się chromosomów podstawowych zarówno w czasie mitozy, jak i mejozy. Najczęściej spotykanym w mitozie procesem związanym z obecnością chromosomów B jest nondysjunkcja w anafazie. Dotyczy ona wprawdzie chromosomów B, ale może mieć wpływ

na zachowanie się chromosomów A, które u wielu odmian kukurydzy mają specyficzne heterochromatynowe segmenty (*knob*). Stwierdzono, że u tych odmian równocześnie z nondysjunkcją chromosomów B, w drugiej mitozie ziarna pyłku występuje eliminacja odcinka ramienia chromosomu A nosącego *knob*. Dokładna analiza genetyczna pozwoliła na poznanie mechanizmu eliminacji chromatyny. Czynniki kontrolujące nondysjunkcję u kukurydzy zlokalizowany został w dystalnym odcinku euchromatynowym chromosomu B. Czynniki te opóźniają replikację DNA w centromerowej heterochromatynie uniemożliwia w anafazie rozdzielenie chromatyd i tym samym jedna komórka generatywna otrzymuje oba chromosomy B. W przedstawianym przypadku supresja replikacji rozciąga się na chromosomy podstawowe. W anafazie niezreplikowany segment heterochromatyny nie rozdziela się, w wyniku tego powstaje mostek chromatydowy, a następnie jego pęknięcie powodujące, że jedna z dwóch komórek generatywnych ma deficyt odcinka z *knob* [36, 59].

Inny przykład "samolubnego" zachowania się chromosomów B pochodzi z badań owada *Nasonia viripennis*. Obecność chromosomu B, zwanego też PSR (*paternal sex ratio*), powoduje superkondensację, a następnie eliminację ojcowskich chromosomów z zapłodnionego jaja, tym samym z jaja rozwija się haploidalny samiec zamiast diploidalnej samicy. Chromosom B natomiast pozostaje i jest przekazywany do następnego pokolenia samców [52].

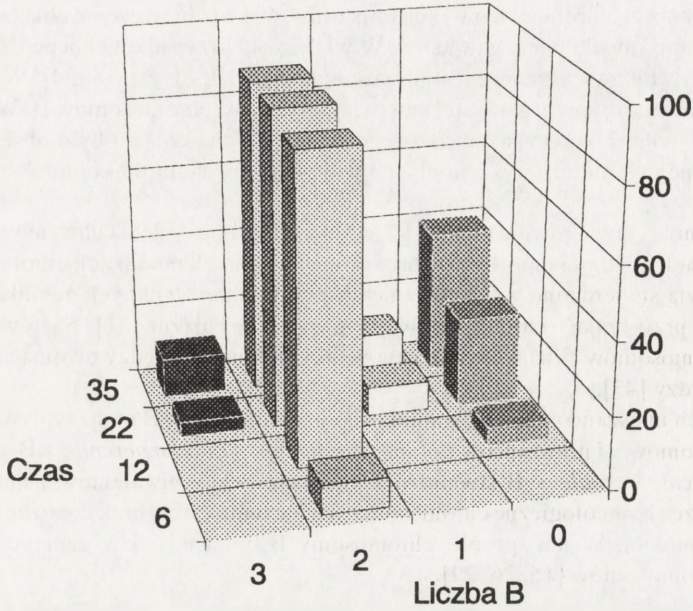
Interesujący i mogący mieć znaczenie praktyczne wydaje się być wpływ chromosomów B na chromosomy A w hodowli *in vitro*. Zarówno u *Secale cereale*, jak i *Crepis capillaris* stwierdzono większą zmienność w liczbie chromosomów w komórkach kalusa otrzymanego z roślin mających chromosomy B [3, 39].

Kilkuletnie obserwacje kalusa otrzymanego z roślin *Crepis capillaris* o różnej liczbie chromosomów B wykazały, że obecność dodatkowych chromosomów ma istotny, zależny od parzystej lub nieparzystej liczby "B" wpływ na wzrost i rozwój kalusa oraz strukturalne i ilościowe przemiany chromosomów. Poliploidyzacja komórek w kalusie pochodzącym z roślin z dwoma chromosomami B występuje znacznie wcześniej niż w kalusie kontrolnym, pochodzącym z roślin nie zawierających chromosomów B. Najwyższy jest również w tym kalusie stopień poliploidyzacji komórek. Natomiast w kalusie pochodzącym z roślin z trzema chromosomami B pierwsze poliploidalne komórki występują dopiero po blisko dwóch latach hodowli i poziom poliploidyzacji jest znacznie niższy niż w pozostałych liniach kalusa (rys. 4 i 5).

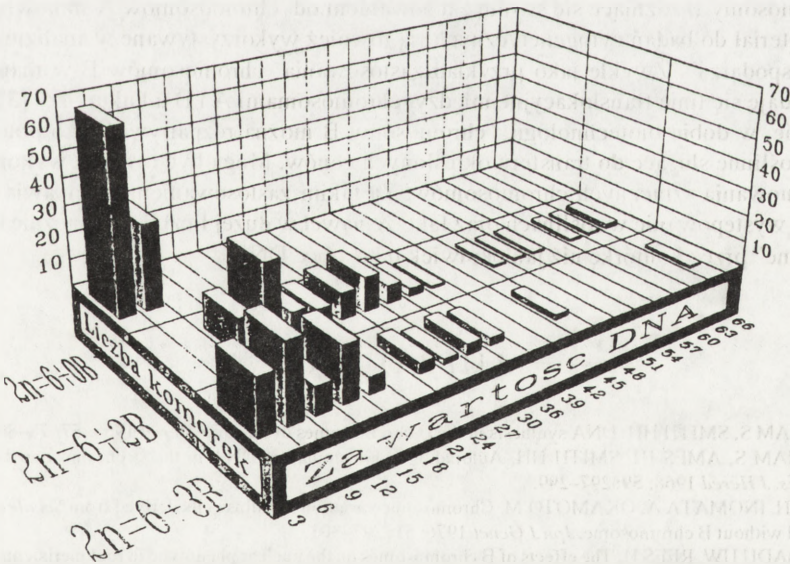
Na podkreślenie zasługuje również fakt, że chromosomy B nie będące niezbędnymi dla życia rośliny, są utrzymywane w komórkach hodowli *in vitro* i przekazywane są do zregenerowanych roślin lub organów w liczbie takiej samej, w jakiej występowały w pierwotnych eksplantatach [39].

c. MEJOZA

Darlington [14] jako pierwszy zauważył, że chromosomy B mogą nie tylko wpływać na zmienność genetyczną w populacji, ale również ją regulować. Potwierdzeniem tego były obserwacje, że zmienność wśród potomstwa roślin żyta z chromosomami B była większa niż w potomstwie roślin bez chromosomów B [44]. Późniejsze badania wykazały, że zwiększona zmienność wśród badanych roślin była wynikiem wzrostu częstotliwości *crossing over* w chromosomach A prowadzącym do zwiększenia rekombinacji w gametach produkowanych przez rośliny z chromosomami B.



Rys. 4. Wpływ parzystej i nieparzystej liczby chromosomów B na poliploidyzację komórek kallusa *Crepis capillaris*: obserwacje częstotliwości poliploidalnych metafaz w kallusie otrzymanym z roślin o różnej liczbie chromosomów B były prowadzone po 6, 12, 22, 35 miesiącach hodowli *in vitro* [39]



Rys. 5. Porównanie zawartości jądrowego DNA (wartości względne) w jądrach komórek kallusa *Crepis capillaris*, otrzymanego z roślin z chromosomami 0B, 2B i 3B; pomiary wykonano w kallusie po 24 miesiącach hodowli *in vitro* [39]

Wpływ obecności chromosomów B na częstotliwość i rozmieszczenie chiazm w chromosomach A był opisany dla wielu gatunków. W większości przypadków obecność chromosomów B prowadzi do zwiększenia częstotliwości chiazm [10, 21, 30, 38, 54]. W efekcie tym obserwuje się również wpływ parzystej i nieparzystej liczby chromosomów B. W komórkach macierzystych pyłku i woreczka zalążkowego *Listera* mniej chiazm było obserwowanych, gdy były obecne dwa lub cztery chromosomy B, w porównaniu do komórek z nieparzystą liczbą B [66].

Chromosomy B mogą również wpływać na zmianę rozmieszczenia chiazm w poszczególnych biwalentach między komórkami, a nawet w określonych odcinkach chromosomów. W biwalentach żyta stwierdzono występowanie chiazm w interstycjalnych odcinkach chromosomów, które przy braku chromosomów B nie tworzą chiazm [31]. Są również dane o wpływie chromosomów B na wewnątrzgenową rekombinację między dwoma allelami genu *waxy* u kukurydzy [43].

U niektórych mieszańców międzygatunkowych chromosomy B mogą wpływać na koniugację chromosomów. U mieszańców *Lolium temulentum* x *Lolium perenne* + B oraz *Triticum aestivum* x *Secale cereale* + B stwierdzono redukcję liczby biwalentów i multiwalentów tworzonych przez homeologiczne chromosomy, a więc tym samym brak *crossing over* między tymi chromosomami. W ten sposób chromosomy B biorą udział w genetycznej kontroli koniugacji chromosomów [15, 26, 29].

5. WYKORZYSTANIE CHROMOSOMÓW B W BADANIACH GENETYCZNYCH

Chromosomy B różniące się swoim zachowaniem od chromosomów A stanowią interesujący materiał do badań cytogenetycznych, są również wykorzystywane w analizie genetycznej "gospodarza". Zwykle jako przykład zastosowania chromosomów B w mapowaniu genów podaje się linie translokacyjne między chromosomami A i B u kukurydzy [32, 39].

Obecnie, w dobie biotechnologii, chromosomy B można rozpatrywać jako potencjalne wektory roślinne służące do transferu określonych genów. Mogą być również wykorzystane do konstruowania sztucznych chromosomów. Za takim zastosowaniem przemawia ich powszechne występowanie w roślinach oraz fakt, że nawet w dużej liczbie są znacznie bardziej "tolerowane" przez komórkę niż jakiegokolwiek inne, obce DNA.

LITERATURA

- [1] ABRAHAM S, SMITH HH. DNA synthesis in the B chromosomes of maize. *J Hered* 1966; 57: 78–80.
- [2] ABRAHAM S, AMES IH, SMITH HH. Autoradiographic studies of DNA in the B chromosomes of *Crepis capillaris*. *J Hered* 1968; 59: 297–299.
- [3] ASAMI H, INOMATA A, OKAMOTO M. Chromosome variation in callus cells derived from *Secale cereale* L. with and without B chromosome. *Jpn J Genet* 1976; 51: 297–303.
- [4] AYONOADU UW, REES H. The effects of B chromosomes on the nuclear phenotype in root meristems of maize. *Caryologia* 1964; 17: 395–383.
- [5] BARLOW PW, VOSA CG. The pattern of DNA replication in the chromosomes of *Puschkinia libanotica*. *Chromosoma* 1969; 28: 457–467.

- [6] BECKETT JB. An additional mechanism by which B chromosomes are maintained in maize. *J Hered* 1982; **73**: 29–34.
- [7] BENNETT MD, SMITH JB. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 1976; **274**: 227–274.
- [8] BEUKEBOOM LW, WERREN JH. Deletion analysis of the selfish B chromosome. Paternal Sex Ratio (PSR) in parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Genetics* 1993; **133**: 637–648.
- [9] BOSEMARK NO. Accessory chromosomes in *Festuca pratensis* Huds. *Hereditas* 1950; **36**: 366–368.
- [10] BROWN LM, JONES RN. B-chromosome effects at meiosis in *Crepis capillaris*. *Cytologia* 1976; **41**: 493–506.
- [11] CABRERO J, ALCHE JD, CAMACHO JPM. Effects of B chromosomes on the activity of nucleolar organizer regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*: activation of a latent nucleolar organizer region on B chromosome fused to an autosome. *Genome* 1987; **29**: 116–121.
- [12] CAMERON DR, REES H. The influence of B chromosomes on meiosis in *Lolium*. *Heredity* 1967; **22**: 446–450.
- [13] CHILTON MD, MCCARTHY BJ. DNA from maize with and without B chromosomes: a comparative study. *Genetics* 1973; **74**: 605–614.
- [14] DARLINGTON CD. Chromosome Botany. Allen and Unwin., London 1956.
- [15] EVANS GM. Genetic control of chromosome pairing in polyploids. [w] Kew Chromosome Conference III, Brandham PE (ed.), HMSO London 1988: 253–260.
- [16] EVANS GM, REES H, SNELL CL, SUN S. The relationship between nuclear DNA amount and the duration of the mitotic cycle. *Chromosomes Today* 1972; **3**: 24–31.
- [17] EVANS HJ. Supernumerary chromosomes in wild populations of the snail *Helix pomatia* L. *Heredity* 1960; **15**: 129–138.
- [18] GALBRAITH DW, HARKINS KR, MADDOX JM, AYRES NM, SHARMA DP et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissue. *Science* 1983; **220**: 1049–1051.
- [19] GREILHUBER J, SPETA F. C-banded karyotypes in the *Scilla hohenackeri* group *S. persica* and *Puschkinia* (*Liliaceae*). *Plant Syst Evol* 1976; **126**: 149–188.
- [20] HAKANSSON A. Behaviour of accessory rye chromosomes in the embryo-sac. *Hereditas* 1948; **34**: 35–59.
- [21] HANSON GP. B-chromosome-stimulated crossing over in maize. *Genetics* 1969; **63**: 601–609.
- [22] HARVEY AW, HEWITT GM. B-chromosomes slow development in a grasshopper. *Heredity* 1979; **42**: 397–401.
- [23] HASEGAWA N. A cytological study on 8-chromosome rye. *Cytologia* 1934; **6**: 68–77.
- [24] HEWITT GM, EAST TM. Effects of B chromosomes on development in grasshopper embryos. *Heredity* 1978; **41**: 347–356.
- [25] JACKSON RC, NEWMARK P. Effects of supernumerary chromosomes on production of pigment in *Haplopappus gracilis*. *Science* 1960; **132**: 1316–1317.
- [26] JENKINS G. Chromosome pairing in *Lolium* hybrids. [w] Kew Chromosome Conference III. Brandham PE [red.], HMSO, London 1988: 261–267.
- [27] JOHN PCL, JONES RN. Molecular heterogeneity of soluble proteins and histones in relationship to the presence of B chromosomes in rye. *Exp Cell Res* 1970; **63**: 271–276.
- [28] JOHN UP, LEACH CR, TIMMIS JN. A sequence specific to B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Genoma* 1991; **34**: 739–744.
- [29] JONES RN. Cytogenetics of B-chromosomes in crops. [w] Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution. Part A. Gupta PK, Tsuchiya T. [red.] Elsevier, Amsterdam 1991: 141–157.
- [30] JONES RN, REES H. Genotypic control of chromosome behaviour in rye. XI. The influence of B chromosomes on meiosis. *Heredity* 1967; **22**: 333–347.
- [31] JONES RN, REES H. The influence of B-chromosomes upon the nuclear phenotype in rye. *Heredity* 1968; **24**: 265–271.
- [32] JONES RN, REES H. B Chromosomes. Academic Press, London 1982.
- [33] KAYANO H. Accumulation of B chromosomes in the germ-line of *Locusta migratoria*. *Heredity* 1971; **27**: 119–123.
- [34] KIRK D, JONES RN. Nuclear genetic activity in B-chromosome rye in terms of the quantitative interrelationships between nuclear protein, nuclear RNA and histone. *Chromosoma* 1970; **31**: 241–254.
- [35] LIMA-DE-FARIA A, ESSEN-MOLLER J, MUNTZING A, GRANSTROM H, OLSSON E, ISAKSSON M. Comparison of DNA cleavage in rye with and without B chromosomes. *Hereditas* 1983; **99**: 203–208.
- [36] LIN BY. Regional control of nondisjunction of the B chromosome in maize. *Genetics* 1978; **90**: 613–627.
- [37] LONGLEY AE. Chromosomes of maize from North American Indians. *J Agr Res* 1938; **56**: 177–195.
- [38] MAGUIRE MP. Effective homologous pairing behaviour of A tetrasomic chromosome segment in an unusual B-A rearrangement constitution in maize. *Caryologia* 1985; **38**: 121–128.

- [39] MAŁUSZYŃSKA J. B chromosomes of *Crepis capillaris* (L.) Waller. in vivo and in vitro. *Prace Naukowe Uniwersytetu Śląskiego Katowice* 1990; nr 1147.
- [40] MAŁUSZYŃSKA J, SCHWEIZER D. Ribosomal RNA genes in B chromosomes of *Crepis capillaris* detected by non-radioactive in situ hybridization. *Heredity* 1989; **62**: 59–65.
- [41] MAŁUSZYŃSKA J, SCHWEIZER D. B chromosomes of *Crepis capillaris*: structure and behaviour. [w] 1st B-Chromosome Conference, Universidad Autonoma, Madrid 1993; 52.
- [42] MATSUDA T. On the accessory chromosomes of *Aster*. *J Sci Hiroshima Univ Ser B Div 2 (Bot)* 1970; **13**: 1–90.
- [43] MELNYCZENKO WI. The effect of B chromosomes on intragenic recombination. *Maize Genetics Newsletter* 1970; **44**: 203–205.
- [44] MOSS PJ. The adaptive significance of B-chromosomes in rye. *Chromosomes Today* 1966; **1**: 15–23.
- [45] MÜNTZING A. Accessory chromosomes in rye populations from Turkey and Afganistan. *Hereditas* 1950; **36**: 507–509.
- [46] MÜNTZING A. Effects of accessory chromosomes in diploid and tetraploid rye. *Hereditas* 1963; **49**: 371–426.
- [47] MÜNTZING A. Effects of accessory chromosomes of rye in the gene environment of hexaploid wheat. *Hereditas* 1973; **74**: 41–56.
- [48] MÜNTZING A, LIMA-DE-FARIA A. Pairing and transmission of a small accessory iso-chromosome in rye. *Chromosome* 1953; **6**: 142–148.
- [49] MURRAY BG. The structure, meiotic behaviour and effect of B chromosomes in *Briza humilis* Bieb. (*Gramineae*). *Genetica* 1984; **63**: 213–219.
- [50] NUR U. Harmful supernumerary chromosomes in a mealy bug population. *Genetics* 1966; **54**: 1225–1238.
- [51] NUR U. Maintenance of a "parasite" B chromosomes in the grasshopper *Melanoplus femur-rubrum*. *Genetics* 1977; **87**: 499–512.
- [52] NUR U, WERREN JH, EICKBUSH DG, BURKE WD, EICKBUSH TH. A "selfish" B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. *Science* 1988; **240**: 512–514.
- [53] OLIVER JL, POSSE F, MARTINEZ-ZAPATER JM, ENRIQUEZ AM, RUIZE REJON M. B-chromosomes and E-1 isozyme activity in mosaic bulbs of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). *Chromosoma* 1982; **85**: 399–403.
- [54] OTŁOWSKA-MIAZGA D. Wpływ chromosomów B na częstotliwość chiazm w bivalentach żyta diploidalnego – Transbaikal, Hodowla Roślin. *Aklimatyzacja i Nasiennictwo* 1974; **18**: 210–215.
- [55] PALIWAL RL, HYDE BB. The association of the single B-chromosome with male sterility in *Plantago coronopus*. *Am J Bot* 1959; **46**: 460–466.
- [56] PLOWMAN AB, HOLMES DC, BOUGOURD SM. Beneficial B-chromosomes in *Allium schoenoprasum*. [w] 1st B-Chromosome Conference, Universidad Autonoma, Madrid 1993; 70.
- [57] PUERTAS MJ, ROMERA F, DE LA PENA A. Comparison of B chromosome effects on *Secale cereale* and *Secale vavilovii*. *Heredity* 1985; **55**: 229–234.
- [58] RANDOLPH LF. Chromosome numbers in *Zea mays* L. *Cornell Univ Agr Exp St Mem* 1928; **117**: 1–44.
- [59] RHOADES MM, DEMPSEY E. Chromatin elimination induced by the B chromosome in maize. *J Hered* 1973; **64**: 13–18.
- [60] RUTISHAUSER A, ROTHLISBERGER E. Boosting mechanism of B-chromosomes in *Crepis capillaris*. *Chromosomes Today* 1966; **1**: 28–30.
- [61] SANDERY MJ, FORSTER JW, BLUNDEN R, JONES N. Identification of a family of repeated sequences on rye B chromosome. *Genome* 1990; **33**: 908–913.
- [62] STAUB RW. Leaf striping correlated with the presence of B chromosomes in maize. *J Hered* 1987; **78**: 71–74.
- [63] TIMMIS JN, INGLE J, SINCLAIR J, JONES RN. The genomic quality of rye B chromosomes. *J Exp Bot* 1975; **26**: 367–378.
- [64] TSUJIMOTO H, NIWA K. DNA structure of the B chromosome of rye revealed by in situ hybridization using repetitive sequences. *Jpn J Genet* 1992; **67**: 233–241.
- [65] VOSA CG. The enhanced and reduced quinacrine fluorescence bands and their relationship to Giemsa patterns in *Allium flavum*. [w] Nobel Symp. 23 (Med Nat Sci) Chromosome Identification, Caspersson T nad Zech L [red.] 1973: 156–158.
- [66] VOSA CG, BARLOW PV. Meiosis and B chromosomes in *Listera ovata* (Orchidaceae). *Caryologia* 1972; **25**: 1–8.

Otrzymano: 26.10.1993 r.

Przyjęto: 24.11.1993 r.

Adres autorki: 40/032 Katowice, ul. Jagiellońska 28

MATRIKS JĄDROWA – I. IZOLOWANIE, SKŁAD CHEMICZNY I ULTRASTRUKTURA

NUCLEAR MATRIX – I. ISOLATION, CHEMICAL COMPOSITION AND ULTRASTRUCTURE

Zofia KILIAŃSKA

Zakład Biochemii Medycznej Katedry Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie. Artykuł stanowi przegląd nowych doniesień na temat izolowania i subfrakcjonowania matriks jądrowej. Przedstawiono w nim efekty działania różnych czynników wpływających na skład chemiczny oraz ultrastrukturę tej ważnej składowej jądra komórkowego.

Abstract. This article presents new techniques of isolation and subfractionation of the nuclear matrix. It presents the data concerning the effects of different agents on chemical composition and ultrastructure of this important component of the cell nucleus.

Wykaz stosowanych skrótów. AS (ang. *ammonium sulfate*) – siarczan amonu, DTT – ditiotreitol, JA – jodoacetamid, LIS – 3,5-dijodosalicylan litu, NaTT – tetratationian sodu, PMSF – fluorek fenylometanosulfonowy.

1. WSTĘP

Jądra komórek eukariotycznych wykazują charakterystyczną dynamikę podczas cyklu życiowego. W czasie mitozy otoczka jądrowa wraz z jej szkieletem – blaszką ulegają dezintegracji i odpowiedniej kompartmentacji. Podczas mitotycznej profazy otoczka jądrowa rozpada się, a blaszka zbudowana z białek – lamin (u ssaków – laminy A, B, i C) podlega demontażowi, któremu towarzyszy powstawanie podjednostek w formie rozpuszczalnej [3, 26]. Laminy A i C występują w cytozolu komórek mitotycznych, podczas gdy lamina B pozostaje związana z pęcherzykami utworzonymi z interfazowych błon jądrowych [8, 26]. Depolimeryzacja lamin wydaje się być ściśle związana z ich hiperfosforylacją [50, 64, 65] oraz demetylacją [11]. Pod koniec mitozy, w telofazie wszystkie składniki otoczki jądrowej gromadzą się wokół nowo utworzonych chromatyd w każdej komórce potomnej. Podczas odbudowy otoczki w układzie modelowym komórek CHO stwierdzono, że jako pierwsze do chromosomów przyłączają się

laminy typu A [8]. Następnie wiążą się laminy typu B wraz z pęcherzykami błon jądrowych, co inicjuje fuzję tych ostatnich i utworzenie podwójnej błony jądrowej, czemu towarzyszy powstawanie kompleksów porów jądrowych [3, 7, 8, 28].

Odbudowie otoczki jądrowej towarzyszy defosforylacja wszystkich lamin [7] oraz metylacja laminy typu B [11]. Laminy typu B wydają się stanowić miejsca zakotwiczenia w jądrze dla białek cytoszkieletu [23–25]. Z kolei z laminami typu A mogą wiązać się polinukleosomy oraz DNA [60,73]. Po uformowaniu otoczki dochodzi do dekondensacji chromosomów, odtworzenia jąderka i osiągnięcia przez komórki potomne stadium jądra interfazowego [3].

W dynamicznym „przeorganizowaniu” jądra komórkowego uczestniczą m.in. jego struktury szkieletowe. O ich istnieniu sygnalizowano już w latach czterdziestych [por. 41]. Od dawna wiadomo, że jądra komórek eukariotycznych zachowują swój sferyczny kształt po wyczerpującej ekstrakcji zbuforowanymi roztworami NaCl o wysokiej sile jonowej (≥ 1 M). Późniejsze badania włączające trawienie jąder komórkowych nukleazami z następczą ekstrakcją za pomocą wysokich stężeń soli pozwoliły obserwować w mikroskopie elektronowym struktury zachowujące ich kształt oraz obecność tzw. resztkowych jąderek połączonych siecią rybonukleoproteinową z resztkową otoczką jądrową [por. 41].

Ten strukturalny zrąb jądra został określony po raz pierwszy terminem matriks bądź macierz jądrowa (ang. *nuclear matrix*) w 1974 roku przez Ronalda Berezneya i Donalda Coffeya z John Hopkins University w Baltimore [4]. Od tego czasu matriks wydzielono z makrojader orzęsków [31] oraz jąder różnych typów komórek organizmów roślinnych [9, 29, 48, 59] i zwierzęcych [6, 16, 67], z ludzkimi włącznie [2, 14, 22, 40]. Jej definicja ma wciąż charakter operacyjny i jest zachowana dla resztkowej, pozachromatynowej infrastruktury jądra interfazowego, niewrażliwej na traktowanie nukleazami, detergentami i wysokimi stężeniami soli. Matriks jądrową stanowią:

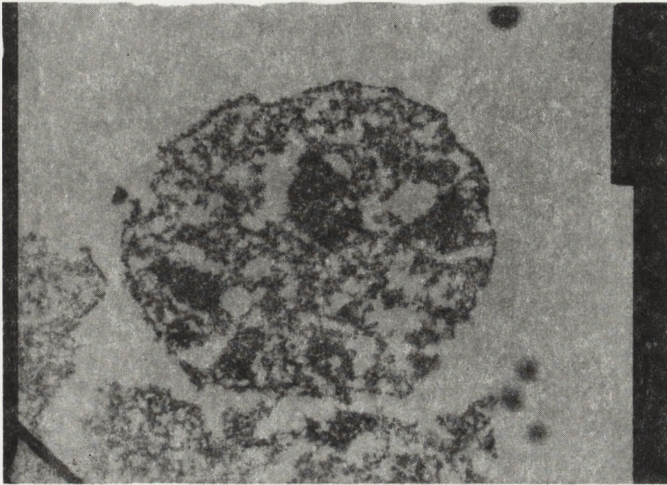
- resztkowa otoczka jądrowa (ang. *Residual Envelope*) określana również warstwą peryferyczną, zbudowana z blaszki i porów otoczki jądrowej,
- resztkowe jąderko(-a), zwane również matriks jąderkową,
- sieć włóknisto-ziarnista (ang. *internal matrix*) łącząca powyższe elementy strukturalne (rys. 1).

Tej strukturze jądrowej przypisuje się wiele funkcji, z których najistotniejszą wydaje się przestrzenne „uporządkowanie” DNA związane ze znacznym jego skróceniem, umożliwiające jednakże jego replikację i transkrypcję [6, 27, 32, 36, 53, 54, 70].

Nici DNA dzięki zakotwiczeniu w matriks jądra interfazowego formują pętle (domeny) o długości odpowiadającej replikonom [10]. W czasie mitozy funkcje organizacji przestrzennej DNA przejmują struktury rusztowania chromosomu (ang. *chromosomal scaffold*). Sugeruje się, że pewna część składników matriks zostaje przeorganizowana w te ostatnie [52, 56].

2. METODY IZOLOWANIA

W pracy przeglądowej, która ukazała się na łamach „Postępów Biologii Komórki” w 1989 roku, zostały omówione podstawowe sposoby izolowania matriks jądrowej [41]. Niniejsze opracowanie zmierza do ukazania nowszych aspektów metodycznych w „ła godnym” wydzieleniu tej struktury szkieletowej jądra. Ponadto zostaną przedstawione efekty działania różnych warunków i czynników modulujących m.in. białkowe grupy sulfhydrylowe (-SH) na skład



Rys. 1. Ultrastruktura matriks jądrowej komórek wątrobiaka Kirkmana-Robbins ujawniająca jej podstawowe elementy, tj.: RE (ang. *Residual Envelope*) – resztkową otoczkę jądrową zbudowaną z blaszki jądrowej wraz z kompleksem porów jądrowych, RN (ang. *Residual Nucleoli*) – resztkowe jąderka oraz IM (ang. *Internal Matrix*) – wewnętrzną sieć włóknisto-ziarnistą [Kiliańska i wsp., w przygotowaniu do druku]

chemiczny oraz strukturę matriks. Główne różnice w ogólnie przyjętych sposobach izolowania tej struktury sprowadzają się do:

- odmiennej kolejności ekstrakcji histonów, fosfolipidów i kwasów nukleinowych z jąder bądź całych komórek [4, 6, 30, 69],
- sposobu usuwania składników białkowych chromatyny [22, 44, 47, 72],
- rodzaju stosowanych enzymów nukleolitycznych [4, 47].

W klasycznej metodzie Berezneya i Coffeya [4] w pierwszym etapie usuwa się główną porcję DNA (~75%) poprzez ekstrakcję jąder komórkowych roztworem o niskiej sile jonowej (0,2 mM $MgCl_2$ – 10 mM $TrisCl$, pH 7,4), a następnie histony zbuforowanym 2 M roztworem $NaCl$ (tzw. wysokosolna ekstrakcja), lipidy – zbuforowanym 1% roztworem Tritonu X-100 oraz trawi się kwasy nukleinowe za pomocą DNazy I i RNazy A (w układzie zawierającym 5 mM $MgCl_2$).

W tym miejscu należy zwrócić uwagę na doniesienia [42, 58] wskazujące, że wysokosolna ekstrakcja jąder komórkowych stosowana przed ich trawieniem nukleazami może przyczynić się do precypitacji kompleksów transkrypcyjnych oraz artefaktów w postaci wzbogacenia aktywnych sekwencji DNA w preparatach matriks. Kirov i wsp. [42] obserwowali wzbogacenie sekwencji genu α -globiny w tej strukturze jądrowej, otrzymanej według procedury, w której po wysokosolnej ekstrakcji jąder trawiono je nukleazami wobec braku takiego efektu w preparatach wydzielonych z odwrotną kolejnością postępowania.

Stąd w późniejszych rozwiązaniach metodycznych wielu badaczy [53, 61, 69] stosuje w etapie początkowym trawienie jąder komórkowych nukleazami (egzo- bądź endogennymi), wyprzedzając usuwanie histonów.

W 1984 r. Mirkovitch i wsp. [47] wprowadzili do ekstrakcji histonów nowy detergent – 3,5 dijudosalicylan litu (LIS, 25 mM), zastępując nim wysokie stężenia chlorku sodu, DNA zaś trawili mieszaniną enzymów restrykcyjnych. Należy podkreślić, że stosowanie LIS jako czynnika usuwającego histony wymaga wstępnej stabilizacji jąder komórkowych przez ich inkubację w temp. 37°C (20 min) lub w obecności jonów dwuwartościowych, takich jak: Cu^{+2} , Ca^{+2} (0,5 mM, 4°C, 10 min). Otrzymane tą metodą struktury szkieletowe jąder przyjęto nazywać rusztowaniem jądrowym (ang. *nuclear scaffold*) w odróżnieniu od tych izolowanych z użyciem chlorku sodu czy AS, dla których został zarezerwowany termin matriks jądrowa [6,34].

Aktualnie stosowane metody wydzielenia tej struktury można podzielić na trzy grupy, wśród których podstawowe różnice sprowadzają się do sposobu usuwania histonów, tj. przez ekstrakcję zbuforowanymi roztworami:

- chlorku sodu (1,6–2,0 M),
- 3,5-dijudosalicylanu litu (5–25 mM),
- siarczanu amonu (0,2–0,25 M).

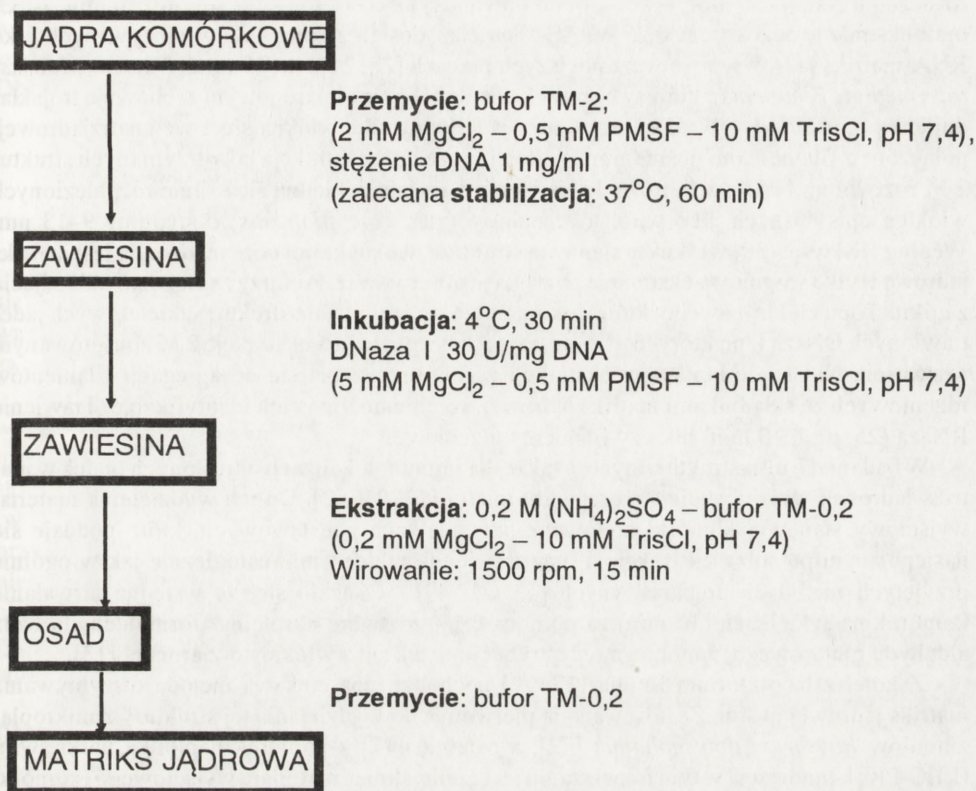
W latach osiemdziesiątych ukazały się doniesienia z laboratorium Kaufmana [38, 39] sygnalizujące obecność tzw. „pustych” preparatów matriks (ang. *empty nuclear matrices*) izolowanych z jąder komórek hepatocytów szczura, jeśli trawiono je nukleazami – DNazą I i RNazą A, a następnie poddawano ekstrakcji 1,6 M roztworem NaCl w obecności czynników redukujących, np. ditiotreitolu (DTT). Te właśnie badania, a także wyniki prac laboratorium Simarda [61] i Smitha [62] zwróciły uwagę na wyjątkowo niską stabilność sieci włóknisto-ziarnistej oraz reszkowych jąderek. Obecnie wiadomo, że głównymi czynnikami stabilizującymi te struktury są białka zawierające grupy SH oraz RNA związane z białkami szkieletowymi [2, 19, 30, 68].

Szereg modyfikacji włączających m.in. stosowanie:

- inhibitorów proteolitycznych, takich jak: fluorek fenylometanosulfonowy (PMSF) [2, 62], aprotynina [1, 62, 72], leupeptyna [62], benzamidyna [68], pepstatyna [1],
- eliminacji trawienia RNazą [2, 30, 61],
- inhibitorów RNazy (kompleksów rybozydów wanadylu) [20, 21, 62]
- oraz zamianę wysokosolnej ekstrakcji usuwającej białkowe składniki chromatyny roztworami AS o niskich stężeniach (0,2–0,25 M)

doprowadziło do opracowania „łagodnej” metody wydzielenia matriks jądrowej, lansowanej przez dwa ośrodki naukowe, kierowane przez Berezneya [2] i Penmana [20, 30, 49].

W postępowaniu zaproponowanym ostatnio przez grupę Berezneya [2] wykorzystuje się jako wstępny etap trawienie jąder komórkowych DNazą I, po którym usuwa się histony przez ekstrakcję zbuforowanym 0,2 M AS (rys. 2). Analiza otrzymanych w ten sposób preparatów matriks potwierdziła obecność podstawowych jej komponentów, tj. warstwy peryferycznej z dobrze zachowaną siecią włóknisto-ziarnistą oraz reszkowymi jąderkami. W toku badań matriks komórek HeLa (skład chemiczny, ultrastruktura) wydzielonych różnymi technikami z odmiennym sposobem ekstrakcji histonów, tj. za pomocą roztworów: 5–25 mM LIS, 2 M NaCl oraz 0,2 M AS, stwierdzono, że ta ostatnia stwarza najkorzystniejsze warunki wyizolowania struktur szkieletowych, przypominające te *in situ*. Belgrader i wsp. [2] poddali krytyce wydzielenie matriks jądrowej z użyciem wysokich stężeń NaCl oraz detergentu LIS. Należy



Rys. 2. Schemat izolowania matriks jądrowej według metody Belgradera i wsp. [2]

podkreślić, że metoda z LIS (25 mM) stała się ostatnio bardzo popularna. Podstawowy zarzut dotyczył zbyt wysokich stężeń detergentu, które i tak nie są w pełni efektywne w usuwaniu z jąder komórkowych histonów, a ponadto przyczyniają się do niszczenia ultrastruktury ich szkieletu. Cytowani badacze zalecają obniżenie stężenia detergentu do 5 mM oraz wprowadzenia celem stabilizacji wstępnej inkubacji jąder komórkowych w temperaturze 37°C przez 60 min. Te krytyczne opinie potwierdzili również ostatnio Eberharter i wsp. [17]. Uważają oni, że 25 mM roztwór LIS powoduje nietypową precypitację białek chromatyny (głównie histonów) i jednocześnie nie jest w stanie dobrze oddzielić chromatyny od matriks jądrowej.

Z kolei metoda wydzielenia struktur szkieletowych z laboratorium Penmana [30] eliminuje potrzebę izolowania jąder komórkowych i jako materiał wyjściowy wprowadza całe komórki (np. HeLa). Zawiesinę komórek po przemyciu zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) poddaje się ekstrakcji 0,5% roztworem Tritonu X-100 w układzie: 100 mM NaCl – 300 mM sacharoza – 3 mM MgCl₂ – 1 mM EGTA, 4 mM kompleks rybozydu wanadylu, 1,2 mM PMSF, 10 mM Pipes (pH 6,8) w celu usunięcia składników cytoszkieletu. Następnie chromatynę usuwa się przez trawienie pozbawionych cytoszkieletu komórek w powyższym buforze

(o stężeniu NaCl – 50 mM, tzw. bufor do trawienia) DNazą I (50–200 $\mu\text{g/ml}$, 30 min, 20°C) oraz ekstrakcję roztworem 0,25 M AS. Ten etap dostarcza preparatów opisywanych jako RNA-matriks jądrowa, a we wcześniejszych pracach [20, 21] NM-IF (ang. *Nuclear Matrix-Intermediate Filaments*), które w obrazach w mikroskopie elektronowym zachowują trójskładnikową morfologię – blaszkę, reszkowe jąderka i grube włókna sieci wewnątrzjądrowej, połączone z filamentami pośrednimi. W kolejnym etapie ekstrakcja tak otrzymanych struktur 2 M roztworem NaCl (w buforze do trawienia) ujawnia delikatną sieć silnie rozgałęzionych włókien opisywanych jako włókna rdzeniowe (ang. *core filaments*) o średnicy 9–13 nm. Według He i wsp. [30] włókna te stanowią strukturę, wokół której uorganizowana jest matriks jądrowa i tylko stopniowa ekstrakcja pozwala je obserwować. Autorzy zaprezentowali zdjęcia z mikroskopu elektronowego, które dokumentują, że izolowanie struktur szkieletowych jąder trawionych DNazą I, po których prowadzi się ich bezpośrednią ekstrakcję 2 M zbuforowanym roztworem NaCl (ale bez etapu ekstrakcji z AS) przyczynia się do agregacji filamentów rdzeniowych ze składnikami matriks jądrowej, co uniemożliwia ich identyfikację. Trawienie RNazą (25 $\mu\text{g/l}$, 10 min) niszczy filamenty rdzeniowe.

W badaniach ultrastrukturalnych, a także dla immunolokalizacji określonych białek w matriks jądrowej wykorzystuje się preparaty in situ [13, 21, 62]. Do ich wydzielenia materiał wyjściowy stanowią komórki hodowane na szkiełkach podstawowych, które poddaje się następującym po sobie ekstrakcjom oraz trawieniu nukleazami analogicznie jak w ogólnie przyjętych metodach preparatywnych [13, 21, 49]. Okazało się, że wstępne utrwalanie komórek na szkiełkach (10 min) za pomocą 0,1% roztworu akroleiny (formaldehydu bądź aldehydu glutarowego) zapobiega redystrybucji białek sieci włóknisto-ziarnistej [13].

Z kolei z laboratorium Loidla [17, 72] pochodzi inna ciekawa metoda otrzymywania matriks jądrowej in situ. Zastosowano ją pierwotnie do wydzielenia tej struktury z mikroplazmodiów *Physarum polycephalum* [72], a ostatnio [17] z komórek nabłonka nerki świni (LLC-PK₁). Innowacją w tym rozwiązaniu jest „zamykanie” materiału wyjściowego (komórki czy mikroplazmodia) w ziarnach agarozowych (ang. *encapsulation*). Następnie usuwa się z nich:

- składniki cytoszkieletu przez kolejne przemycia 1 i 2% zbuforowanym roztworem Tritonu X-100 (20 mM TrisCl, pH 7,3 – 20 mM KCl – 0,05 mM spermina – 0,125 mM spermidyna – 0,5 mM EDTA/KOH, pH 7,3 – 0,2 mM PMSF – 0,1% tioglikol – 0,5% aprotynina; bufor I),

- histony – za pomocą ogólnie przyjętych sposobów ekstrakcji, tj. roztworami 2 M NaCl czy 25 mM LIS lub 0,25 M AS

- oraz kwasy nukleinowe przez trawienie DNazą I i RNazą A, w powyższym układzie zawierającym dodatkowo 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ (bufor II).

Okazuje się, że powyższa metoda mimo zastosowania trzech odmiennych sposobów usuwania histonów dostarcza preparatów matriks podobnych pod względem ultrastruktury jak i składu polipeptydowego. Wydaje się więc, że pominięcie etapu izolacji jąder z komórek zamkniętych w ziarnach agarozowych, a także skuteczne odmycie zanieczyszczeń cytoplazmatycznych wpływa korzystnie na ostateczny obraz ich szkieletu. Wiadomo bowiem, że zanieczyszczenia jąder komórkowych, a także częściowa destrukcja w toku ich wydzielenia są istotnymi przyczynami zmian w morfologii ich struktur szkieletowych [17, 37, 63, 72].

Należy również wspomnieć o wydzieleniu innej struktury szkieletowej jądra określonej terminem nukleoid, głównie w laboratorium Cooka [12]. Odpowiada on matriks jądrowej zasocjowanej z natywnym, superhelikalnie zwiniętym DNA, opisywanej przez Berezhneya i

Buchholz [5] jako *DNA-rich nuclear matrices*. Otrzymywanie nukleoidu obejmuje traktowanie komórek zbuforowanymi roztworami detergentu oraz 2 M NaCl, z pominięciem ekstrakcji buforem o niskiej sile jonowej (0,2 mM MgCl₂) oraz trawienia enzymami degradującymi DNA.

3. SUBFRAKCYJONOWANIE MATRIKS JĄDROWEJ

Nowe kierunki badań nad matriks jądrową, które rozwinęły się w połowie lat osiemdziesiątych, szczególnie te zmierzające do poznania charakterystyki i funkcji jej białek, poszukiwania wśród nich specyficznych komponentów oraz znaczników nowotworzenia pociągnęły za sobą potrzebę rozfrakcjonowania tej struktury szkieletowej.

Pionierskie prace metodyczne grupy Kaufmanna [38, 39] oraz Stuurmana [67] umożliwiły wydzielenie dwóch podfrakcji, tj. peryferycznej oraz wewnętrznej (ang. *internal matrix*) matriks jądrowej. Zasada otrzymywania pierwszej podfrakcji jest oparta na stwierdzeniu, że stosowanie klasycznego sposobu wydzielania matriks jądrowej w warunkach redukcyjnych (w obecności DTT lub 2-merkaptoetanolu; 2-MeOH) dostarcza struktur szkieletowych jądra przedstawiających w mikroskopie elektronowym tzw. *empty ghost*, reprezentowanych głównie przez blaszkę oraz komponenty porów otoczki jądrowej. Z kolei druga podfrakcja obejmuje te składniki szkieletu jądrowego, które pozostają po wyodrębnieniu matriks peryferycznej w warunkach redukcyjnych i przedstawiają sobą sieć włóknisto-ziarnistą i resztkowe jąderka.

Aby otrzymać peryferyczną matriks, jądra komórkowe poddaje się trawieniu DNazą I i RNazą A w buforze STM (0,25 M sacharoza – 5 mM MgCl₂ – 50 mM TrisCl, pH 7,4 – 1 mM PMSF – aprotynina; 100 jedn./ml). Następnie pozostałość jądrową poddaje się ekstrakcji buforem o niskiej sile jonowej (LS; 0,2 mM MgCl₂ – 10 mM TrisCl, pH 7,4 – 1 mM PMSF) zawierającym reduktor – 10 mM 2-MeOH. W kolejnym etapie usuwa się histony buforem o wysokiej sile jonowej (HS; 2 M NaCl – 0,2 mM MgCl₂ – 10 mM TrisCl, pH 7,4) w obecności 10 mM 2 MeOH. Pozostałość jądrową ekstrahuje się ponadto buforami LS i HS oraz przemywa 1% roztworem detergentu Nonidet P-40. Osad, stanowiący peryferyczną matriks jądrową, przemywa się dodatkowo buforem LS [67].

Z kolei matriks wewnętrzną izoluje się z jąder komórkowych stabilizowanych przez ich jednogodziną inkubację w buforze STM z utleniaczem – 0,5 mM tetratianem sodu (NaTT). Po trawieniu jąder nukleazami (DNaza I i RNaza A) przeprowadza się ekstrakcję buforami LS i HS (ale bez 2-MeOH). Tak uzyskane struktury zawieszają się w buforze LS i poddaje się inkubacji (20 min) z równą objętością buforu LS zawierającego 40 mM ditiotreitol. Odwirowanie zawiesiny osadza składniki warstwy peryferycznej, w płynie nadosadowym zaś znajdują się komponenty matriks wewnętrznej, które poddaje się wyczerpującej dializie wobec 10 mM roztworu octanu amonu, pH 7,4 [67].

W procedurze zaproponowanej ostatnio przez Payrastrę i wsp. [51] wykorzystuje się w dużej mierze wspomniane etapy subfrakcjonowania matriks jądrowej [39, 67], zastępując wysokosolną ekstrakcję histonów zbuforowanym roztworem AS 0,25 M. Natomiast wydzielone subfrakcje matriks peryferycznej i wewnętrznej oczyszcza się dodatkowo przez ich odwirowanie w układzie: 2 M sacharoza – 43% glicerol – zbuforowanym roztworem PBS.

Mariks jąderkową można wydzielić bezpośrednio z oczyszczonych jąderek dwoma sposobami [66]. Jeden z nich wykorzystuje ekstrakcję białek jąderkowych zbuforowanymi roztworami 2 M NaCl bądź 25 mM LIS (5 mM EDTA – 0,2 mM EGTA – 15 mM 2- MeOH – 1 mM PMSF), po którym następuje trawienie nukleazami (DNaza II i RNaza; 200 µg/ml). W alternatywnym rozwiązaniu zawiesinę jąderek wpierv trawi się wspomnianymi nukleazami, a w drugiej kolejności ekstrahuje się białka roztworami o wysokim stężeniu NaCl (2 M) lub 25 mM LIS. W osadzie po przemyciu roztworem: 50 mM NaCl – 10 mM EDTA, 0,25% BSA – 50 mM TrisCl, pH 7,4) odnajduje się struktury szkieletowe jąderka o bardzo zbliżonej ultrastrukturze bez względu na sposób ekstrakcji białek. Jednakże kolejność usuwania białek i kwasów nukleinowych z jąderek wpływa na ultrastrukturę szkieletu jąderka. Trawienie kwasów nukleinowych przed ekstrakcją białek z jąderka powoduje częściową agregację pozostających struktur. Na podkreślenie zasługuje eliminacja z procedury wydzielenia matriks jąderkowej jonów dwuwartościowych, których obecność przyczynia się do nienaturalnej agregacji i kondensacji tych struktur [66, 71].

4. SKŁAD CHEMICZNY I ULTRASTRUKTURA MATRIKS JĄDROWEJ

Labilność sieci włóknisto-ziarnistej oraz resztkowych jąderek przyczynia się do różnic w składzie chemicznym oraz w ultrastrukturze matriks jąderkowej [2, 30, 55, 62]. Stało się to podstawą do wprowadzenia różnych sposobów stabilizacji jąder komórkowych, poprzedzających procedurę jej wydzielenia. Należą do nich m.in. inkubacja jąder w podwyższonej, lecz fizjologicznej temp. 35–37°C (15–60 min), inkubacja w obecności utleniacza grup -SH – tetrathonianu sodu, jonów dwuwartościowych (Cu^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2}), kompleksu Cu^{+2} -o-fenantrolina, utrwalanie w akroleinie [13, 15, 35, 43, 55, 57, 68]. Molekularne mechanizmy stabilizacji warunkujące izolowanie struktur szkieletowych podobnych do tych in situ, poza zjawiskiem tworzenia wiązań dwusiarczkowych, wewnątrzbiałkowych i międzybiałkowych są słabo poznane. Dodatek jonów dwuwartościowych zabezpiecza utrzymanie struktury DNA poprzez stabilizację białek matriks zakotwiczących go w postaci pętli [15, 57]. Zarówno stabilizacja termiczna, jak i działanie NaTT prowadzą do uzyskania preparatów matriks wzbogaconych około 2-krotnie w białka i kwasy nukleinowe [2, 19]. Wpływ NaTT jest znoszony przez działanie czynników alkilujących (np. jodoacetamid; JA, N-etylomaleimid; NEM). Związki te nie są czynnymi blokerami grup SH białek szkieletowych, jeśli jądra poddaje się preinkubacji termicznej [2]. Wydaje się, że inkubacja jąder komórkowych w 37°C, a także działanie NaTT stabilizują poza tą samą grupą białek matriks również ilościowo słabo reprezentowane składniki, których nie wykrywa się bez takiego traktowania. Evan i Hancock [18] wykryli produkt ekspresji onkogenu c-myc – białko p62 tylko w matriks pochodzącej z jąder komórkowych inkubowanych termicznie, wobec niemożliwości jego identyfikacji w strukturach stabilizowanych przez NaTT. Natomiast duży antygen T wirusa polyoma stwierdzono [33] w matriks komórek myszy 3T6 infekowanych tym wirusem, gdy jądra były inkubowane w podwyższonej temp. (37°C, 10 min) bądź w obecności NaTT (1 mM, 4°C, 20 min).

Ostatnio Martelli i wsp. [45] donieśli, że z matriks jąder komórek HeLa preinkubowanych w temp. 37°C przez 30 min związane jest ok. 30% aktywności polimerazy DNA typu α , podczas gdy po inkubacji jąder w temp. 0°C przez ten sam czas w ekstrakcie jąderkowym

wykrywa się mniej niż 5% aktywności tego enzymu. Na aktywność polimerazową w strukturach szkieletowych stabilizowanych powyższą temperaturą nie wpływają związki redukujące, chelatujące ani jony Ca^{+2} [45].

Wyjaśnienie zmniejszonej wrażliwości szkieletu jądrowego na działanie detergentów, nukleaz oraz czynników usuwających histony, jeśli jego otrzymanie poprzedza inkubacja jąder w podwyższonej, lecz fizjologicznej temperaturze, niektórzy badacze wiążą z dezorganizacją specyficznych kompartmentów jądrowych, zbliżona do odpowiedzi na szok termiczny *in vivo* [18] bądź utrwalaniem nietrwałych połączeń między składnikami struktur szkieletowych. Ten drugi wariant może wynikać z częściowej denaturacji białek szkieletowych, prowadzącej do ich strącania *in situ*, utrwalając interakcje pomiędzy najbliższymi sąsiadującymi polipeptydami jądrowymi w sposób analogiczny do tworzenia wiązań dwusiarczkowych [33].

Wnikliwe badania matriks komórek erytroleukemicznych myszy izolowanych z jąder stabilizowanych *in vitro* w temperaturze 37°C oraz z komórek poddanych szokowi termicznemu *in vivo* (43°C , 15 min) sugerują, że natura stabilizacji *in vitro* jest odmienna od tej wywołanej stresem. Obydwa sposoby stabilizacji przyczyniają się do wzrostu zawartości białek w szkielecie jądrowym (tab. 1), lecz morfologia wydzielonych struktur znacznie różni się [46]. Badając kinetykę „zatrzymywania” białek w szkielecie jąder komórek stabilizowanych w temp. 37°C stwierdzono, że wystarczy 2-minutowa inkubacja dla podwojenia ich zawartości. Ilość białek jądrowych niewrażliwych na działanie nukleaz i wysokich stężeń soli osiąga plateau już po 20 min i utrzymuje się do 60 min, na w miarę stałym poziomie. Stąd czas stabilizacji termicznej jąder różnych typów komórek poprzedzający procedurę izolowania matriks jądrowej to najczęściej 20, 30 czy 60 minut [2, 33, 46]. Wprowadzenie RNazy A jako dodatkowego enzymu nukleolitycznego (obok DNazy I) podczas izolowania matriks tylko nieznacznie wpływa na ostateczną ilość białek w szkielecie jąder inkubowanych w temp. 0°C czy 37°C . Odzysk białek w strukturach szkieletowych jąder inkubowanych w podwyższonej temperaturze jest nieco wyższy niż w jądrach wydzielonych z komórek poddanych szokowi cieplnemu (por. tab. 1). Ponadto okazało się, że struktury szkieletowe komórek stresowanych *in vivo* w temp. 43°C , po dodatkowej stabilizacji ich jąder *in vitro*, stają się bardziej odporne

TABELA 1. Odzysk białek w preparatach matriks wydzielonych z jąder lub komórek erytroleukemicznych myszy inkubowanych w różnych warunkach [46]

| Warunki inkubacji | Odzysk białek [%] |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Inkubacja jąder komórkowych w temp. | |
| 0°C | 6,0± 2,0 |
| 0°C + RNaza A | 5,5± 1,6 |
| 37°C | 18,6± 2,7 |
| 37°C + RNaza A | 17,6± 2,3 |
| Szok termiczny komórek | |
| 43°C (15 min) | 15,9±3,0 |
| 43°C (15 min) + inkubacja jąder komórkowych w temp. 37°C | 21,0±2,8 |
| 43°C (30 min) | 21,5±3,5 |
| 43°C (30 min) + inkubacja jąder komórkowych w temp. 37°C | 24,0±2,9 |

Inkubację jąder wyizolowanych z komórek kontrolnych i poddanych szokowi cieplnemu (43°C ; 15 lub 30 min) prowadzono w temp. 0°C lub 37°C przez 45 min, po czym izolowano matriks metodą obejmującą tawienie DNazą I (w niektórych eksperymentach również RNazą A) oraz ekstrakcję za pomocą zbuforowanego 2 M roztworu NaCl (pH 7,4).

na działanie nukleaz i wysokosolną ekstrakcję. Uzupełniająca te doświadczenia analiza elektroforetyczna białek matriks z jąder inkubowanych w różnych temp., tj. 0, 37 i 43°C ujawniła tylko nieznaczne różnice w zawartości komponentów o m. cz. 29, 45 i 66 kDa. Na podstawie oceny liczby struktur szkieletowych w osadach otrzymanych z jąder komórkowych inkubowanych w temp. 0°C i 37°C (45 min) można wnioskować, że stabilizacja termiczna wpływa na zwiększony ich odzysk. Badania matriks komórek erytroleukemicznych na poziomie ultrastruktury wykazały, że jej preparaty wyodrębnione z jąder inkubowanych w temp. 0°C zawierają warstwę peryferyczną otaczającą ubogą sieć włóknisto-ziarnistą oraz delikatne ziarnistości przylegające do jej obwodu. Natomiast matriks z jąder komórkowych stabilizowanych w temp. 37°C cechuje obecność elektronowogęstych, reszkowych jąder, bogatej sieci włóknisto-ziarnistej rozpościerającej się we wnętrzu tej struktury otoczonej warstwą peryferyczną. W preparatach izolowanych z komórek stresowanych *in vivo* (43°C) reszkowe jąderka były słabo widoczne. Dodatkowa inkubacja *in vitro* jąder z komórek poddanych szokowi cieplnemu była czynnikiem ułatwiającym obserwacje w strukturach szkieletowych reszkowych jąder. W świetle tych danych [19, 46] wydaje się, że stabilizacji termicznej podlegają przede wszystkim reszkowe jąderka oraz sieć włóknisto-ziarnista. Włączenie do badań w mikroskopie elektronowym czułych sposobów identyfikacji kwasów nukleinowych, tj. technikę OA (ang. *osmium-amine*) oraz barwienia za pomocą koloidalnego kompleksu złota z DNazą I dostarczyło rezultatów pozwalających sądzić, że podwyższona temperatura stabilizuje w znacznym stopniu RNA związany ze strukturami szkieletowymi jądra komórkowego [19].

W preparatach matriks jądrowej komórek HeLa wydzielonych „ładogną” techniką, w której histony usuwa się 0,2 M zbuforowanym siarczanem amonu, szkielet jądrowy zachowuje kształt pomimo usunięcia z jąder ok. 78% białka, 73% RNA i 98% DNA [2]. Belgrader i wsp. [2] stwierdzili, że inkubacja jąder komórkowych w temp. 37°C przez 60 min, wyprzedzająca procedurę izolowania matriks w obecności lub braku utleniacza grup sulfhydrylowych – NaTT, a także wprowadzenie w toku preparatyki czynników redukujących mostki dwusiarczkowe, w sposób istotny wpływa na skład chemiczny (tab. 2) i ultrastrukturę wydzielonych

TABELA 2. Wpływ czynników modulujących grupy SH oraz stabilizacji termicznej na skład chemiczny preparatów matriks jądrowej komórek HeLa [2]

| Sposób traktowania jąder komórkowych | Temperatura inkubacji [°C] | % odzysku | | |
|--------------------------------------|----------------------------|--------------|--------------|-------------|
| | | Białko | RNA | DNA |
| Kontrola | 4 | 22,3± 1,8(4) | 27,5± 0,5(3) | 2,0± 0,3(3) |
| | 37 | 43,4± 3,2(7) | 35,6± 0,9(2) | 9,9± 0,3(2) |
| IA/NEM | 4 | 20,6± 1,5(7) | 29,5± 0,8(2) | 2,2± 0,4(2) |
| | 37 | 46,6± 2,3(7) | – | – |
| DTT | 4 | 12,7± 1,1(2) | 23,0(1) | 2,6 (1) |
| | 37 | 30,3± 0,4(2) | – | – |
| NaTT | 4 | 35,9± 2,9(5) | 40,3± 1,8(2) | 8,1± 1,8(2) |
| | 37 | 49,9± 5,6(5) | 38,5± 1,3(2) | 9,9± 0,7(2) |
| IA/NEM | 4 | 20,8± 2,0(5) | – | – |
| | NaTT | 37 | 41,0± 3,9(5) | – |

Preparatykę matriks przeprowadzono metodą wykorzystującą trawienie jąder komórkowych DNazą I z następczą ekstrakcją zbuforowanym 0,2 M roztworem AS. W części eksperymentów dodawano albo 1 mM JA i 5 mM NEM, albo 20 mM DTT we wszystkich buforach od etapu rozbijania komórek. Wyizolowane jądra (przed frakcjonowaniem) inkubowano w temp. 4°C lub 37°C przez 60 min w obecności lub braku utleniacza – 2 mM NaTT.

struktur szkieletowych jądra. Stabilizacja termiczna jąder komórkowych (37°C, 60 min) przyczynia się do wzbogacenia szkieletu jądrowego w białka, RNA i DNA odpowiednio – 1,9; 1,3 i 5 razy. Z kolei wstępna inkubacja jąder w obecności NaTT, nawet w temp. 4°C dostarcza struktur szkieletowych zawierających odpowiednio ok. 1,6; 1,6 i 4 razy więcej białka, RNA i DNA aniżeli w wyodrębnionych w warunkach kontrolnych, przy znacznie podwyższonych wartościach dla preparatów inkubowanych w temp. 37°C (por. tab. 2). Natomiast w izolatach matriks otrzymanych w środowisku redukcyjnym (20 mM DTT), ilość białka była znacznie niższa w przypadku startu z jąder inkubowanych w temp. 4°C i 37°C i wynosiła odpowiednio 1,7 i 1,4 razy mniej w porównaniu z warunkami kontrolnymi, wobec nieznacznych różnic w zawartości kwasów nukleinowych. Obecność blokerów grup -SH, tj. jodoacetamidu (5 mM) i N-etylomaleimidu (5 mM) podczas izolowania matriks z jąder inkubowanych w temp. 4°C i 37°C nie wpływa na jej skład chemiczny ani na ultrastrukturę. Na uwagę zasługują wyniki wskazujące, że działanie powyższych czynników alkilujących efektywnie hamuje stabilizację matriks przez utlenianie jej grup tiolowych przez NaTT, nie okazuje zaś większego wpływu na ich stabilizację wywołaną temp. 37°C. Takie obserwacje sugerują inny(e) mechanizm(y) stabilizacji struktur szkieletowych jądra przez podwyższoną temperaturę niż tylko utlenianie grup -SH. Preparaty matriks wydzielone z jąder komórkowych inkubowanych wobec NaTT w temp. 4°C przez 60 min oraz stabilizowanych przez taki czas, ale w temp. 37°C (bez NaTT) wykazywały podobne obrazy w mikroskopie elektronowym. Cechowała je obecność trzech substruktur, tj. warstwy peryferycznej, resztkowych jąderek oraz gęstych włókien sieci włóknisto-ziarnistej (aczkolwiek włókna tej ostatniej podstruktury stabilizowane w 37°C wybarwiały się intensywniej). Działanie środowiska redukującego – 20 mM DTT, powoduje „rozluźnienie” resztkowych jąderek i częściowy zanik sieci włóknisto-ziarnistej przy zachowaniu warstwy peryferycznej. Obecność DTT zapobiega tworzeniu mostków dwusiarczkowych między białkami szkieletowymi czy w obrębie tych białek i działa destabilizująco na ultrastrukturę matriks jądrowej. Efekt destabilizujący wykazują również RNaza A oraz wysokie stężenie chlorku sodu. Izolowanie tej struktury z jąder komórkowych trawionych DNazą I oraz RNazą A, po której następuje ich ekstrakcja 0,2 M roztworem AS prowadzi do uzyskania szkieletu jądrowego, który zachowuje warstwę peryferyczną, resztkowe jąderka i w niewielkim stopniu zmienioną sieć łączącą te elementy. Natomiast z jąder komórkowych inkubowanych uprzednio w środowisku zawierającym DTT otrzymuje się matriks o znacznie zubożonej sieci włóknisto-ziarnistej [2].

Belgrader i wsp. [2] potwierdzili wcześniejsze obserwacje grupy Kaufmanna [38, 39], że struktury szkieletowe jąder inkubowanych w środowisku redukującym, trawione następnie nukleazami (RNaza A i DNaza I) i pozbawione histonów przez ekstrakcję 2 M roztworem NaCl ulegają znacznej destabilizacji, związanej z zupełnym zanikiem resztkowych jąderek oraz sieci włóknisto-ziarnistej. Wyniki te oraz oznaczenia zawartości kwasów nukleinowych w izolatach matriks, wydzielonej z jąder komórek HeLa trawionych obok DNazy I również RNazą A (tab. 3), wskazują na istotny udział RNA oraz białkowych mostków S-S dla zachowania integralności szkieletu jądrowego. Ponadto wydaje się, że czynnik redukcyjny – ditiotreitól, w większym stopniu niż trawienie RNazą A, działa destabilizująco na utrzymanie ciągłości strukturalnej matriks jądrowej, szczególnie gdy otrzymuje się ją techniką wykorzystującą wysokosolną ekstrakcję do usuwania histonów.

W serii prac z laboratorium Penmana [20, 21, 30] przedstawiono wyniki świadczące o istotnej roli RNA w organizacji włókien struktur szkieletowych jądra. Opracowana w tym zespole metoda (por. rozdz. 2) dostarcza struktur szkieletowych opisywanych jako filamenty

TABELA 3. Wpływ RNazy A na zawartość kwasów nukleinowych w preparatach matryks jądrowej komórek He-La [2]

| | % odzysku | |
|-------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| | RNA | DNA |
| 0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ | | |
| - RNaza A | 27,5±0,5(3) | 2,0± 0,3(3) |
| + RNaza A | 12,9±1,6(5) | 1,4± 0,3(4) |
| 2,0 M NaCl | | |
| - RNaza A | 24,1±5,9(3) | 1,3± 0,2(3) |
| + RNaza A | 4,2±0,4(2) | 0,7± 0,1(2) |
| 300 µg/ml RNazy | | |

Preparaty matryks jądrowej wydzielano wykorzystując do ekstrakcji histonów 0,2 M roztwór AS albo 2 M roztwór NaCl. Na etapie trawienia DNazą I w części badań włączano dodatkowo RNazę A (300 µg/ml).

rdzeniowe [30]. W toku ich wydzielania połączonego z wnikliwą analizą chemiczną okazało się, że pozbawienie jąder komórek HeLa głównej masy chromatyny przez trawienie DNazą I i ekstrakcję 0,25 M zbuforowanym AS usuwa ponad 87% białka i 99% DNA, traktowanie zaś pozostałości jądrowej 2 M zbuforowanym NaCl – dalsze ok. 4% białka (w tym ok. 3,3% wrażliwych na RNazę A; tab. 4).

Badania nad syntezą i dystrybucją RNA obejmujące włączanie [³H]-urydyny przez komórki HeLa (2 godz.), a po usunięciu białek cytoszkieletu frakcjonowanie jąder oraz pomiar radioaktywności w poszczególnych frakcjach wykazały, że z filamentami rdzeniowymi wiąże się aż ok. 67% jądrowego RNA (tab. 5). Analiza elektroforetyczna w żelach agarozowych produktów syntezy RNA frakcji jądrowych otrzymanych z komórek rosnących w obecności niskich stężeń aktynomycyny D (0,04 µg/ml; hamowanie biosyntezy rRNA), bądź bez tego inhibitora oraz pomiar w nich radioaktywności pozwoliły stwierdzić w filamentach rdzeniowych zarówno prekursorowe formy rRNA, jak i hnRNA. Okazało się, że z tą frakcją związane są: 45S rRNA, intermediaty procesu składania 41S, 36S i 32S oraz niewielkie ilości 28S rRNA (być może resztkowych jąderek) oraz aż ok. 70% hnRNA o wysokiej masie cząsteczkowej (ok. 20 kpz). Te wielostronne badania potwierdziły sygnałne doniesienia innych autorów, którzy podkreślali fakt destabilizacji struktur szkieletu jądrowego, jeśli do ich wydzielenia stosowano trawienie jąder RNazą [39, 49, 61, 62]. W świetle wielostronnych eksperymentów grupy Penmana wydaje się, że to właśnie filamenty rdzeniowe, których integralność zależy od obecności jądrowego RNA, stanowią ważny element budulcowy szkieletu jądrowego. Zniszczenie RNA przez trawienie RNazą in vitro bądź przez działanie leków in vivo wiedzie

TABELA 4. Zawartość białek i DNA we frakcjach jądrowych komórek HeLa [30]

| Frakcja | Białka [%] | DNA[%] |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------|
| Chromatyna (usuwana przez trawienie DNazą I i ekstrakcję zbuforowanym 0,25 M roztworem AS; pH 6,8) | 87,4 | 99,6 |
| Ekstrakt uzyskany za pomocą 2 M roztworu NaCl | 4,4 | 0,32 |
| Produkt trawienia za pomocą RNazy | 3,3 | 0,006 |
| Pozostałość jąder | 4,9 | 0,005 |

do ich destrukcji. Ten stan przyczynia się do „załamania” ciągłości strukturalnej matriks jądrowej i istotnych zmian w architekturze kompleksu chromatynowego.

TABELA 5. Dystrybucja RNA w jądrach komórek HeLa [30]

| Frakcja | cmp/komórkę | % jądrowego RNA | % kontroli |
|---------------------------------------------|-------------|-----------------|------------|
| Chromatyna | 16,9 | 28,7 | — |
| Ekstrakt uzyskany za pomocą 2 M roztw. NaCl | 1 2,5 | 4,2 | — |
| Filamenty rdzeniowe | 39,4 | 67,1 | — |
| Jądra komórkowe | 58,8 | 100 | — |
| 0,4 µg/ml aktynomycyny D | | | |
| Chromatyna | 8,0 | 27,4 | 47,4 |
| Ekstrakt uzyskany za pomocą 2 M roztw. NaCl | 1,2 | 4,1 | 47,7 |
| Filamenty rdzeniowe | 20,0 | 68,6 | 50,8 |
| Jądra komórkowe | 29,2 | 100 | 49,7 |

Komórki HeLa hodowano w obecności [³H]-urydyny (50 µCi/ml) w temp. 37°C przez 2 godz. W doświadczeniu wykorzystano hodowle rosnące w obecności (bądź bez) aktynomycyny D (0,04 µg/ml).

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALTIERI F, MARAS B, EUFEMI M, FERRARO A, TURANO C. Purification of a 57kDa nuclear matrix protein associated with thiol: protein-disulfide oxidoreductase and phospholipase C activities. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **194**: 992–1000.
- [2] BELGRADER P, SIEGEL A.J, BEREZNEY R. A comprehensive study on the isolation and characterization of the HeLa S3 nuclear matrix. *J Cell Sci* 1991; **98**: 281–291.
- [3] BENAVENTE R. Postmitotic nuclear reorganization events analyzed in living cells. *Chromosoma* 1991; **100**: 215–220.
- [4] BEREZNEY R, COFFEY DS. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; **60**: 1410–1417.
- [5] BEREZNEY R, BUCHHOLZ L. Isolation and characterization of rat liver nuclear matrices containing high molecular weight deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 1981; **20**: 4995–5082.
- [6] BEREZNEY R. The nuclear matrix: A heuristic model for investigating genomic organization and function in the cell nucleus. *J Cell Biochem* 1991; **47**: 109–123.
- [7] BURKE B, GERACE L. A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* 1986; **44**: 639–652.
- [8] BURKE B. On the cell-free association of lamins A and C with metaphase chromosomes. *Exptl Cell Res* 1990; **186**: 169–176.
- [9] CARDENAS ME, LAROCHE T, GASSER SM. The composition and morphology of yeast nuclear scaffolds. *J Cell Sci* 1990; **96**: 439–450.
- [10] CARRI MT, MICHALI G, GRAZIANO E, PACE T, BUONGIORNO-NARDELLI M. The relationship between chromosomal origins of replication and the nuclear matrix during the cell cycle. *Exptl Cell Res* 1986; **164**: 426–436.
- [11] CHELSKY D, SOBOTKA C, O'NEILL CL. Lamin B methylation and assembly into the nuclear envelope. *J Biol Chem* 1989; **264**: 7637–7643.
- [12] COOK PR, BRAZELL IA. Characterization of nuclear structures containing super-helical DNA. *J Cell Sci* 1976; **202**: 303–324.
- [13] de GRAAF A, van BERGEN en HENEGOUWEN PMP, MEIJNE ML, van DRIEL R, VERKLEIJ AJ. Ultrastructural localization of nuclear matrix proteins in HeLa cells using silver-enhanced ultra-small gold probes. *J Histochem Cytochem* 1991; **39**: 1035–1045.
- [14] de LANGE T. Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *EMBO J* 1992; **11**: 717–724.
- [15] DIJKWEL PA, WENINK PW. Structural integrity of the nuclear matrix: Differential effects of thiol agents and metal chelators. *J Cell Sci* 1986; **84**: 53–67.

- [16] DWORETZKY SI, FEY EG, PENMAN S, LIAN JB, STEIN JL, STEIN GS. Progressive changes in the protein composition of the nuclear matrix during rat osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4605–4609.
- [17] EBERHARTER A, GRABHER A, GSTRAUNTHALER G, LOIDL P. Nuclear matrix of the lower eukaryote *Physarum polycephalum* and the mammalian epithelial LLC-PK1 cell line. A comprehensive investigation of different preparation procedures. *Eur J Biochem* 1993; **212**: 573–580.
- [18] EVAN GJ, HANCOCK DC. Studies on the interaction of human c-myc protein with cell nuclei: p62 c-myc as a member of a discrete subset of nuclear proteins. *Cell* 1985; **43**: 253–261.
- [19] FALCIERI E, GOBBI P, SABATELLI P, SANTI S, FARABEGOLI F, RANA R, CATALDI A, MARALDI NM, MARTELLI AM. A combined ultrastructural approach to the study of nuclear matrix thermal stabilization. *Histochemistry* 1992; **98**: 121–129.
- [20] FEY EG, WAN KM, PENMAN S. Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix - intermediate filament scaffold: three-dimensional organization and protein composition. *J Cell Biol* 1984; **98**: 1973–1984.
- [21] FEY EG, KROCHMALNIC G, PENMAN S. The nonchromatin substructures of the cell nucleus. The ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analysed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *J Cell Biol* 1986; **102**: 1654–1665.
- [22] FEY EG, PENMAN S. Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 121–125.
- [23] FOISNER R, TRAUB P, WICHE G. Protein kinase A- and protein kinase C-regulated interaction of plectin with lamin B and vimentin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3812–3816.
- [24] GEORGATOS SD, BLOBEL G. Lamin B constitutes an intermediate filament attached site at the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1987; **105**: 117–125.
- [25] GEORGATOS SD, WEBER K, GEISLER N, BLOBEL G. Binding of two desmin derivatives to the plasma membrane and the nuclear envelope of avian erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 6780–6784.
- [26] GERACE L, BLOBEL G. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 1980; **19**: 227–287.
- [27] GETZENBERG RH, PIENTA KJ, WARD WS, COFFEY DS. Nuclear structure and the three-dimensional organization of DNA. *J Cell Biochem* 1991; **47**: 289–299.
- [28] GLASS JR, GRACE L. Lamins A i C bind and assemble at the surface of mitotic chromosomes. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1047–1057.
- [29] HALL G, ALLEN GC, LOER DS, THOMPSON WF, SPIKER S. Nuclear scaffolds and scaffold-attachment regions in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 9320–9324.
- [30] HE D, NICKERSON JA, PENMAN S. Core filaments of the nuclear matrix. *J Cell Sci* 1990; **110**: 569–580.
- [31] HERLAN G, WUNDERLICH F. Isolation of nuclear protein matrix from *Tetrahymena macronuclei*. *Cytobiologie* 1976; **13**: 291–296.
- [32] HOFFMAN M. The cell's nucleus shapes up. *Science* 1993; **259**: 1257–1259.
- [33] HUMPHREY GW, PIGIET V. Protein disulfide crosslinking stabilizes a Polyoma large T antigen-host protein complex on the nuclear matrix. *Exptl Cell Res* 1987; **171**: 122–136.
- [34] IVANCHENKO M, AVRAMOVA Z. Interaction of MAR-sequences with nuclear matrix proteins. *J Cell Biochem* 1993; **50**: 190–200.
- [35] IZAURRALDE E, MIRKOVITCH J, LEAMMLI UK. Interaction of DNA with nuclear scaffolds in vitro. *J Mol Biol* 1988; **200**: 111–125.
- [36] JACKSON DA. Structure-function relationships in eukaryotic nuclei. *BioEssays* 1991; **13**: 1–10.
- [37] KAUFMANN SH, COFFEY DS, SHAPER JH. Considerations in the isolation of rat liver nuclear matrix, nuclear envelope, and pore complex lamina. *Exptl Cell Res* 1981; **132**: 105–123.
- [38] KAUFMANN SH, SHAPER JH. A subset of non-histone nuclear proteins reversibly stabilized by the sulfhydryl crosslinking reagent tetrathionate. *Exptl Cell Res* 1984; **155**: 477–495.
- [39] KAUFMANN SH, FIELDS AP, SHAPER JH. The nuclear matrix: Current concepts and unanswered questions. *Meth Achiev Exp Pathol* 1986; **12**: 141–171.
- [40] KHANUJA PS, LEHR JE, SOULE HD, GEHANI SK, NOTO AC, CHOUDHURY S, CHEN R, PIENTA KJ. Nuclear matrix proteins in normal and breast cancer cells. *Cancer Res* 1993; **53**: 3394–3398.
- [41] KILIAŃSKA Z. Budowa i biologiczna rola matriks jądrowej. *Post Biol Kom* 1989; **16**: 61–86.
- [42] KIROV N, TSANEV R. Activated murine α -globin gene is not preferentially associated with the nuclear matrix. *Int J Biochem* 1986; **18**: 155–159.
- [43] LEBKOWSKI JS, LAEMMLI UK. Evidence for two levels of DNA folding in histone-depleted HeLa interphase nuclei. *J Mol Biol* 1982; **156**: 309–324.

- [44] LONG BH, OCHS RJ. Nuclear matrix, hnRNA and snRNA in Friend erythroleukemia depleted of chromatin by low ionic strength EDTA. *Biol Cell* 1983; **48**: 89–98.
- [45] MARTELLI AM, GILMOUR RS, FALCIERI E, MANZOLI FA, COCCO L. Temperature-dependent association of DNA polymerase α activity with the nuclear matrix. *Exptl Cell Res* 1990; **190**: 227–232.
- [46] MARTELLI AM, FALCIERI E, GOBBI P, MANZOLI L, GILMOUR RS, COCCO L. Heat-induced stabilization of the nuclear matrix: A morphological and biochemical analysis in murine erythroleukemia cells. *Exptl Cell Res* 1991; **196**: 216–225.
- [47] MIRKOVITCH J, MIRAULT ME, LAEMMLI UK. Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* 1984; **39**: 223–232.
- [48] MORENO DIAZ DE LA ESPINA S, BARTHELLEMY I, CEREZUELA MA. Isolation and ultrastructural characterization of the residual nuclear matrix in a plant cell system. *Chromosoma* 1991; **100**: 110–117.
- [49] NICKERSON JA, HE D, FEY EG, PENMAN S. The RNA-containing core filaments of the nuclear matrix [w] Biochemical and Structural Dynamics of the Cell Nucleus. Academic Press 1990; 3–25.
- [50] OTTAVIANO Y, GERACE L. Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis. *J Biol Chem* 1985; **260**: 624–632.
- [51] PAYRASTRE B, NIEVERS M, BOONSTRA J, BRETON M, VERKLEIJ AJ, VAN BERGEN EN HENEGOUWEN PMJ. A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *J Biol Chem* 1992; **267**: 5078–5084.
- [52] PIECK ACM, RIJKEN AAM, WANKA F. Nuclear matrix and chromosome scaffold preparations of in vitro cultured bovine liver cells have two proteins in common. *FEBS Lett* 1987; **212**: 276–280.
- [53] PIENTA KJ, PARTIN AW, COFFEY DS. Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure. *Cancer Res* 1989; **49**: 2525–2532.
- [54] PIENTA KJ, GETZENBERG RH, COFFEY DS. Cell structure and DNA organization. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression. Academic Press Inc 1991; **1**: 355–385.
- [55] POZNANOVIC G, SEVALJEVIC L. The relation of core ribonucleoproteins in the nuclear matrix isolated from nuclei treated with the phenantroline-cooper complex. *Cell Biol Int Rep* 1986; **10**: 55–63.
- [56] RAZIN SV, CHERNOKHVOSTOV VV, ROODYN AV, ZBARASKY IB, GEORGIEV G.P. Protein tightly bound to DNA in the regions of DNA attachment to the skeletal structures of interphase nuclei and metaphase chromosomes. *Cell* 1981; **27**: 65–73.
- [57] RAZIN SV, CHERNOKHVOSTOV VV, YAROVAYA OV, GEORGIEV GP. Organization of the sites for DNA attachment to the nonhistone proteinaceous nuclear skeleton, [w] Progress in Nonhistone Protein Research, I. Bekhor (red.) CRC Press Inc Boca Raton 1985; **2**: 92–114.
- [58] ROBERGE M, DAHMUS ME, BRADBURY EM. Chromosomal loop/nuclear matrix organization of transcriptionally active and inactive RNA polymerase in HeLa nuclei. *J Mol Biol* 1988; **201**: 545–555.
- [59] SCOFIELD GN, BEVEN AF, SHAW PJ, DOONAN JH. Identification and localisation of a nucleoporin-like protein component of the plant nuclear matrix. *Planta* 1992; **187**: 414–420.
- [60] SHOEMAN RL, TRAUB P. The in vitro DNA-binding properties of purified nuclear lamin proteins and vimentin. *J Biol Chem* 1990; **265**: 9055–9061.
- [61] SIMARD R, BIBOR-HARDY V, DAGENAIS A, BERNARD M, PINARD M-F. Role of the nuclear matrix during viral infection. *Meth Achiev Expt Pathol* 1986; **12**: 172–199.
- [62] SMITH HC, OCHS RC, FERNANDEZ EA, SPECTOR DL. Macromolecular domains containing nuclear protein p107 and U-snRNP protein p28: further evidence for an in situ nuclear matrix. *Mol Cell Biochem* 1986; **70**: 151–168.
- [63] SMITH HC, OCHS R, LIN D, CHINAULT AC. Ultrastructural and biochemical comparison of nuclear matrices prepared by high salt or LIS extraction. *Mol Cell Biochem* 1987; **77**: 49–61.
- [64] SMITH DE, GRUENBAUM Y, BERRIOS M, FISHER PA. Biosynthesis and interconversion of *Drosophila* nuclear lamin isoforms during normal growth and in response to heat shock. *J Cell Biol* 1987; **105**: 771–790.
- [65] SMITH DE, FISHER PA. Interconversion of *Drosophila* nuclear lamin isoforms during oogenesis, early embryogenesis, and upon entry of cultured cells into mitosis. *J Cell Biol* 1989; **108**: 255–265.
- [66] STEPANOVA E, STANCHEVA R, AVRAMOVA Z. Binding of sequences from the 5'- and 3'-nontranscribed spacers of the rat rDNA locus to the nucleolar matrix. *Chromosoma* 1993; **102**: 287–195.
- [67] STUURMAN N, MEIJNE ALM, VAN DER POL AJ, DE JONG L, VAN DRIEL R, VAN RENSWOUDE J. The nuclear matrix from cells of different origin. *J Biol Chem* 1990; **265**: 5460–5465.
- [68] STUURMAN N, FLOORE A, COLEN A, DE JONG L, VAN DRIEL R. Stabilization of the nuclear matrix by disulfide bridges: Identification of matrix polypeptides that form disulfides. *Exptl Cell Res* 1992; **200**: 285–294.
- [69] TUBO RA, BEREZNEY R. Pre-replicative association of multiple replicative enzyme activities with the nuclear matrix during rat liver regeneration. *J Biol Chem* 1987; **262**: 1148–1154.

- [70] VAN DRIEL R, HUMBEL B, DE JONG L. The nucleus: A black box being opened. *J Cell Biochem* 1991; **47**: 311–316.
- [71] VERHEIJEN R, VAN VENROOIJ W, RAMAEKERS F. The nuclear matrix: structure and composition. *J Cell Sci* 1988; **90**: 11–36.
- [72] WEITZ W, LOIDL P. In situ preparation of the nuclear matrix of *Physarum polycephalum*: ultrastructural and biochemical analysis of different matrix isolation procedures. *J Cell Sci* 1988; **90**: 621–628.
- [73] YUAN J, SIMOS G, BLOBEL G, GEORGATOS SD. Binding of lamin A to polynucleosomes. *J Biol Chem* 1991; **266**: 9211–9215.

Data otrzymania: 24.01.1994 r.

Data przyjęcia: 01.02. 1994 r.

Adres autorki: 91-224 Łódź, ul. Aleksandrowska 102/36.

TROMBOCYTY A MIAŻDŻYCA

PLATELETS AND ATHEROSCLEROSIS

Ewa KOPIECZNA-GRZEBIENIAK, Rafał TARNAWSKI,
Rozalia GRABOWSKA-BOCHENEK

Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

Streszczenie. W pracy przedstawiono ważne dla rozwoju zmian miażdżycowych wzajemne oddziaływania pomiędzy trombocytami, pomiędzy trombocytami a elementami ściany tętnicy, leukocytami i białkami osocza, jak również niektóre sposoby modulacji tych interakcji, które mogą być przydatne w leczeniu miażdżycy.

Słowa kluczowe: miażdżycyca, adhezja, agregacja, eikozanoidy, czynniki krzepnięcia, fibrynoliza, cytokiny, czynniki wzrostowe.

Summary. The important to atherogenesis interactions between platelets, between platelets and the elements of artery wall, leukocytes, plasma proteins, as well as some methods of the modulation these interactions, which may be useful in the therapy of atherosclerosis are presented in this paper.

Key words: atherosclerosis, adhesion, aggregation, eicosanoids, coagulation factors, fibrinolysis, cytokines, growth factors.

Jak wynika z badań na zwierzętach, do rozwoju miażdżycy nie dochodzi lub zmiany miażdżycowe są mniejsze u osobników z trombocytopenią [1, 27]. W populacjach, w których miażdżycyca występuje rzadko, opisywana jest zmniejszona zdolność trombocytów do agregacji *in vitro*, natomiast płytki krwi pacjentów z miażdżycą wykazują zwiększoną zdolność do agregacji [8, 21, 30]. Dieta bogata w cholesterol zwiększa we krwi liczbę trombocytów [20]. Fakty te przemawiają za istotną rolę trombocytów w rozwoju zmian miażdżycowych.

Trombocyty są najmniejszymi elementami morfotycznymi krwi, powstającymi przez fragmentację megakariocytów szpiku kostnego [37]. Średni czas przeżywania płytek krwi w łożysku naczyniowym wynosi 8–11 dni. Trombocyty zawierają mitochondria, złożony system mikrokanalików i cztery rodzaje ziarnistości:

1) ziarnistości α , które są unikalnymi organellami magazynującymi białka adhezyjne, czynniki krzepnięcia, mitogeny, inhibitory proteinaz, proteoglikany i inne [14, 37]. Lista składników ziarnistości α stale się powiększa. Niektóre spośród białek ziarnistości α są specyficzne dla trombocytów, np. β tromboglobina lub czynnik płytkowy 4. Większość jednak

białek obecnych w tych ziarnistościach jest niespecyficzna dla płytek krwi. Są to: fibrynogen, fibronektyna, czynnik von Willebranda (vWF), antygen-II von Willebranda, trombospondyna, glikoproteina bogata w histydyne, witronektyna, wysokocząsteczkowy kininogen, IgG, IgA, IgM, albuminy, czynniki krzepnięcia (np. czynnik V), inhibitor C1, białka uczestniczące w alternatywnej aktywacji dopełniacza, białkowy prekursor amyloidu beta (APP, czyli PN - II - ang. *protease nexin* - 2), osteonektyna, plazminogen, α_2 -makroglobulina, α_2 -antyplazmina, α_1 -antytrypsyna, inhibitor aktywatora plazminogenu – PAI-1, inhibitor kolagenazy płytkowej, białko S, multimeryna, czynnik przepuszczalności naczyń (VPF – ang. *vascular permeability factor*), inhibitor czynnika tkankowego (TFPI – ang. *tissue factor pathway inhibitor*), niektóre cytokiny oraz czynniki wzrostowe [14, 27, 28, 37]; białka te są syntetyzowane głównie przez megakariocyty, niektóre przez trombocyty (np. czynnik płytkowy 4) lub pochodzą z pinocytozy i endocytozy, które zachodzą na poziomie megakariocytów i krążących płytek krwi (np. fibrynogen i IgG);

2) ziarnistości δ (gęste), zawierające 5-hydroksytryptaminę, czyli serotoninę, nukleotydy adeninowe i guaninowe, dwuwartościowe kationy i nieorganiczny fosforan,

3) lizosomy, czyli ziarnistości λ , zawierające kwaśne hydrolazy,

4) peroksosomy zawierające katalazę.

Uwalnianie zawartości ziarnistości przez pobudzone trombocyty przyczynia się między innymi do wzmożonej lokalnej hemostazy przez promowanie ich interakcji z innymi trombocytami, leukocytami, białkami osocza i ścianą naczynia [14]. Wydzielanie składników ziarnistości α oraz zmianę kształtu płytek stymulują agoniści o słabym działaniu, podczas gdy sekrecja lizosomalna wymaga silniejszego bodźca. Uwalnianie ziarnistości trombocytów związane jest z fosforylacją łańcucha lekkiego miozyny oraz białka o masie cząsteczkowej 47 kDa, będącego substratem kinazy białkowej C, którego funkcja nie jest znana [37].

W warunkach fizjologicznych płytki krwi nie przylegają do elementów morfotycznych krwi ani do komórek śródbłonna [37]. Komórki endotelialne, dzięki ADP-azie, degradują ADP, jeden z czynników agregujących trombocyty, oraz syntetyzują substancje, które hamują reaktywność płytek krwi, takie jak: prostacyklina, tlenek azotu, kwas 13-hydroksy-9,11-oktadekadienowy (13-HODE) i siarczan heparanu [3,17,34]. Tlenek azotu wytwarzany jest również przez trombocyty, co może być istotne w zapobieganiu ich adhezji i agregacji [29]. W naczyniu zmienionym miażdżycowo wytwarzanie wymienionych czynników stanowiących naturalną barierę ochronną śródbłonna, m. in. przed przyleganiem do niego trombocytów, jest upośledzone [12].

Trombocyty przylegają natomiast do odsłoniętych składników tkanki łącznej przestrzeni podśródbłonkowej na skutek przerwania ciągłości naczynia lub zmian w jego ścianie, np. w miażdżycy [6]. Interakcje pomiędzy elementami morfotycznymi krwi a składnikami ściany tętnic odgrywają istotną rolę w patogenezie miażdżycy [28]. Efektem adhezji i agregacji trombocytów jest wytworzenie czopu trombocytów, który wzmocniony zostaje „rusztowaniem” tworzonej nad nim fibryny. W adhezji płytek krwi do uszkodzonej ściany naczyniowej uczestniczą receptory na powierzchni trombocytów, wykazujące duże powinowactwo do adhezyjnych glikoprotein obecnych w przestrzeni podśródbłonkowej oraz w zmianach patologicznych. Niektóre spośród tych receptorów należą do integryn, to jest dużej nadrodziny receptorów uczestniczących w adhezji, obecnych w różnych komórkach. W trombocytach obecne są 3 integryny z rodziny β_1 (VLA – ang. *very late lymphocyte-activation antigen*) i 2 integryny z rodziny β_3 (cytoadhezyny) [11]. Integrynowe receptory są zbudowane są z dwóch, połączonych niekowalencyjnie podjednostek (α i β). Wszyscy członkowie tej samej

rodziny integryn mają taką samą podjednostkę β , połączoną z różnymi podjednostkami α . Integryna $\alpha_2\beta_1$, czyli GPIa/IIa (będąca odpowiednikiem limfocytarnej integryny VLA-2) uczestniczy w adhezji do kolagenu typu I, II, III i IV. Ligandami integryn $\alpha_5\beta_1$ i $\alpha_6\beta_1$, czyli GPIc/IIa i GPIc*/IIa (będących limfocytaarnymi odpowiednikami VLA-5 i VLA-6), są odpowiednio fibronektyna i laminina. W adhezji trombocytów biorą również udział receptory należące do rodziny β_3 integryn: witronektynowy Av/IIIa ($\alpha_v\beta_3$) oraz GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$). Ligandami dla receptora Av/IIIa są: witronektyna, fibrynogen, czynnik von Willebranda i trombospondyna, fibronektyna, laminina, kolagen. Receptor GPIIb/IIIa wiąże fibrynogen, fibronektynę, czynnik von Willebranda, witronektynę i prawdopodobnie trombospondynę. Receptor ten uczestniczy nie tylko w adhezji, ale również w interakcji pomiędzy trombocytami, czyli w ich agregacji, i jest specyficzny dla megakariocytów i trombocytów.

W adhezji trombocytów uczestniczą także receptory nie należące do integryn, takie jak: GPIb, GPIV, GPV i GPVI [6,10,24,33]. Receptor GPIb wiąże czynnik von Willebranda, GPIV – trombospondynę i kolagen, GP VI – kolagen. Bogata w leucynę GPV tworzy w błonie trombocytów niekowalencyjny kompleks z GPIb-IX, który wiąże czynnik von Willebranda [22].

Większość receptorów obecnych w błonach trombocytów to białka funkcjonalnie czynne w niepobudzonych płytkach krwi [6]. Nieuszkodzony śródbłonek zastania adhezyjne glikoproteiny będące ligandami dla ich receptorów, co zapobiega przyleganiu trombocytów do ściany naczyń. Wiązanie pomiędzy poszczególnymi płytkami krwi odbywa się za pośrednictwem kompleksu glikoproteinowego GPIIb/IIIa [9]. Fibrynogen wiąże się z tym kompleksem przy udziale jonów wapnia. Wiązanie fibrynogenu z receptorem GPIIb/IIIa stabilizowane jest przez trombospondynę, która pochodzi z płytek krwi i komórek śródbłonka. Receptor ten, podobnie jak wiele innych integryn, zawiera miejsce wiążące trójpeptyd Arg-Gli-Asp [6]. Sekwencję tę (RGD) zawierają wszystkie ligandy receptora GPIIb/IIIa. Każdy ligand tego receptora ma także inne, unikalne miejsce wiązania z receptorem. Ekspresja receptora GPIIb/IIIa pojawia się w wyniku działania wszystkich bodźców powodujących agregację trombocytów. Trombocyt zawiera dużo (ok. 50000) receptorów GPIIb/IIIa, ale ich miejsca wiązania ligandów w niepobudzonych płytkach krwi, podobnie jak osteonektyny, CD-36 i selektyny P, są niedostępne. Podczas aktywacji trombocytów następuje translokacja tych białek receptorowych na powierzchnię błony [14].

Zmniejszoną ekspozycję receptora GPIIb/IIIa na powierzchni trombocytów powoduje wzrost stężenia cAMP w płytkach krwi na skutek aktywacji cykazy adenylanowej (prostacyklina, PGE₁, adenozyne) lub inhibicji fosfodiesterazy (dipirydamol) [3, 37]. Prostacyklina stymuluje cyklazę adenylanową, a wytworzony cAMP aktywuje kinazę białkową A. W ten sposób prostacyklina inicjuje fosforylację ważnych dla funkcji trombocytów białek. Są nimi: polipeptyd o masie cząsteczkowej 22 kDa w systemie gęstych kanalików, kinaza łańcucha lekkiego miozyny i glikoproteina Ib (GPIb).

Z obniżaniem ekspresji receptorów zaangażowanych w adhezję i agregację wiąże się m.in. potencjalne działanie przeciwmiażdżycowe. Niektóre spośród preparatów o takim działaniu stosowane są już jako leki, np. stabilne analogi prostacykliny. PGI₂ powoduje dyspersję agregatów płytkowych in vitro oraz w krążeniu u ludzi, a także hamuje tworzenie zakrzepów [37]. Prostacyklina hamuje interakcję trombocyt-trombocyt w dużo mniejszych stężeniach niż oddziaływanie trombocyt-kolagen. PGI₂ wykazuje bowiem słabe właściwości antyadhezyjne. Endonadtlenki pochodzące z trombocytów mogą być przekształcane w komórkach śródbłonka

do prostacykliny, stąd uszkodzenie lub dysfunkcja endotelium w miażdżycy pozbawia naczynie tej dodatkowej, antytrombogenicznej ochrony [29].

Agregację trombocytów hamuje także blokada cyklooksyzgenazy (aspiryna), syntazy tromboksanowej (pirmagrel), zablokowanie receptora tromboksanowego (sulotroban) [10]. Aspiryna powoduje nieodwracalną acetylację seryny w pozycji 530 cyklooksyzgenazy [37]. Zastąpienie seryny alaniną nie zmienia aktywności tego enzymu, co wskazuje, że seryna nie wchodzi w skład jego centrum katalitycznego. Cyklooksyzgenaza z płytek krwi jest bardziej podatna na hamowanie przez aspirynę niż cyklooksyzgenaza w ścianie naczynia [35]. Małe dawki aspiryny hamują wytwarzanie tromboksanu w trombocytach, natomiast duże dawki hamują zarówno syntezę TXA_2 , jak i PGI_2 w endotelium, co sprzyja tworzeniu zakrzepów.

W przeciwieństwie do nieodwracalnego hamowania cyklooksyzgenazy przez aspirynę, niesterydowe leki przeciwzapalne, takie jak: indometacyna, fenylobutazon, kwas flufenamowy, oksyfenylobutazon, ibuprofen, hamują odwracalnie cyklooksyzgenazę poprzez współzawodnictwo z substratem o miejsce aktywne enzymu [35,37].

Konsumpcja niewielkich ilości alkoholu (50 g), który sam nie ma wpływu na czas krwawienia, zwiększa efekt wywierany przez aspirynę na ten parametr laboratoryjny [18,23]. Małe dawki etanolu zwiększają antyagregacyjne działanie prostacykliny na trombocyty.

Alkaloid tytoniu, nikotyna, hamuje konwersję kwasu arachidonowego do prostacykliny i zwiększa syntezę TXA_2 w płytkach krwi [16]. Takie działanie nikotyny częściowo tłumaczy, dlaczego palenie tytoniu jest jednym z czynników ryzyka miażdżycy.

Znany jest wpływ diety bogatej w oleje rybne, zawierające dużo kwasu eikozapentaenowego (EPA) C 20:5(n-3) na hamowanie agregacji płytek krwi [19]. Zjawisko to tłumaczą dwie hipotezy. Jedna zakłada przemianę EPA do PGI_3 , o silnym działaniu antyagregacyjnym, i TXA_3 , który powoduje słabszą agregację płytek krwi w porównaniu z TXA_2 . Druga hipoteza wskazuje na hamowanie uwalniania kwasu arachidonowego z trombocytarnych fosfolipidów oraz hamowanie cyklooksyzgenazowej drogi jego przemian przez EPA. Oleje rybne mają niewielki wpływ na funkcje trombocytów u zdrowych ochotników [35].

W cukrzycy, która jest chorobą sprzyjającą rozwojowi miażdżycy, wykazano odwrotną korelację pomiędzy stężeniem wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu i agregacją płytek krwi indukowaną przez trombinę, co może wskazywać na hamowanie agregacji trombocytów przez te kwasy [24]. Kwas arachidonowy indukuje agregację trombocytów, natomiast kwasy tłuszczowe, takie jak: olejowy, linolowy, gammalinolenowy, hamują agregację trombocytów indukowaną ADP lub kwasem arachidonowym. Nasycone kwasy tłuszczowe, takie jak mirystynowy czy palmitynowy, również hamują agregację indukowaną trombiną, prawdopodobnie poprzez zahamowanie metabolizmu fosfatydyloinozytolu.

Zahamowanie agregacji trombocytów powoduje także blokada receptora GPIIb/IIIa za pomocą monoklonalnych przeciwciał przeciwko temu receptorowi lub peptydów zawierających sekwencję obecną w glikoproteinach adhezyjnych [3, 6]. Preparaty działające bezpośrednio na receptor GPIIb/IIIa charakteryzują się swoistością płytkową. Preparatem hamującym agregację trombocytów jest także ticlopidyna. Nieznany jest mechanizm hamowania przez nią ekspozycji receptora GPIIb/IIIa. Nowymi preparatami hamującymi tworzenie zakrzepu płytkowego są przeciwciała przeciwko czynnikowi von Willebranda, inhibitory wytwarzania trombiny, takie jak aktywowane białko C, inhibitory trombiny. Być może preparaty te okażą się skuteczne w leczeniu miażdżycy.

Agregację trombocytów hamuje także EDRF/NO (czynnik relaksujący ścianę naczynia pochodzący ze śródbłonna, utożsamiany z tlenkiem azotu) wzmacniający antyagregacyjne

działanie prostacykliny. Hamuje on agregację trombocytów przez aktywację cykazy guanylowej i wzrost stężenia cGMP [6]. Utrata zdolności uwalniania EDRF na skutek uszkodzenia śródbłonna naczyń pozwala na adhezję trombocytów do ściany naczynia (powstaje „dywan płytkowy”) [37]. Inhibitory syntazy NO zwiększają adhezję trombocytów i granulocytów obojętnochłonnych do powierzchni komórek śródbłonna, co sugeruje, że tlenek azotu uczestniczy w regulacji ekspresji cząsteczek adhezyjnych [17]. Zmniejszone wytwarzanie tlenu azotu w miażdżycy może osłabiać hamowanie adhezji trombocytów, zwiększając lokalne uwalnianie czynników wzrostowych i proliferację miocytów w ścianie naczyń, co prowadzi do rozwoju blaszki miażdżycowej [29].

EDRF stanowi barierę chemiczną dla cytotoksycznych wolnych rodników, np. anionu nadtlenkowego. Tlenek azotu jest więc „zmiataczem” wolnych rodników tlenowych. Zmniejszone wytwarzanie tlenu azotu przez uszkodzone w miażdżycy komórki śródbłonna może sprzyjać progresji zmian miażdżycowych nasilając procesy wolnorodnikowe. Miażdżycę zaliczana jest do schorzeń wolnorodnikowych. Aktywacja trombocytów u pacjentów z chorobą wieńcową serca, która jest jedną z klinicznych manifestacji miażdżycy, jest związana ze zmniejszoną obroną antyoksydacyjną [2]. Wolne rodniki tlenowe generowane przez trombocyty pacjentów z chorobą niedokrwinną serca nie są skutecznie usuwane przez mechanizmy antyoksydacyjne. Szczególnie niska jest u tych pacjentów w trombocytach aktywność peroksydazy glutationowej.

Agregujące trombocyty obkurczają tętnice wieńcowe *in vitro* [29]. Skurcz ten wzmacnia usunięcie śródbłonna. Ekspozycja obkurczonych tętnic na agregujące trombocyty powoduje rozkurcz naczyń z zachowanym śródbłonkiem, natomiast skurcz jest potęgowany w naczyniu pozbawionym śródbłonna. Rozkurcz naczyń pod wpływem agregujących trombocytów ma związek z EDRF/NO (błękit metylenowy i hemoglobina zapobiegają rozkurcowi), a nie z prostacykliną (inhibitory cyklooksygenazy nie mają wpływu na tę odpowiedź). Agregujące trombocyty wydzielają m.in. serotoninę i tromboksan, które powodują niezależny od śródbłonna skurcz naczyń. Skurcz ten jest równoważony przez zależny od śródbłonna rozkurcz. ADP, ATP, serotonina indukują bowiem uwalnianie tlenu azotu przez działanie na receptory śródbłonkowe P_{2y} i $5HT_2$.

W aktywacji trombocytów uczestniczą agonści w osoczu (trombina, ADP, epinefryna, PAF), jak również agonści będący składnikami warstwy podśródbłonkowej (kolagen, czynnik von Willebranda, fibrynogen) [4]. Związanie agonisty z receptorami błonowymi trombocytów inicjuje zmianę kształtu płytek krwi, agregację, sekrecję zawartości ziarnistości [14]. Czynniki agregujące trombocyty (ADP, adrenalina, trombina, kolagen) uwalniają z fosfolipidów błonowych kwas arachidonowy i stymulują jego przemianę do tromboksanu TXA_2 w drodze cyklooksygenazowej [14]. W wyniku interakcji tromboksanu z jego receptorem następuje uwalnianie agonistów płytkowych z ziarnistości trombocytów (np. ADP, serotonina) wzmagających agregację. Jest to pośredni sposób oddziaływania tromboksanu na ekspozycję receptora GPIIb/IIIa. TXA_2 także bezpośrednio wpływa na ekspozycję tego receptora. Kolagen i trombina mogą uwalniać zawartość ziarnistości płytkowych, nawet po zablokowaniu cyklooksygenazowej drogi przemian kwasu arachidonowego [6].

Ligandem dla receptora tromboksanowego w płytkach krwi, oprócz TXA_2 , jest również PGH_2 , stąd receptor ten nosi nazwę TXA_2/PGH_2 [37]. Jego stymulacja prowadzi do aktywacji fosfolipazy C, czego efektem jest wzrost stężenia Ca^{2+} w trombocytach [30]. W płytkach krwi kwas arachidonowy jest przekształcany także z udziałem 12-lipooksygenazy. Produktami tej reakcji są kwas 12-hydroperoksyeikozatetraenowy (12-HPETE) i kwas 12-hydroksyeikozate-

traenowy (12-HETE). Istnieje sugestia, że 12-HETE zwiększa syntezę białek adhezyjnych poprzez aktywację kinazy białkowej C [17]. 12-HETE, syntetyzowany przez aktywowane trombocyty, i leukotrien B_4 , produkt lipooksygenacji wytwarzany w granulocytach obojętnochłonnych, wykazują działanie chemotaktyczne dla miocytów gładkich [27]. Enancjomer 12(S)HETE, ale nie 12(R)HETE zwiększa ekspresję receptorów integrynowych w komórkach śródbłonna [36]. Ten efekt wywierany przez 12(S)HETE jest antagonizowany przez 13HODE i prostacyklinę. 12-HETE kurczy komórki śródbłonna naczyń poprzez aktywację kinazy białkowej C i fosforylację białek cytoszkieletu, umożliwiając leukocytom i trombocytom kontakt z przestrzenią podśródblonkową i ułatwiając napływ do niej lipidów. W przemianach kwasu arachidonowego w trombocytach wytwarzane są także w niewielkiej ilości prostaglandyny E_2 , F_{2a} i D_2 [37].

Proagregacyjne działanie na trombocyty endonadtlenków prostaglandynowych (PGG_2 i PGH_2) związane jest z tworzeniem tromboksanu TXA_2 , który jest silnym stymulatorem agregacji trombocytów, a także działa naczynioskurczowo. TXA_2 w fizjologicznej temperaturze i pH jest szybko rozkładany do nieczynnego biologicznie TXB_2 . Okres półtrwania TXA_2 wynosi ok. 30 sekund.

Konwersję PGH_2 do tromboksanu TXA_2 przeprowadza syntaza tromboksanowa. Enzym ten, pochodzący z ludzkich trombocytów, ma masę cząsteczkową 58 kDa i zawiera cytochrom P450. Produktem działania tego enzymu, oprócz tromboksanu, jest HHT (kwas hydroksyheptadekatrienowy), którego biologiczna funkcja nie jest znana.

Pod wpływem czynników pochodzenia płytkowego, a także z udziałem czynników tkankowych, uwalnianych z uszkodzonych naczyń, dochodzi do wytworzenia trombiny z krążącego zymogenu – protrombiny [37]. Trombina odpowiedzialna jest za konwersję fibrynogenu do fibryny, która stabilizuje zagregowaną masę płytek. Zakrzep zawierający dużo fibryny jest wrażliwy na lizę z udziałem czynników fibrynolitycznych, takich jak np.: streptokinaza czy tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA).

Trombina uczestniczy także w aktywacji przemian kwasu arachidonowego w płytkach krwi oraz powoduje uwalnianie zawartości ich ziarnistości [37]. Rodzaj uwalnianych substancji zależy od bodźca, który działa na trombocyty. Wiele bodźców uwalnia zawartość ziarnistości α , ale tylko niektóre, np. trombina czy kolagen, uwalniają enzymy lizosomalne.

Na powierzchni trombocytów, podobnie jak na powierzchni komórek śródbłonna, z udziałem kompleksu protrombinazy (kompleks Xa - Va - Ca^{2+} -fosfolipidowy), generowana jest trombina [31]. Z płytkami krwi związane są poprzez interakcje z fosfolipidami błonowymi czynniki krzepnięcia V i VIII. Trombina modyfikuje czynnik V, co powoduje, że wiąże się on z dużym powinowactwem z trombocytami. Czynnik Va związany z płytkami krwi pełni rolę receptora dla czynnika Xa . W obecności czynnika Va związanego z trombocytami następuje eksplozja przemiany protrombiny do trombiny. Wytworzone z udziałem trombiny monomery fibryny polimeryzują nieenzymatycznie i wiążą się z trombocytami i elementami przestrzeni podśródblonkowej. Z wytwarzaną fibryną i trombocytami wiąże się plazminogen. Wiązanie to zwiększa obecność t-PA (tkankowego aktywatora plazminogenu). Przy braku fibryny aktywność tego aktywatora plazminogenu jest znikoma. t-PA związany z fibryną wiąże się z dużym powinowactwem z plazminogenem. Plazmina hamuje funkcje trombocytów przez blokowanie uwalniania kwasu arachidonowego z fosfolipidów błonowych i prawdopodobnie przez zniszczenie receptorów GP, głównie receptora GPIIb [3].

Trombina zmienia także reaktywność czynnika von Willebranda, który nie wiąże się pod jej wpływem z receptorem GPIIb, natomiast wchodzi w interakcję z GPIIb/IIIa [3].

Płytki krwi aktywnie uczestniczą nie tylko w procesie krzepnięcia, ale również w regulacji fibrynolizy [31]. Zarówno t-PA (tkankowy aktywator plazminogenu), jak i u-PA (urokinazowy aktywator plazminogenu) są obecne w trombocytach [6]. Aktywatory plazminogenu (t-PA, streptokinaza) aktywują płytki krwi, zwiększając w osoczu i moczu stężenie metabolitów TXA₂ oraz powodują agregację trombocytów. Chociaż plazmina w dużych stężeniach aktywuje płytki krwi i powoduje ich agregację, jej generacja nie jest odpowiedzialna za aktywację trombocytów spowodowaną przez aktywatory plazminogenu, skoro płytki krwi aktywowane *ex vivo* przez plazminę wytwarzają tylko niewielką ilość TXA₂.

Trombocyty zawierają także PAI-1 (inhibitor aktywatora plazminogenu) i α_2 -antypłazminę [6]. Płytki krwi mogą ograniczać fibrynolizę także przez dostarczanie czynnika XIII. Czynniki te, uczestnicząc w sieciowaniu fibryny, zwiększa jej oporność na lizę. Czynniki XIII hamuje również fibrynolizę, poprzez wiązanie α_2 -antypłazminy z fibryną. Produkty degradacji fibryny i fibrynogenu hamują agregację płytek, ponieważ blokują wiązanie trombocytów z fibrynogenem.

Trombocyty oddziałują ze składnikami dopełniacza. W błonie trombocytów obecne są receptory dla C1q [7]. Wiązanie tego składnika dopełniacza z płytkowym receptorem C1q jest zależne od magnezu i jest ono hamowane przez kolagen. Monomer C1q już w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ hamuje agregację trombocytów indukowaną kolagenem. Fizjologiczne znaczenie *in vivo* tej inhibicji nie jest znane, skoro w osoczu stężenie monomeru C1q przekracza 100 $\mu\text{g/ml}$. Zagregowany C1q stymuluje natomiast agregację trombocytów. Stymulacja płytek krwi trombiną lub kolagenem powoduje uwalnianie z ich ziarnistości α inhibitora C1. Trombocyty mogą wchodzić w interakcje z układem dopełniacza także poprzez swoje receptory dla C3 lub jego fragmentów. Trombocyty świnki morskiej ekspozowane na C3a lub C5a uwalniają swoje ziarnistości α i agregują [7, 23]. Nie wykazano natomiast bezpośredniej aktywacji płytek krwi człowieka i małpy przez te składniki dopełniacza. C5b-9 aktywuje kinazę białkową C, uwalnia ziarnistości α z trombocytów, czemu nie towarzyszy zwiększona ich agregacja. C5b-9 generuje MAC (ang. *membrane attack complex*) oraz aktywuje krzepnięcie: uwolniony pod jego wpływem czynnik V z ziarnistości α ulega aktywacji do Va. Mechanizm tej aktywacji nie jest znany. Konsekwencją tego jest zwiększone wiązanie czynnika Xa z trombocytami i wytworzenie aktywnego kompleksu protrombinazy. Z błoną trombocytów związane są białkowe regulatory aktywności C5b-9. Są nimi: białko wiążące składnik dopełniacza C8, CD59 (czyli MIRL – ang. *membrane inhibitor of reactive lysis*, HRF20 – ang. *homologous restriction factor 20*, czyli P18) i receptor dla witronektyny. Witronektyna (białko S) jest podstawowym białkiem osocza regulującym nagromadzenie C5b-9 oraz wiąże ona trombocyty z uszkodzoną ścianą naczyń.

Wiele prac wskazuje na zaangażowanie układu dopełniacza w powstawaniu zmian miażdżycowych [23, 32]. Fragment C3b wiąże, poprzez kwas sjałowy, apo(a). Powiązanie tego składnika komplementu z lipoproteiną Lp(a), poprzez apo(a), stanowić może jedną z dróg tworzenia komórek piankowatych. Opłaszczenie Lp(a) przez C3b może promować pobieranie tej lipoproteiny przez receptor dopełniacza. Być może tą drogą lipoproteina (a) rozpoznawana jest przez makrofagi.

Ważnymi elementami w tworzeniu blaszki miażdżycowej są czynniki wzrostowe i cytokiny, których jednym ze źródeł są płytki krwi. Agregujące trombocyty uwalniają PDGF, EGF, TGF β , IGF-1, IL-1 i endotelinę [27,37]. Czynniki wzrostowe to peptydy uczestniczące w międzykomórkowej komunikacji, adhezji, migracji, proliferacji i transformacji [13,27]. PDGF – czynnik wzrostowy pochodzenia płytkowego wytwarzany jest nie tylko, jak począt-

kowo sądzono, przez trombocyty, lecz również przez makrofagi, miocyty gładkie i komórki śródbłonna. Jest on mitogenem dla miocytów gładkich oraz powoduje ich migrację, jak również migrację monocytów. EGF – epidermalny czynnik wzrostowy jest mitogenem dla komórek pochodzenia ekto- i endodermalnego, m.in. dla komórek śródbłonna. TGF β – transformujący czynnik wzrostowy w niskich stężeniach pobudza proliferację miocytów gładkich, poprzez indukcję uwalniania PDGF, natomiast w wyższych stężeniach hamuje receptor PDGF. TGF β , podobnie jak IGF-1- insulinopodobny czynnik wzrostowy oraz IL-1 i endotelina, oprócz stymulowania proliferacji miocytów gładkich powoduje także ich migrację, co sprzyja rozwojowi blaszki miażdżycowej.

Synteza endoteliny przez komórki śródbłonna nie wymaga ich bezpośredniego kontaktu z trombocytami [25]. Intensywność syntezy endoteliny jest jednak większa, gdy komórki te znajdują się w bezpośrednim kontakcie z płytkami krwi.

W aterogenezie oprócz interakcji pomiędzy trombocytami oraz pomiędzy płytkami krwi i ścianą naczynia czy białkami osocza istotne jest również oddziaływanie pomiędzy trombocytami a granulocytami obojętnochłonnymi. Granulocyty obojętnochłonne oraz komórki śródbłonna wytwarzają PAF – czynnik aktywujący trombocyty (1-O-alkilo-2-acetylo-glicero-3-fosfocholina) [26]. Powoduje on adhezję i agregację trombocytów i leukocytów, wydzielanie ich ziarnistości, obniżenie ciśnienia krwi i zwiększenie przepuszczalności ścian naczyń krwionośnych. PAF nie jest wytwarzany w sposób ciągły, lecz pod wpływem mediatorów ostrego zapalenia i odpowiedzi alergicznej. Bodźcami tymi u człowieka są: trombina, leukotrieny C4 i D4, histamina, bradykinina i ATP. Czynnik aktywujący trombocyty podany dożylnie szczerom zwiększa aktywność fibrynolityczną poprzez uwalnianie przez śródbłonek naczyń t-PA (tkankowego aktywatora plazminogenu) [15].

Trombocyty są aktywowane przez granulocyty obojętnochłonne (z udziałem PAF), ale także płytki krwi aktywują te leukocyty. Trombocyty wydzielają PBP (*platelet basic protein*) [5]. Jest to peptyd zbudowany z 94 aminokwasów. Rozszczepienie 9-tego wiązania peptydowego od N-końca, to jest między Arg i Asn, prowadzi do wytworzenia 85-aminokwasowego peptydu aktywującego tkankę łączną – CTAP-III (*connective tissue activating protein*). Proteolityczna hydroliza 13-tego wiązania peptydowego od N-końca w PBP, pomiędzy Liz i Gli, prowadzi do wytworzenia b-tromboglobiny, zawierającej 81 reszt aminokwasowych. Rozbicie 24-tego wiązania peptydowego od N-końca w PBP, pomiędzy Tyr i Ala, powoduje wytworzenie peptydu aktywującego granulocyty obojętnochłonne. Jest nim 75-aminokwasowy peptyd NAP-2 (*neutrophil activating peptide-2*), wykazujący właściwości chemotaktyczne dla granulocytów obojętnochłonnych, pobudzający je do sekrecji enzymów z ich ziarnistości. Prekursory NAP-2 są prawidłowymi składnikami osocza wytwarzanymi przez trombocyty. NAP-2 stymuluje włączanie znakowanej tymidyny przez fibroblasty do DNA i znakowanej glukozaminy do glikozaminoglikanów. NAP-2 wykazuje podobieństwo do takich peptydów, jak: IL-8, nazywanej też NAP-1, peptydu aktywującego granulocyty obojętnochłonne, pochodzącego z monocytów (MDNAP – *monocyte derived neutrophil activating peptide*), czynnika pochodzącego z monocytów o działaniu chemotaktycznym dla granulocytów obojętnochłonnych (MDNCF – *monocyte derived neutrophil chemotactic factor*), peptydu chemotaktycznego dla granulocytów (GCP – *granulocyte chemotactic protein*). NAP-2 i IL-8 współzawodniczą o te same receptory na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych. NAP-2 powstaje ze swoich prekursorów (PBP, CTAP-III i β -tromboglobiny) pod wpływem chymotrypsyny, katepsyny G lub elastazy trzustkowej. Istnieje zatem wzajemna aktywacja granulocytów obojętnochłonnych i trombocytów. Aktywowane trombocyty uwalniają do

krążenia prekursor NAP-2. Chymotrypsyna oraz, podobna do niej proteaza z granulocytów obojętnochłonnych, katepsyna G generują NAP-2 z jego prekursorów. Takich właściwości nie ma natomiast elastaza pochodząca z granulocytów, mimo że znajduje się w tych samych ziarnistościach co katepsyna G. Trombocyty mają na swojej powierzchni specyficzne receptory dla katepsyny G, która związana z trombocytami zachowuje aktywność proteolityczną. Gdy katepsyna G zajmuje receptory na trombocytach, uwalniany jest NAP-2 – cytokina odpowiedzialna za degranulację i chemotaksję granulocytów obojętnochłonnych. Stymulowane, ulegające degradacji granulocyty obojętnochłonne powodują uwalnianie NAP-2 przez trombocyty.

Z przedstawionych w skrócie wiadomości o trombocytach uzasadnione wydaje się być zainteresowanie ich rolą w miażdżycy. Lepsze poznanie interakcji pomiędzy trombocytami a składnikami ściany tętnic, elementami morfotycznymi krwi i białkami osocza być może przyczyni się do wyodrębnienia nowych leków skutecznych w leczeniu miażdżycy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BARNA M, BIRO G. Atherosclerosis: dietary considerations. [w] Bourne G. [red.] Impact of Nutrition on Health and Disease, World Rev. Nutr. Diet, Basel: Karger 1989; 59: 126–155.
- [2] BUCZYŃSKI A, WACHOWICZ B, KĘDZIORA-KORNATOWSKA K, TKACZEWSKI W, KĘDZIORA J. *Atherosclerosis* 1993; 100: 223–228.
- [3] CADROY Y, HARKER L. Platelets, thrombosis and antithrombotic therapies. [w] Antonaccio M. [red.] Cardiovascular Pharmacology, New York: Raven Press 1990: 515–539.
- [4] CLARK E, BRUGGE J. Tyrosine phosphorylation in platelets. *Trends Cardiovasc Med* 1993; 3: 218–227.
- [5] COHEN A, STEVENS M, MILLER E, ATKINSON M, MULLENBACH G. Generation of the neutrophil-activating peptide-2 by cathepsin G and cathepsin G-treated human platelets. *Lung Cell Mol Physiol* 1992; 7: L249–L256.
- [6] COLLER B. Platelets and thrombolytic therapy. *N Engl J Med* 1990; 322: 33–42.
- [7] DEVINE D. The effects of complement activation on platelets. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 178: 101–113.
- [8] ELWOOD P, RENAUD S, SHARP D, BESWICK A, O'BRIEN J, YARNEL W. Ischaemic heart disease and platelet aggregation. *Circulation* 1991; 83: 38–44.
- [9] GERRARD J. Platelet aggregation: Cellular regulation and physiologic role. *Hospital Practice* 1988; 23: 89–108.
- [10] GERRITSEN M. Functional heterogeneity of vascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 1987; 35: 2701–2711.
- [11] GINSBERG M, XIAOPING D, O'TOOLE T, LOFTUS J, PLOW E. Platelet integrins. *Thromb Haemostasis* 1993; 70: 87–93.
- [12] GÓRSKI J. Tromboliza a krwinki płytkowe. *Pol Tyg Lek* 1992; 47: 427–429.
- [13] HAJJAR D, POMERANTZ K. Signal transduction in atherosclerosis: integration of cytokines and the eicosanoid network. *Faseb J* 1992; 6: 2933–2941.
- [14] HARISON P, CRAMER E. Platelet a-granules. *Blood Rev* 1993; 7: 52–62.
- [15] HOFMANN B, MEISGEIER U, GREINER J, KERTSCHER H, OSTERMANN G. Effect of platelet-activating factor (PAF) and synthetic analogues fibrinolysis in rats. *Fibrinolysis* 1990; 16: 207–216.
- [16] HUI S, WANG Z, ZHANG H, OGLE C. Arachidonic acid metabolism in nicotine-treated rats and nicotine-incubated rabbit aortic smooth muscle cells. *Clin Exp Pharm Physiol* 1992; 19: 689–693.
- [17] JACKSON R, KU G, THOMAS C. Antioxidants: a biological defence mechanism for the prevention of atherosclerosis. *Med Res Rev* 1993; 13: 161–182.
- [18] JAKUBOWSKI J, VAILLANCOURT R, DEYKIN D. Interaction of ethanol, prostacyclin and aspirin in determining human platelet reactivity in vitro. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 436–441.
- [19] KIMURA S, CHIANG M, FUJIMOTO H. Effects of eicosapentanoic acid and soybean protein on plasma cholesterol, blood pressure and platelet aggregation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Monographs on atherosclerosis* 1990; 16: 26–35.

- [20] KRAUSE S, POHL A, POHL C, FINK S, RUHLING K, KATZEL R, VON LENGERKEN G, MAAK S, LOSCHE W, TILL U. Ex vivo investigation of blood monocyte and platelet behaviour in pigs maintained on an atherogenic diet. *Exp Toxic Pathol* 1992; **44**: 144–146.
- [21] MEADE T, VICKERS M, THOMPSON S, STIRLING Y, HAINES A, MILLER G. Epidemiological characteristics of platelet aggregability. *Br Med J* 1985; **290**: 428–432.
- [22] MODDERMAN P, ADMIRAAL L, SONNENBERG A, VON DEM BORNE AG. Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J Biol Chem* 1992; **267**: 364–369.
- [23] MUGGE A, HEISTAD D, DENSEN P, PIEGORS D, ARMSTRONG M, PADGETT R, LOPEZ J. Activation of leukocytes with complement C5a is associated with prostanoid-dependent constriction of large arteries in atherosclerotic monkeys in vivo. *Atherosclerosis* 1992; **95**: 211–222.
- [24] NIEUWENHUIS H, SAKARIASSEN K, HOUDIJK W, NIEVELSTEIN P, SIXMA J. Deficiency of platelet membrane glikoprotein Ia associated with a decreased platelet adhesion to subendothelium: a defect in platelet spreading. *Blood* 1986; **68**: 692–695.
- [25] OHLSTEIN E, STORER B, BUTCHER J, DEBOUCK C, FEUERSTEING. Platelets stimulate expression of endothelin mRNA and endothelin biosynthesis in cultured endothelial cells. *Circ Res* 1991; **69**: 832–841.
- [26] PRIBNOW D, MULDOON L, FAJARDO M, THEODOR L, CHEN L, MAGUN B. Endothelin induces transcription of fos/jun family genes: a prominent role for calcium ion. *Molec Endocrinol* 1992; **6**: 1003–1012.
- [27] RAINES E, ROSS R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993; **69** (suppl): 30–37.
- [28] ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; **362**: 801–809.
- [29] RUBANYI G. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharm* 1993; **22** (Suppl 4): 1–14.
- [30] RUBENFIRE M, BLEVINS R, BARNHART M, HOUSHOLDER S, SELIK N, MAMMEN E. Platelet hypyraggregability in patients with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Am J Cardiol* 1986; **57**: 657–660.
- [31] SCHARF R, HARKER L. Thrombosis and atherosclerosis: regulatory role of interactions among blood components and endothelium. *Blut* 1987; **55**: 131–144.
- [32] SEIFERT P, ROTH I, ZIONCHECK T. The apolipoprotein {a} moiety of lipoprotein {a} interacts with the complement activation fragment iC3b but does not functionally affect C3 activation or degradation. *Atherosclerosis* 1992; **93**: 209–216.
- [33] SIESS W. Molecular mechanism of platelet activation. *Physiol Rev* 1989; **69**: 58–178.
- [34] SIMON T, MAKHEJA A, BAYLEY J. The induces lipoxigenase in atherosclerotic aorta converts linoleic acid to platelet chemorepellant factor 13-HODE. *Thromb Res* 1989; **55**: 171–177.
- [35] SUN Y, ZHU B, SIEVERS R, ISENBERG W, PARMLEY W. Aspirin inhibits platelet activity but does not attenuate experimental atherosclerosis. *Am Heart J* 1993; **125**: 79–86.
- [36] TANG D, GROSSI I, CHEN Y, DIGLIO C, HONN K. 12{S}-HETE promotes tumor-cell adhesion by increasing surface expression of $\alpha_v\beta_3$ integrins on endothelial cells. *Int J Cancer* 1993; **54**: 102–111.
- [37] VANE J, FLOWER R, BOTTING R. History of aspirin and its mechanism of action. *Stroke* 1990; **21** suppl IV: 12–23.

Otrzymano: 21.07.1993 r.

Przyjęto: 20.02.1994 r.

Adres autorów: Katedra i Zakład Biochemii i Chemii, ŚIAM,
ul. Medyków 18, 40-752 Katowice

CZYNNIK POBUDZAJĄCY KOLONIE-1 (CSF-1) – WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIE KLINICZNE

COLONY STIMULATING FACTOR-1 (CSF-1)- PROPERTIES AND CLINICAL APPLICATION

Gabriel WCISŁO, Przemysław SZWECH

Zakład Immunologii Centralnego Szpitala Klinicznego Wojskowej Akademii Medycznej

Streszczenie: W pracy opisano budowę i wytwarzanie czynnika pobudzającego kolonie-1. Scharakteryzowano materiał genetyczny odpowiedzialny za produkcję mysiego CSF-1 oraz przedstawiono poglądy na temat materiału genetycznego dla ludzkiego CSF-1. Opiszano myszy z mutacją genu dla CSF-1. Omówiono budowę receptora dla CSF-1 oraz transdukcję sygnału po przyłączeniu CSF-1 do jego receptora. Przedstawiono wpływ CSF-1 na komórki układu krwiotwórczego i układu fagocytów jednojądrzastych oraz na transformację komórek. Opiszano również możliwości klinicznego zastosowania CSF-1 w leczeniu chorób nowotworowych, zakażeń grzybiczych, neutropenii i po przeszczepieniu szpiku.

Słowa kluczowe: CSF-1, receptor, krwiotwórczy czynnik wzrostu, układ fagocytów jednojądrzastych, kinaza tyrozynowa.

Summary: The structure and production of colony stimulating factor-1 were described in this article. Genetic material responsible for production of murine CSF-1 was characterized and point of view on the genetic material for human CSF-1 were presented. Mice with mutation in the gene for CSF-1 were described. The structure of CSF-1 receptor and signal transduction after binding CSF-1 to its receptor were talked over. The influence of CSF-1 on the cells of the hematopoietic and mononuclear phagocyte system and on the cell transformation were presented. The possibilities of clinical application of CSF-1 in the treatment of neoplastic diseases, fungal infections, neutropenia and after bone marrow transplantation were described.

Key words: CSF-1, receptor, hematopoietic growth factor, mononuclear phagocyte system, tyrosine kinase.

Wykaz skrótów: ADCC (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*) – cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał; bFGF R (ang. *basic Fibroblast Growth Factor Receptor*) – receptor dla zasadowego czynnika wzrostowego fibroblastów; *c-kit* R – receptor *c-kit*; CSF (ang. *Colony Stimulating Factor*) – czynnik pobudzający kolonie; CSF-1 (ang. *Colony Stimulating Factor-1*) – czynnik wzrostowy układu monocytowo-makrofagowego, inaczej M-CSF; CSF-1R (ang. *Colony Stimulating Factor-1 Receptor*) – receptor dla CSF-1; G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) – czynnik wzrostowy pobudzający wzrost kolonii granulocytowych; GM-CFC (ang. *Granulocyte-Macrophage Colony Forming Cell*) – komórka tworząca kolonie granulocytowo-makrofagowe; GM-CSF (ang. *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) – czynnik wzrostowy pobudzający wzrost kolonii

granulocytowo-makrofagowych; HGF (ang. *Hematopoietic Growth Factor*) – krwiotwórczy czynnik wzrostowy; IFN – interferon; IGF-1R (ang. *Insuline Like Growth Factor-1 Receptor*) – receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostowego-1; IL-1 – interleukina-1; IL-2 – interleukina-2; IL-3 – interleukina-3; LPS – lipopolisacharyd; PDGF (ang. *Platelet Derived Growth Factor*) – czynnik wzrostowy pochodzenia płytkowego; PGE₂ – prostaglandyna E₂; STK-1R (ang. *Stem Cell Tyrosine Kinase-1 Receptor*) – nowoopisany receptor o aktywności kinazy tyrozynowej występujący na ludzkich komórkach krwiotwórczych; TAM (ang. *Tumor Associated Macrophages*) – makrofagi związane z nowotworami; TNF (ang. *Tumor Necrosis Factor*) – czynnik martwicy nowotworów.

1. WSPÓŁCZESNE POGLĄDY NA TEMAT DZIAŁANIA HORMONÓW KRWIOTWORZENIA UKŁADU GRANULOCYTOWO-MAKROFAGOWEGO

Hormony krwiotworzenia, zwane także operacyjnie czynnikami pobudzającymi powstawanie i wzrost kolonii komórkowych (CSF) lub krwiotwórczymi czynnikami wzrostowymi (HGF), są odpowiedzialne za szereg funkcji fizjologicznych w organizmie i należą do tzw. cytokin, czyli białek hormonalnych, regulujących przeżycie, rozmnażanie i funkcje komórek. Pełne ich omówienie przekracza ramy tego opracowania, które będzie poświęcone tylko jednemu z nich, CSF-1 regulującemu głównie powstawanie i funkcję komórek układu makrofagowego. Oprócz niego obecnie znane są jeszcze inne czynniki wzrostowe linii granulocytarno-makrofagowej, tj. GM-CSF, multi-CSF, czyli IL-3 oraz pełniące rolę pomocniczą: IL-2, TNF, G-CSF i inne. Udało się uzyskać materiał genetyczny odpowiedzialny za ich syntezę oraz dzięki jego wprowadzeniu do bakterii uzyskuje się w stanie czystym poszczególne cytokiny, zwane rekombinowanymi, z zachowanymi funkcjami biologicznymi. Czynniki wzrostowe odgrywają ważną rolę nie tylko w powstawaniu komórek odpowiednich populacji, ale także są odpowiedzialne za:

- 1) przeżycie tych komórek w okresie rozwoju,
- 2) wyznaczenie kolejnych dróg różnicowania, np. CSF-1 jest odpowiedzialny za powstawanie makrofagów oraz
- 3) pobudzanie czynności dojrzałych komórek, np.: fagocytoza, produkcja wtórnych cytokin, np. IL-1 czy też innych czynników wzrostowych [23].

Czynniki wzrostowe realizują swoje funkcje biologiczne poprzez związanie się ze swoistymi receptorami obecnymi na powierzchni komórek efektorowych. Czynniki wzrostowe mogą osiągać receptory komórek docelowych drogą krwi (endokrynną), drogą dyfuzji od komórek wydzielających znajdujących się w pobliżu komórek docelowych (parakrynną) oraz autokrynnie, tj. dzięki wydzielaniu przez tą samą komórkę, która ma odpowiednie receptory. Na podstawie badań akumulacji czynników wzrostu w jądrach komórek docelowych sugeruje się istnienie mechanizmu intrakrynowego przekazywania informacji [13]. 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 [13]. Reakcja ta wywołuje kaskadę zmian, prowadzących do efektu biologicznego. Najczęściej proces ten odbywa się przez pobudzenie odpowiednich kinaz białkowych, które katalizują szereg odpowiednich reakcji biochemicznych [5, 23, 34, 41].

2. CHARAKTERYSTYKA CSF-1 – GENETYKA, STRUKTURA, WYTWARZANIE

Gen odpowiedzialny za produkcję mysiego CSF-1 ma długość 21 kb, składa się z 10 eksonów i znajduje się na chromosomie 3 [15]. Może on wytwarzać kilka rodzajów mRNA o różnej długości łańcucha: 1,6 kb, 2,0 kb, 2,3 kb i najbardziej rozpowszechniony 4,0 kb [15]. Wydaje się interesujące, że forma CSF-1, związana z błoną komórkową i jedynie złączająca się z niej do otoczenia, jest produkowana na matrycy mRNA o długości 1,6 kb, podczas gdy forma szybko wydzielana z komórki jest produkowana na matrycy mRNA o długości 4 kb. Transkrypty mRNA dla CSF-1 od 1,6 kb do 2,3 kb różnią się od 4 kb mRNA w regionach 3' nie ulegających translacji, ale kodują identyczny produkt białkowy.

Jedynym wyjątkiem jest transkrypt o długości 1,6 kb, pierwotnie zidentyfikowany i sklonowany z linii komórkowej raka trzustki. Koduje on przezbłonowe białko prekursorowe, złożone z 256 aminokwasów (CSF-1²⁵⁶). Ponieważ taki prekursor CSF-1 nie ma miejsc rozpoznających dla wewnątrzkomórkowych proteaz, które ma CSF-1⁵⁵⁴, to ostatecznie tworzy on błonową formę CSF-1 związaną z błoną komórkową, która zachowuje aktywność biologiczną. Chociaż w wielu komórkach produkujących CSF-1 nie znaleziono transkryptu 1,6 kb, jego identyfikacja i sposób przetwarzania sygnału sugerują, że CSF-1 działa nie tylko jako rozpuszczalny czynnik wzrostu, ale odgrywa rolę również w bezpośrednich interakcjach między komórkami [42]. Inaczej mówiąc, taki powierzchniowy czynnik wzrostu pobudza tylko te komórki, które znajdują się w bezpośredniej bliskości komórki wytwarzającej czynnik.

Badania biologicznej roli CSF-1 zostały znacznie ułatwione, przez odkrycie mutantu myszy pozbawionego tej cząsteczki.

Już w 1982 roku Wiktor-Jędrzejczak i wsp. opisali, że myszy z wrodzoną osteopetrozą (zaburzenie rozwoju kości i jam szpikowych) mają niedobór jakiegoś czynnika wzrostowego dla makrofagów. Następnie Yoshida i wsp. [48] zsekwencjonowali DNA komplementarny do *Csfm* z fibroblastów myszy *op/op* i odkryli wstawienie dodatkowej tymidyny w pozycji 262 w regionie kodującym genu *Csfm*, które decyduje o powstaniu kodonu zatrzymującego, znajdującego się 21 par zasad od początku tego regionu. Tak więc mutacja *op* znajduje się w obrębie regionu kodującego genu *Csfm*, blokuje wytwarzanie CSF-1 i jako taka jest znakomitym modelem do badania roli biologicznej CSF-1.

Gen dla ludzkiego CSF-1, zlokalizowany jest według niektórych badaczy na długim ramieniu chromosomu 5 w obrębie prążka 33.1 [42, 43]. Jest jednak mało prawdopodobne, aby gen czynnika o budowie dimeru znajdował się w obrębie tzw. grona genów dla czynników wzrostowych o budowie hemopoetycznej. Jest to tym bardziej mało prawdopodobne, że u myszy te geny znajdują się na różnych chromosomach i chociaż w procesie ewolucji zdarzają się translokacje, to prawdopodobieństwo, że geny tak powiązane czynnościowo w wyniku mutacji znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie jest bardzo małe.

Geny dla ludzkiego i mysiego CSF-1 wykazują ok. 82% homologii dla części kodujących rozpuszczalne czynniki [15].

Ludzki CSF-1, podobnie jak mysi, jest kodowany przez pojedynczy gen złożony z 10 eksonów zajmujących 21 kb. Gen ten podobnie koduje kilka rodzajów mRNA, odpowiedzialnych zarówno za postać wydzielniczą CSF-1, jak i związaną z błoną [43]. Każdy z rodzajów mRNA koduje przezbłonową glikoproteinę, która jest glikolizowana w trakcie translacji i

szybko ulega dimeryzacji przez tworzenie mostków dwusiarczkowych. Dłuższy prekursor CSF-1 zawierający 554 aminokwasy (CSF-1⁵⁵⁴) wiąże węglowodany podczas wewnątrzkomórkowego transportu. Następnie podlega wewnątrzkomórkowej proteolizie z wytworzeniem rozpuszczalnego homodimeru o masie cząsteczkowej 86000 daltonów, który jest szybko wydzielany z komórki. Krótszy prekursor zbudowany z 256 aminokwasów (CSF-1²⁵⁶) zawiera tylko część domeny aminokońcowej CSF-1⁵⁵⁴, jak również hydrofobowy segment obejmujący błonę. CSF-1²⁵⁶ jest transportowany jako związany z błoną homodimer do powierzchni komórki i może być uwalniany jako dimer o masie cząsteczkowej 44000 daltonów w drodze proteolizy eksternalizowanej cząsteczki. Jednak większość dimerowych prekursorów pozostaje związana z błoną komórkową [43].

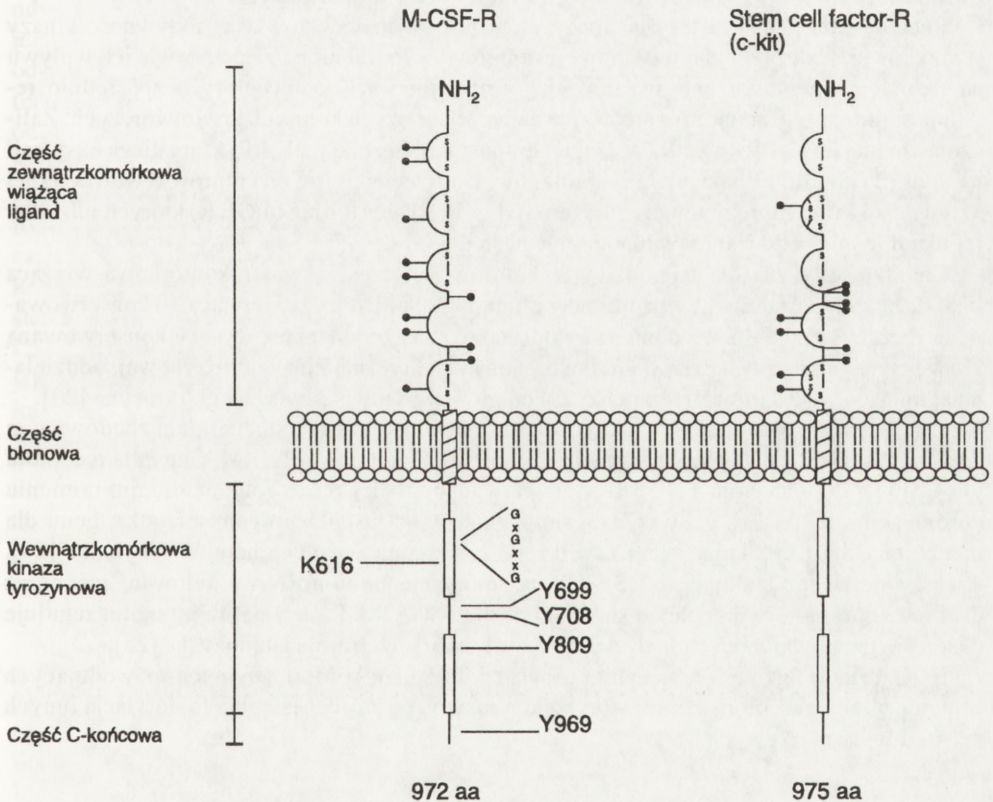
CSF-1 jest homodimerową glikoproteiną o masie cząsteczkowej od 45000 do 100000 daltonów [34, 41] lub 47000 do 76000 daltonów [47] lub 70000 do 90000 daltonów [3], lub 45000 do 90000 daltonów [43]. Tak szeroki zakres wartości masy cząsteczkowej wynika z różnej zawartości węglowodanów [11, 35, 42]. Część cukrowa nie jest konieczna dla aktywności biologicznej CSF-1, ale zabezpiecza jego cząsteczkę przed działaniem czynników denaturujących i proteaz [22] oraz wpływa na powinowactwo CSF-1 do substancji międzykomórkowej. Fakt ten decyduje w dużym stopniu o dystrybucji narządowej, jak i tropizmie tkankowym CSF-1 [37]. Sam łańcuch polipeptydowy ma masę cząsteczkową wynoszącą 14500 daltonów [47]. Dla aktywności biologicznej cząsteczki CSF-1 niezbędne są reszty aminokwasów od 1 do 158 [15]. Pierwszych 149 aminokwasów nie licząc 32 aminokwasów sekwencji sygnałowej jest trzonem strukturalnym dla polipeptydów CSF-1. Do każdego z powyższych polipeptydów jest dołączony fragment C-końcowy, składający się z 23 aminokwasów, tworzących region hydrofobowy oraz z 36 aminokwasów, tworzących tzw. ogon cytoplazmatyczny [9, 16, 35].

CSF-1 jest wytwarzany przez monocyty, makrofagi, fibroblasty, włączając w to komórki zrębu szpiku. Komórki śródbłonka naczyń wytwarzają mRNA dla CSF-1 po pobudzeniu IL-1 lub TNF [47].

Jedną z koncepcji regulacji proliferacji i różnicowania makrofagów uwzględnia hierarchiczne działanie czynników wzrostowych. Według niej najpierw działa IL-3, następnie GM-CSF i jako ostatni CSF-1 [17]. Choć wiele linii komórkowych fibroblastów w hodowlach tkankowych wytwarza CSF-1, to jego synteza może podlegać regulacji, przynajmniej częściowej przez inne surowicze czynniki wzrostowe, np. przez PDGF [42]. Spoczynkowe komórki NK nie wytwarzają CSF-1, natomiast komórki NK aktywowane IL-2, IFN α i β oraz przez niedawno opisany czynnik stymulujący komórki NK (NKSF), określane także jako interleukina 12, produkują CSF-1 [14]. CSF-1 jest produkowany w komórkach jajnika i macicy [27]. Zaobserwowano także, że endotoksyna może również wydatnie zwiększyć produkcję CSF-1. Dzięki tym badaniom wysunięto hipotezę o bardzo subtelnej regulacji produkcji CSF-1 [23, 34]. W regulacji tej mogłyby uczestniczyć prostaglandyny. Wykazano, że prostaglandyna PGE₂ hamuje preferencyjnie syntezę CSF-1 w monocytach, które uległy adhezji i to silniej niż w przypadku produkcji G-CSF i GM-CSF. Natomiast indometacyna będąca silnym inhibitorem cyklooksigenazy wydatnie hamuje syntezę między innymi PGE₂ i dlatego po jej zastosowaniu obserwuje się silną stymulację syntezy CSF-1, GM-CSF oraz G-CSF [34]. Monocyty produkują CSF-1 po stymulacji estrami forbolu, IFN γ , GM-CSF i TNF α [42], co sugeruje, że uwalnianie CSF-1 przez pobudzone makrofagi może nasilać ich własną proliferację w czasie odpowiedzi zapalnej lub w miejscach uszkodzenia tkanek. CSF-1 jest wytwarzany przez komórki T i B pobudzone poliklonalnie i przez komórki śródbłonka wystawione

na działanie IL-1, TNF lub LPS [42]. CSF-1 jest również produkowany przez nabłonek macicy, podczas ciąży jego poziom zwiększa się prawie 1000-krotnie i jest najwyższy podczas porodu [43]. Ekspresja CSF-1R na komórkach łożyskowego trofoblastu sugeruje, że podczas rozwoju CSF-1 działa jako łożyskowy czynnik wzrostu [42].

U normalnych myszy komórki Kupffera położone sinusoidalnie i makrofagi śledzionowe usuwają 90% krążącego CSF-1 przez internalizację za pośrednictwem receptora dla CSF-1 i następuje wewnątrzkomórkowe niszczenie CSF-1 [18]. Tak więc makrofagi, których produkcja jest regulowana przez CSF-1, odgrywają ważną rolę w regulacji stężenia CSF-1 w krążeniu.



Rys. 1. Rodzina receptorów mających wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej typu III [30]; receptor dla CSF-1 i receptor dla czynnika komórki macierzystej należą do rodziny receptorów mających wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej typu III; immunoglobulinowe domeny są pokazane jako pętle z zaznaczonymi wiązaniami dwusiarczkowymi (S-S-); zaznaczono te łańcuchy oligosacharydów związane z resztą asparaginy (O); wewnątrzkomórkowa domena kinazy jest przerwana przez wstawkę kinazy; miejsca fosforylacji tyrozyny (Y) są opisane; miejsce wiążące ATP jest przedstawione (K616), jak również typowa dla kinaz sekwencja bogata w glicynę (GXGXXG)

3. RECEPTOR

Wzrost i różnicowanie komórek krwiotwórczych są regulowane przez czynniki wzrostu (ligandy), przyłączające się do swoistych receptorów na powierzchni komórek docelowych. Receptor dla CSF-1, przedstawiony na rysunku 1, jest identyczny z produktem protoonkogenu *c-fms*. Cząsteczka ta była pierwotnie zidentyfikowana jako produkt onkogenu wirusa mięsaka kotów odmiany McDonough [15]. Później analiza struktury dostarczyła dowodów, że ta cząsteczka jest podobna do znanych receptorów czynników wzrostowych. Dotychczas stwierdzono, że u dorosłych ssaków ulega ona ekspresji tylko na dojrzałych komórkach linii fagocytów jednojądrzastych [15] i ich ukierunkowanych prekursorach w szpiku [43]. Podczas różnicowania fagocytów jednojądrzastych liczba receptorów dla CSF-1 zwiększa się tak, że dojrzałe monocyty i makrofagi wykazują ekspresję największej liczby receptorów przypadających na jedną komórkę [43]. Obecność receptora dla CSF-1 stwierdzono poza tym na trofoblastie i łożysku oraz na związanych z nimi liniach komórkowych.

Receptor dla CSF-1 należy do rodziny receptorów mających własną aktywność kinazy tyrozynowej. Należą do niej trzy grupy receptorów, wyodrębnione na podstawie ich wpływu na regulację krwiotworzenia u człowieka. Grupa pierwsza to receptory bezpośrednio regulujące m.in. proliferację i różnicowanie najwcześniejszych komórek krwiotwórczych. Zaliczono do niej STK-1 R i *c-kit* R. W drugiej grupie umieszczono CSF-1 R, który ulega ekspresji na komórkach linii monocytów i makrofagów. Do trzeciej grupy receptorów o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej zaliczono IGF-1 R, PDGF R oraz bFGF R, których udział w regulacji hemopoezy jest prawdopodobnie pośredni [25].

Charakterystyczna dla tej rodziny receptorów jest część zewnątrzkomórkowa wiążąca ligand, zawierająca domeny z nadrodziny immunoglobulin oraz zawierająca 10 konserwowanych reszt cysteiny, a także domena cytoplazmatyczna, zawierająca wysoce konserwowaną kinazę tyrozynową z wstawką w środku domeny katalitycznej kinazy tyrozynowej, oddzielając miejsce wiążące ATP (reszta lizyny) od głównego miejsca wiążącego tyrozinę [29].

Łańcuch receptora dla CSF-1 sklonowano i okazało się, że jest on białkiem zbudowanym z 972 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 150000 daltonów [29, 44]. Geny dla receptora dla CSF-1 i dla receptora PDGF-B są najprawdopodobniej zestawione na długim ramieniu chromosomu 5. Te dwa geny wydają się pochodzić od wspólnego genu przodka, genu dla receptora *c-kit* [25], który uległ duplikacji, a następnie ewolucyjnemu odchyleniu [29]. Transkrypcja genu kodującego CSF-1 R na komplementarny mRNA regulowana jest przez dwa różne promotory odległe od siebie o blisko 26 kb [38]. Proksymalny promotor reguluje ekspresję genu w monocytach, dystalny zaś w komórkach trofoblastu łożyska [25].

Przyłączenie ligandu do receptora prowadzi do zmian konformacyjnych, powodujących oligomeryzację receptora i autofosforylację tyrozyny, po której następuje fosforylacja innych substratów komórkowych [29].

4. TRANSDUKCJA SYGNAŁU

Zmiany biochemiczne następujące po przyłączeniu ligandu do receptora prowadzą do transdukcji sygnału do jądra komórkowego. 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. Obecnie wiadomo, że czynniki wzrostu są pobierane przez komórki w drodze endocytozy [13]. CSF-1 przyłączając się do receptora aktywuje jego kinazę i wywołuje szereg zmian biochemicznych, indukujących proliferację komórki. Początkowe zmiany polegają na fosforylacji heterologicznych substratów białkowych na reszcie tyrozyny, z których przynajmniej część musi funkcjonować jako przekaźniki sygnału zmieniającego transkrypcję genów odpowiadających na CSF-1. Zmiany biochemiczne, wiążące fosforylację fizjologicznych substratów z aktywacją genów pozostają nieznanne, ale muszą obejmować udział jądrowych czynników transkrypcyjnych, modulowanych w odpowiedzi na stymulację CSF-1.

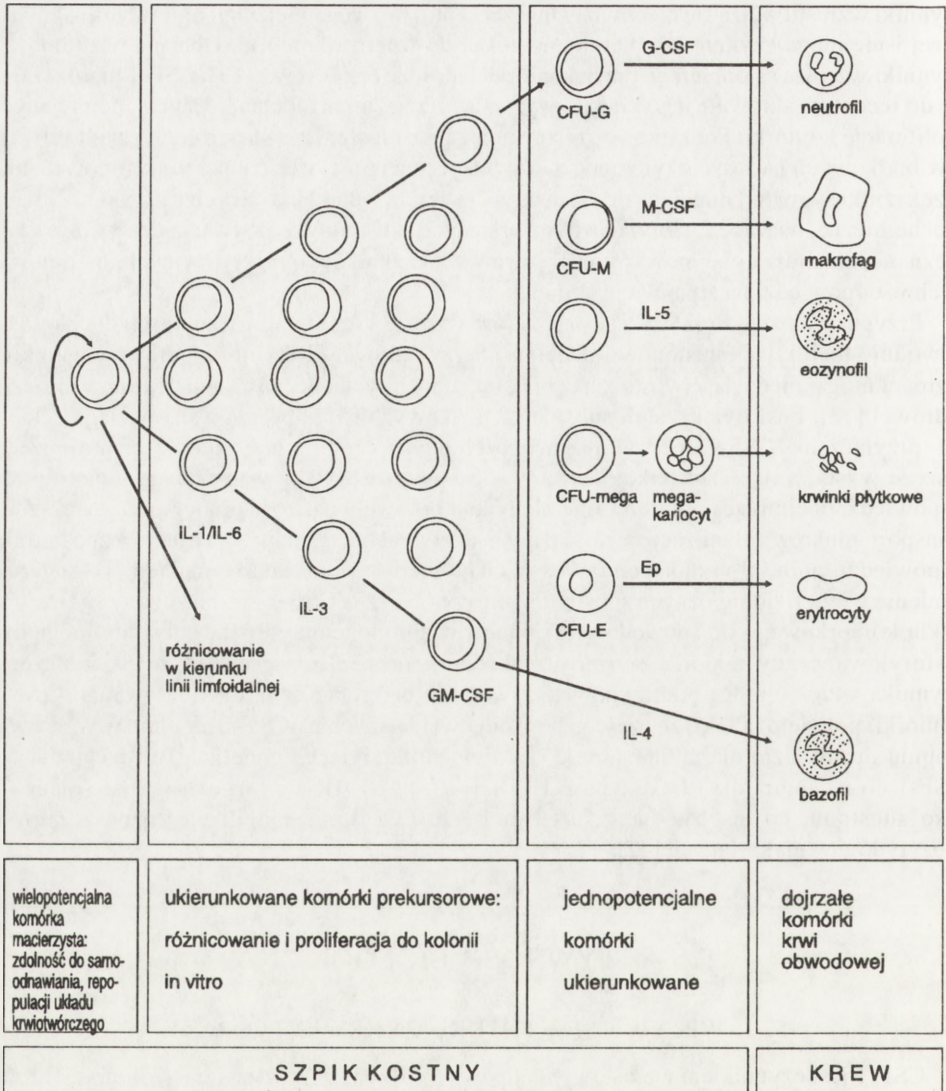
Przypuszcza się, że interakcja czynników wzrostu z chromatyną komórek docelowych powoduje fosforylację histonów i białek macierzy jądrowej. Receptory jądrowe czynników wzrostu mogą mieć właściwości kinaz białkowych, których obecność stwierdzono w otocze jądrowej [13]. Fosforylacja serii substratów białkowych była obserwowana w ciągu sekund od przyłączenia CSF-1 do komórek mających jego receptor, choć żaden z nich nie został jeszcze wystarczająco scharakteryzowany. CSF-1 może wywoływać szybko, plejotropową odpowiedź, obejmującą pofałdowanie błony komórkowej i nasiloną pinocytozę, zwiększony transport glukozy, alkalizację cytoplazmy i uaktywnianie genów wczesnej bezpośredniej odpowiedzi, m.in. protoonkogenu *c-fos* w ciągu pierwszych minut stymulacji. To sugeruje istnienie wielu fizjologicznych substratów kinazy CSF-1R. CSF-1 jest niezbędny w fazie G1 cyklu komórkowego do spowodowania odpowiedzi mitogennej. Różne substraty mogą być fosforylowane, gdy komórka zacznie przechodzić w fazę S. Co więcej fakt, że niskie stężenia czynnika wzrostu mogą podtrzymywać żywotność makrofagów bez stymulowania wzrostu komórki, potwierdza fakt, że część genów odpowiadających na CSF-1 reguluje w większym stopniu metabolizm niż mitogenezę [37]. Mimo strukturalnego podobieństwa receptora dla CSF-1 do receptora dla PDGF typu B (PDGF-R_B) CSF-1R nie rozpoznaje fosfolipazy C_γ jako substratu, co jest zgodne z obserwacją, że CSF-1 nie mobilizuje rozpuszczalnych inozytydów w makrofagach [42].

5. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

5. 1. WPŁYW CSF-1 NA UKŁAD KRWIOTWÓRCZY

CSF-1 jest czynnikiem wzrostowym odpowiedzialnym za powstawanie kolonii makrofagalnych *in vitro*. Stąd jego inna nazwa: M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*). Udział CSF-1 w procesie krwiotworzenia przedstawia rysunek 2. W odróżnieniu od innych czynników pobudzających tworzenie kolonii i interleukin, CSF-1 jest obecny w znaczących ilościach w surowicy. Jego stężenie jest regulowane przez wychwytywanie i degradację przez krążące monocyty i tkankowe makrofagi.

Przeprowadzone przez Bota i wsp. [1] badania wskazują, że CSF-1 wraz z IL-6 wpływa na szybkie pojawianie się i wzrost kolonii makrofagalnych *in vitro*. Sama IL-6 lub w kombinacji z innymi cytokinami, takimi jak: erytropoetyna (EPO), IL-3, GM-CSF i G-CSF nie powodowała pojawiania się kolonii makrofagalnych.



Rys. 2. Schemat krwiotworzenia z udziałem CSF-1 (M-CSF) [8]

Dojrzałe mysie makrofagi reagują na CSF-1 [47]. CSF-1 wpływa również na krwiotwórcze komórki macierzyste, wykazujące ekspresję antygenu CD34. Wykazano, że komórki ukierunkowane bardziej prymitywne niż GM-CFC reagują na CSF-1. Te komórki tworzące kolonie o wysokim potencjale proliferacyjnym wymagają zarówno obecności czynnika synergistycznego, jak i CSF-1 do utworzenia dużych kolonii zawierających makrofagi [47]. Jednym z czynników synergistycznych okazała się IL-1.

Ludzki CSF-1 jest również zdolny do pobudzania tworzenia mysich kolonii makrofagalnych i wykazuje silniejsze oddziaływanie w stosunku do mysich komórek niż do ludzkich komórek prekursorowych.

Egeland i wsp. [6] badali zachowanie się komórek CD34⁺ izolowanych ze szpiku lub krwi pępowinowej zdrowych dawców w hodowli płynnej *in vitro* po dodaniu takich czynników, jak: IL-3, GM-CSF, G-CSF, CSF-1. Następnie oceniano fenotyp typowy dla markerów powierzchni komórek linii mieloidalnej oraz komórek związanych z tą linią. Wykazali oni, że IL-3 sama lub razem z GM-CSF, G-CSF lub CSF-1 powoduje przeciętnie 50-krotne zwiększenie liczby komórek, GM-CSF 5- do 10-krotne, a G-CSF i CSF-1 mniej niż 5-krotne. Komórki pobudzane w hodowli GM-CSF, G-CSF lub CSF-1 zawierają komórki o szerokim profilu znaczników linii mieloidalnej, szerszym niż obserwowane w hodowli z IL-3. Obecność innych czynników pobudzających kolonie z IL-3 nie wpływała na zmiany wywołane w komórkach przez IL-3. Obecność samej IL-3 umożliwiała utrzymywanie wysokiego odsetka komórek CD34⁺ przez dwutygodniowy okres obserwacji, podczas gdy hodowla z GM-CSF, G-CSF lub CSF-1 pozwalała na utrzymanie kilkakrotnie mniejszej liczby komórek CD34⁺.

U normalnych myszy nie wykazano wpływu CSF-1 na liczbę komórek krwi obwodowej, natomiast wykazano minimalny wpływ na liczbę krwiotwórczych komórek ukierunkowanych [47]. Wlewy CSF-1 u myszy leczonych uprzednio cyklofosfamidem powodowały zwiększenie liczby komórek tworzących wczesne kolonie erytroidalne, multipotencjalne i granulocytarno—makrofagowe w śledzionie. Przeprowadzono dotychczas niewiele badań, wykazujących wpływ CSF-1 na liczbę komórek krwi obwodowej i krwiotworzenie u ssaków. Motoyoshi i wsp. wykazali niewielkie zwiększenie liczby neutrofilów, bez towarzyszącego zwiększenia liczby monocytów, krwinek płytkowych u pacjentów z różnymi nowotworami złośliwymi, którzy otrzymywali chemioterapię.

5.2. WPŁYW CSF-1 NA KOMÓRKI FAGOCYTÓW JEDNOJĄDRZASTYCH

Makrofagi pochodzące z różnych tkanek reagują na CSF-1 przeżyciem, ograniczoną proliferacją i nasileniem aktywności czynnościowej, np. zwiększoną aktywnością komórko-bójczą, produkcją cytokin, prostaglandyny E, aktywatora plazminogenu czy też rodników tlenowych [3]. Różne rodzaje odpowiedzi monocytów i makrofagów na CSF-1 przedstawia tabela 1. Krążące monocyty, makrofagi otrzewnowe, makrofagi pochodzące z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych i makrofagi wątrobowe proliferują w odpowiedzi na CSF-1, chociaż niektóre makrofagi obecne w tych tkankach nabyły cechy proliferacyjnego "starzenia się". Komórki post-mitotyczne mogą przejawiać nasiloną aktywność czynnościową w obecności CSF-1 [47]. Niektóre mysie linie komórkowe wymagają również CSF-1 do przeżycia i/lub proliferacji. Należą do nich: nowotworowa linia komórkowa makrofagów J774 i mysia linia komórkowa makrofagów BAC1.2F5 transformowana wirusem SV40. Prostaglandyny E, np. PGE₂ zwiększają wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP. Prostaglandyna ta jest prawdopodobnie najistotniejszym mediatorem hamującym aktywność komórek NK. U niektórych chorych z nowotworem stwierdzono większą w porównaniu do osób zdrowych zdolność wydzielania PGE₂ przez jednojądrzaste komórki żerne. Być może jest to jedna z przyczyn stwierdzanej u tych chorych obniżonej odporności, w tym również aktywności NK [14]. Wykazano także, że produkcja IFN, TNF i GM-CSF ulega zwiększeniu, gdy monocyty znajdują się pod wpływem CSF-1. Ta produkcja cytokin może odgrywać rolę w oporności na infekcje wirusowe, indukowanej przez CSF-1 [47].

TABELA 1. Odpowiedź monocytów i makrofagów na CSF-1 [36]

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Wytwarzanie cytokin (IFNs, TNF α , G-CSF, IL-1) |
| Wytwarzanie aktywatora plazminogenu, ferrytyny, anionu nadtlenkowego, kwaśnej fosfatazy |
| Nasilanie aktywności przeciwwirusowej i przeciwbakteryjnej |
| Indukowanie aktywności przeciwnowotworowej i chemotaksji |
| Oslabianie odpowiedzi komórek T na mitogeny |
| Indukowanie replikacji HIV |

W badaniach nad CSF-1 bardzo ważną rolę odegrały dwa fakty:

1) ustalenie fibroblastoidalnej linii komórkowej L929, która produkuje duże ilości CSF-1 oraz

2) odkrycie myszy *op/op* (*op* od *osteopetrosis* – choroby marmurkowej kości z zarastaniem ich jam szpikowych) z całkowitym brakiem tej cytokiny [14, 17, 18]. Brak CSF-1 u myszy *op/op* jest wynikiem mutacji punktowej genu umiejscowionego na chromosomie 3 [48]. Myszy *op/op* mają tylko ok. 5% normalnej liczby makrofagów oraz ok. 30% normalnej liczby limfocytów zawartych w jamie otrzewnowej i opłucnowej [15, 17]. Ten defekt genetyczny objawiający się osteopetrozą sugeruje, że CSF-1 odgrywa ważną rolę w powstawaniu osteoklastów [15].

Badania tych myszy wykazały, że brak CSF-1 w różnym stopniu dotyczy poszczególnych stadiów różnicowania makrofagów i populacji makrofagów pochodzących z różnych narządów oraz że sprawne czynnościowo makrofagi są wytwarzane w małych ilościach bez CSF-1, najprawdopodobniej pod wpływem GM-CSF i IL-3. Mniej niż 10% monocytów i makrofagów stwierdzono w jamie opłucnowej i otrzewnowej, popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych, jak również w jajnikach, macicy i skórze. W wątrobie, śledzionie, grasicy, w mniejszym stopniu w płucach, niedobór makrofagów był umiarkowany i wynosił między 10% a 50%.

Myszy *op/op* cechuje podwyższony poziom zarówno endogennego GM-CSF, jak i IL-3, które nie są w pełni zdolne do skompensowania braku CSF-1. Niedobór makrofagów, ale nie osteoklastów u tych myszy, mógł być całkowicie skorygowany przez egzogenny GM-CSF, podczas gdy egzogenny CSF-1 korygował niedobór makrofagów i osteoklastów, ale tylko w tych tkankach, które mogły być dostępne dla CSF-1 pochodzącego z krążenia [16]. Mimo ciężkiego niedoboru ilościowego makrofagów, myszy *op/op* wykazują normalną fagocytozę *in vivo* i funkcje obronne, sugerując, że CSF-1-zależne makrofagi nie przyczyniają się znacząco do tych procesów *in vivo*. Z drugiej strony myszy te wykazują ciężkie wtórne niedobory TNF α , IL-1 α i G-CSF, sugerując, że główną funkcją makrofagów CSF-1-zależnych jest uwalnianie monokin [16].

We współczesnej onkologii stosuje się cytokiny jako leki przeciwnowotworowe. Schaffema i wsp. [40] podawali ludziom rekombinowaną IL-2 we wlewach dożylnych, a następnie oceniali zawartość czynników wzrostowych w surowicy krwi. Wśród poszukiwanych cytokin znajdował się m.in. CSF-1, którego stężenie oceniano metodą radioimmunologiczną. O ile wykryte cytokiny, takie jak: GM-CSF, IL-5, IL-3, były odpowiedzialne za efekt kliniczny w postaci zwiększenia liczby neutrofilii, to CSF-1 nie spowodował zwiększenia liczby monocytów w badanych próbkach surowicy krwi. Obecność CSF-1 wykazano pośrednio poprzez wykrycie odpowiedniego mRNA stosując metodę Northern blotting.

CSF-1 jest hormonem krwiotworzenia, ale wykazano także jego rolę ogólnobiologiczną. Zaobserwowano, że cytokina ta jest odpowiedzialna za prawidłowy rozwój łożyska w macicy ciężarnych myszy [14, 31, 34]. Podczas ciąży dochodzi do 10000-krotnego zwiększenia zawartości CSF-1 w macicy [40], wg [48] tylko 1000-krotnego. To zwiększenie stężenia jest raczej wynikiem intensywnych procesów lokalnej syntezy niż gromadzenia. Samice myszy *op/op* mogą zachodzić w ciążę i rodzić potomstwo. Obserwacja ta wydaje się zaprzeczać wnioskowi z wcześniejszych badań, które wykazywały 1000-krotne zwiększenie produkcji macicznego CSF-1 w czasie ciąży i obecność receptora dla CSF-1 na komórkach trofoblastu poza makrofagami [15]. Późniejsze badania sugerowały decydującą i swoistą rolę CSF-1 w rozwoju łożyska. Początkowo wyjaśniano to w ten sposób, że transkrypt genu dla CSF-1 o długości 2,3 kb, który jest częściowo swoisty dla produkcji CSF-1 w macicy, dzięki zjawisku alternatywnego składania genów, omija blok wywołany przez mutację *op* i umożliwia miejscową produkcję białka. Udowodniono, że nie jest to prawda i u myszy *op/op* CSF-1 nie jest dostępny również w macicy. Posługując się technikami biologii molekularnej (*Northern blotting*) wykazano obecność mRNA o długości 2,3 kb w 91% i o długości 4,6 kb w 9% w ciężarnej macicy, a odpowiedzialnych za syntezę CSF-1. Odwrotna proporcja występowania mRNA dla CSF-1 jest spotykana w fibroblastach i makrofagach [31].

Jednak myszy *op/op* są ciężko upośledzone, zarówno co do liczby ciąży, liczby potomstwa, jak i co do zdolności jego karmienia. Jest to zgodne z przewidywaniami, według których CSF-1 rzeczywiście odgrywa ważną rolę w rozwoju łożyska, ale podobnie jak w przypadku wytwarzania makrofagów, jego funkcje mogą zastępczo pełnić inne czynniki wzrostowe. Wydaje się interesujące, że podanie egzogenego CSF-1 nie koryguje jego niedoboru, co sugeruje, że ta funkcja CSF-1 podlega lokalnym mechanizmom kontrolnym, a nie jest kontrolowana przez układowy poziom CSF-1 [15].

CSF-1 jako substancja hormonalna i wykazująca działanie ogólne wpływa na gospodarkę cholesterolem. Garwick i wsp. [10] podawali rekombinowany CSF-1 myszom NZW oraz królikom WHHL (*Wanatabe Heritable Hyperlipidemic*) uzyskując zmniejszenie stężenia cholesterolu w surowicy krwi badanych zwierząt. To sugerowało bezpośrednią lub pośrednią rolę CSF-1 w regulowaniu metabolizmu lipidów.

Myszy *op/op* cechuje znaczny niedobór wagi ciała u obu płci przez całe życie. Po ustaleniu roli CSF-1 w patogenezie osteopetrozy u myszy, stało się jasne, że cząsteczka ta bezpośrednio lub pośrednio reguluje procesy wzrostu. Prawdopodobnie odbywa się to przez oddziaływanie CSF-1 na różne procesy metaboliczne. Po podaniu rekombinowanego CSF-1 tym myszom obserwowano zwiększenie wagi ciała, natomiast u normalnych myszy po podaniu podobnych dawek CSF-1 dochodziło do zmniejszenia wagi ciała [15]. To odkrycie przemawia za tym, że CSF-1 należy do grupy hormonów regulujących wzrost organizmu, tak jak somatotropina czy insulina.

Jednak nie stwierdzono dotychczas odpowiedniego rodzaju ekspresji receptora CSF-1, wyjaśniającego bezpośrednio oddziaływanie CSF-1 na wzrost organizmu. Wyciągnięto stąd wniosek o nadrzędnej roli CSF-1 w stosunku do substancji wywierających efekty bezpośrednio [15].

Monocyty inkubowane z rhM-CSF wykazywały wyraźny wzrost aktywności typu ADCC oraz produkowały większe ilości TNF α [10]. Te właściwości pobudzanych makrofagów oraz ich obecność w jamie otrzewnowej, jamie opłucnowej [15, 17], mięśniach [12] i innych miejscach w organizmie stwarzają nowe możliwości zwalczania nowotworów.

6. CSF-1 A TRANSFORMACJA KOMÓREK

Rola cytokin w rozwoju chorób nowotworowych nie jest dokładnie poznana. Istnieją sugestie, że niektóre cytokiny, np.: GM-CSF oraz IL-6, są czynnikami wzrostowymi komórek białaczkowych [11]. Część ludzkich komórek białaczkowych zawiera różne rodzaje mRNA odpowiedzialnego za syntezę CSF-1. Receptor dla CSF-1 jest kodowany przez protoonkogen *c-fms*, który jest obecny w prawidłowych makrofagach oraz w komórkach rozwijającego się łożyska i ciężarnej macicy. W wyniku nadmiernej ekspresji receptora dla CSF-1 (CSF-1R) oraz syntezy cząsteczek odpowiedniego ligandu, tj. CSF-1, może dojść do autokrynej stymulacji komórek białaczkowych [31]. W przypadku ostrej białaczki szpikowej CSF-1 dodawany do hodowli jej komórek hamował ich wzrost, w przeciwieństwie do innych cytokin, takich jak: G-CSF, GM-CSF czy IL-3 [34].

Obok sugestii, że CSF-1 odgrywa rolę głównie w rozwoju oraz podtrzymywaniu funkcji makrofagów i komórek trofoblastu, poszukiwano innych docelowych komórek wrażliwych na tę cytokinę. Badania prowadzono wykorzystując technikę hybrydyzacji *in situ*, która pozwala wykryć komplementarny DNA odpowiedzialny za syntezę CSF-1 w skrawkach preparatów histopatologicznych. Drugą grupę metod stosowanych w wykrywaniu ludzkiego CSF-1 w preparatach histopatologicznych są techniki immunochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych.

Kacinski i wsp. [19, 21] wykazali obecność CSF-1 oraz receptora dla tej cytokiny na komórkach raka gruczołowego jajnika. Ponadto ta grupa badawcza wykazała dodatnią korelację między ekspresją protoonkogenu *c-fms* na komórkach raka jajnika a klasyfikacją histologiczną oraz inwazyjnością kliniczną tego nowotworu. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach nad nowotworami endometrium macicy. Oznaczanie CSF-1 i CSF-1R jako znacznika złośliwości biologicznej raka gruczołowego jajnika i nowotworów endometrium może pozwolić na precyzyjne różnicowanie łagodnego rozrostu torbielowatego i przerostu atypowego od raka gruczołowego [21].

Posługując się metodą stosowaną w badaniu raka jajnika rozpoczęto prace nad rakiem sutka u kobiet. Wykonane obserwacje pozwoliły wykryć ekspresję *c-fms* oraz CSF-1 w 1/3 przypadków inwazyjnego raka sutka. Wysokie stężenie CSF-1 zawartego w surowicy krwi wykazuje ścisłą korelację z pojawieniem się ognisk przerzutowych w przebiegu raka sutka [20].

7. ZASTOSOWANIE KLINICZNE

Obecnie są prowadzone próby kliniczne z zastosowaniem preparatów CSF-1 w walce z nowotworami złośliwymi, groźnymi dla życia infekcjami, zwłaszcza grzybiczymi oraz w przypadku granulocytopenii po chemio- i/lub radioterapii.

Po leczeniu operacyjnym nowotworów często występują wznovy miejscowe i przerzuty odległe, które wymagają stosowania uzupełniających metod leczenia, takich jak chemio- i radioterapia. Metody te nie zawsze są skuteczne. Są one powodem coraz częstszych prób pobudzania własnego układu odpornościowego, czyli immunoterapii. Jedną z komórek efektorowych immunoterapii jest makrofag. Wykazano, że guzy nowotworowe nacieczone makro-

fagami rozwijają się wolniej. W nowotworach u ludzi makrofagi mogą stanowić 30 do 60% komórek guza [28]. Są one nazywane makrofagami związanymi z guzami nowotworowymi (TAM) [29]. Uważa się, że makrofagi liczniej występują w zaawansowanych nowotworach, natomiast w przerzutach nowotworowych liczba TAM jest większa niż w guzach pierwotnych. Rola TAM w regulacji wzrostu nowotworów może być wytłumaczona jako balansowanie między czynnościami promującymi (uwalnianie czynników wzrostu, tworzenie naczyń) a aktywnością hamującą. Końcowy wynik reakcji zależy od liczby monocytów znajdujących się *in situ*, ich stanu czynnościowego oraz charakterystycznych cech komórek nowotworowych [29].

RhM-CSF był stosowany w dawce 50–100 µg/kg i dobę jako lek przeciwnowotworowy u pacjentów z czerniakiem złośliwym. Doprowadziło to do zwiększenia liczby monocytów we krwi obwodowej. Jednocześnie obserwowano objaw uboczny w postaci zmniejszenia liczby krwinek płytkowych, nawet do wartości 70000/mm³ [10, 33]. Stosowanie CSF-1 u chorych po przeszczepieniu szpiku nie skracało znacząco okresu, w którym obserwowano zmniejszoną liczbę granulocytów (do 100/mm³) we krwi obwodowej [10].

Pod koniec lat osiemdziesiątych zastosowano czynnik wzrostowy otrzymany z ludzkiego moczu (CSF-HU – *Colony-Stimulating Factor-Human Urine*) u ludzi po przeszczepieniu allogenicznego szpiku. Czynnik ten wykazuje strukturalne podobieństwo do CSF-1 w zakresie sekwencji aminokwasowej jednostek monomerycznych. Wyniki tej próby klinicznej wykazały nieznaczne skrócenie okresu granulocytopenicznego do ok. 22 dni (w grupie chorych otrzymujących CSF-HU) w porównaniu z grupą kontrolną (bez CSF-HU), w której okres ten wynosi ok. 28 dni. Jednocześnie nie obserwowano powrotu do prawidłowej liczby krwinek płytkowych we krwi obwodowej [11].

Nemunaitis i wsp. [27] stosowali rhM-CSF w postaci dwugodzinnych wlewów dożylnych w dawce od 100 do 2000 µg/kg i dobę u 16 chorych z infekcjami grzybiczymi w przebiegu ostrej białaczki szpikowej i u chorych po przeszczepieniu szpiku. Przed próbą wszyscy badani zostali poddani szczegółowej diagnostyce histopatologicznej, mykologicznej i radiologicznej w kierunku grzybicy. W badanej grupie najczęściej występowały grzyby z rodzaju *Candida* i *Aspergillus*. 13 chorych otrzymywało rhM-CSF przez 30 dni i nie zaobserwowano zwiększenia liczby komórek mieloidalnych we krwi obwodowej. U trzech pacjentów, którzy nie mogli być poddani przeszczepieniu szpiku, a byli leczeni bezskutecznie wysokimi dawkami amfoterycyny (powyżej 3,2 g) z powodu przewlekłej infekcji grzybiczej, uzyskano ustąpienie objawów tego zakażenia po zastosowaniu rhM-CSF.

Użycie oczyszczonego ludzkiego CSF-1, pochodzącego z moczu, u dzieci z przewlekłą neutropenią okresu dzieciństwa i u chorych otrzymujących cytotoksyczną chemioterapię, powodowało zwiększenie liczby neutrofilii, ale również objawy niepożądane w postaci gorączki i dreszczy [2].

8. ZAKOŃCZENIE

Przedstawiona w tej pracy cytokina budzi nadzieje, szczególnie w zakresie walki z chorobami nowotworowymi oraz infekcjami, zwłaszcza uogólnionymi grzybiczymi, opornymi na leczenie konwencjonalne. Jednocześnie wysokie koszty uzyskiwania rekombinowanych czynników wzrostowych i objawy niepożądane po ich stosowaniu zmuszają lekarza dysponu-

jącego nimi do rozważenia, czy w danym przypadku leukopenii związanej z leczeniem mielosupresyjnym rzeczywiście zachodzi konieczność ich stosowania, czy zostały wyczerpane inne sposoby pobudzania proliferacji określonych komórek ukierunkowanych w szpiku.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BOT FJ, VAN EIJK L, BROEDERS L, AARDEN LA, LOWENBERG B. Interleukin-6 synergises with M-CSF in the formation of macrophage colonies from purified human marrow progenitor cells. *Blood* 1989; **73**: 435–437.
- [2] BRITO-BABAPULE F. Therapeutic applications of the myeloid haemopoietic growth factors. *Transfus Sci* 1991; **12**: 25–33.
- [3] BRUGGER W, ROSENTHAL FM, KANZ L, MERTELSMANN R. Clinical role of colony stimulating factors. *Acta Haematol* 1991; **86**: 138–147.
- [4] CROSIER PS, CLARK SC. Basic biology of the hematopoietic growth factors. *Semin Oncol* 1992; **19**: 349–361.
- [5] DOWNING JR, ROUSSEL MF, SHURTLEFF SA, SHERR CJ. Tyrosine phosphorylation of the CSF-1 receptor (fms) is required for its efficient coupling to downstream effects involved in mitogenesis. *Blood* 1990; **76**, supp. 1: 140A.
- [6] EGELAND T, STEEN R, QUARSTEN H, GAUDERNACK G, YANG Y-CH, THORSBY E. Myeloid differentiation of purified CD 34⁺ cells after stimulation with recombinant human granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (CSF), granulocyte-CSF, monocyte-CSF, and interleukin-3. *Blood* 1991; **78**: 3192–3199.
- [7] EVERSON MP, BROWN CB, LILLY MB. Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor are candidate growth factors for chronic myelomonocytic leukemia cells. *Blood* 1989; **74**: 1472–1476.
- [8] FAGG B. Haematopoietic growth factors. *Triangle* 1989; **28**: 97–108.
- [9] FALKENBURG JHF, DE PAUS RA, LAUDEGENT JE, FIBBE WE, WILLEMZE R, BROXMEYER HE, HARRINGTON MA. Differential regulation of gene expression of CSF-1, G-CSF, GM-CSF in fibroblasts by IL-1 and FBS. *Blood* 1990; **76**, supp 1: 142A.
- [10] GARNICK MB. Preclinical and clinical evaluation of recombinant human macrophage colony-stimulating factor (rhM-CSF). *Inter J Cell Cloning* 1990; **8**: 356–373.
- [11] GOLDSTONE AH, KHWAJA A. The role of growth factors in bone marrow transplantation. *Leuk Res* 1990; **14**: 721–729.
- [12] HONDA H, KIMURA H, ROSTAMI A. Demonstration and phenotypic characterization of resident macrophages in rat skeletal muscle. *Immunology* 1990; **70**: 272–277.
- [13] JAGODZINSKI PP, TRZECIAK WH. Akumulacja czynników wzrostu w jądrach komórek docelowych. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 447–455.
- [14] JAKÓBISIAK M. Immunologia. Warszawa, PWN 1993: 259–260.
- [15] JĘDRZEJCZAK WW. Colony Stimulating Factor 1 (CSF-1) and its in vivo role as delineated using osteopetrotic *op/op* mice. *Post Bioch* 1991; **37**: 54–57.
- [16] JĘDRZEJCZAK WW. In vivo role of macrophage growth factors as delineated using CSF-1 deficient *op/op* mouse. *Leukemia* 1993; **3**: 117–121.
- [17] JĘDRZEJCZAK WW. Regulacja komórek jamy otrzewnowej. *Pol J Immunol* 1992; **17**: 85–90.
- [18] JĘDRZEJCZAK WW, BARTOCCI A, FERRANTE AW, AHMED-ANSARI A JR, SELL KW, POLLARD JW, STANLEY ER. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (*op/op*) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4828–4832.
- [19] KACINSKI BM, CARTER D, MITTAL K, YEE LD, SCATA KA, DONOFRIO L, CHAMBERS SH, WANG K-I, YANG-FENG T, ROHRSCHEIDER LR, ROTHWELL VM. Ovarian adenocarcinomas express fms – complementary transcripts and fms antigen, often with coexpression of CSF-1. *Am J Path* 1990; **137**: 135–147.
- [20] KACINSKI BM, SCATA KA, CARTER D, YEE LD, SAPI E, KING BL, CHAMBERS SK, JONES MA, PIRRO MH, STANLEY ER, ROHRSCHEIDER LR. FMS (CSF-1 receptor) and CSF-1 transcripts and proteins are expressed by human breast carcinomas in vivo and in vitro. *Oncogene* 1991; **6**: 941–952.
- [21] KACINSKI BM, CARTER D, MITTAL K, KOHORN EI, BLOODGOOD S, DONAHUE J, DONOFRIO L, EDWARDS R, SCHWARTZ PE, CHAMBERS JT, CHAMBERS SK. High level expression of fms proto-oncogene mRNA is observed in clinically aggressive human endometrial adenocarcinomas. *JJ Radiation Oncology Biol Phys* 1988; **15**: 823–829.
- [22] KLEIN A. Czynniki wzrostu i różnicowania komórek krwi. *Post Biol Kom* 1993; **20**, supp 1: 63–74.

- [23] METCALF D. In vivo effects of recombinant colony-stimulating factors. *ISI Atlas of Science: Immunology* 1988; 238–241.
- [24] MOLINEUX G, POJDA Z, HAMPSON IN, LORD BI, DEXTER TM. Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1990; 76: 2153–2158.
- [25] MORSTYN G, BURGESS AW. Hemopoietic growth factors: a review. *Cancer Res* 1988; 48: 5624–5637.
- [26] MURTHY SC, MUI AL-F, KRYSZTAŁ G. Characterization of the Interleukin 3 Receptor. *Exp Hematol* 1990; 18: 11–17.
- [27] NEMUNAITIS J, MEYERS JD, BUCKNER CD, BIANCO JC, GROVES E, HIGANO CS, SHULMAN H, STORB R, HANSEN J, APPELBAUM FR, SINGER JW. Phase I/II trial of recombinant human Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) in patients with invasive fungal infection. *Blood* 1990; 76, supp 1: 159A.
- [28] NOWICKI A. Rola makrofagów w odporności przeciwnowotworowej. *Nowotwory* 1993; 43: 61–67.
- [29] NOWICKI A, OSTROWSKA G. Makrofagi związane z nowotworami. *Lek Woj* 1993; 5: 496–501.
- [30] OLSSON I, GULLBERG U, LANTZ M, RICHTER J. The receptors for regulatory molecules of hematopoiesis. *Eur J Haematol* 1992; 48: 1–9.
- [31] POJDA Z, MOLINEUX G, DEXTER TM. Hemopoietic effects of short-term in vivo treatment of mice with various doses of rhG-CSF. *Exp Hematol* 1990; 18: 27–31.
- [32] POLLARD JW, BARTOCCI A, ARCECI R, ORLOFSKY A, LACHSER MB, STANLEY ER. Apparent role of the macrophage growth factor CSF-1 in placental development. *Nature* 1987; 330: 484–486.
- [33] POLLIEE. The role of haematopoietic growth factors in bone marrow transplantation. *Acta Haematol* 1991; 86: 155–161.
- [34] RALPH P, SAMPSON-JOHANNES A. M-CSF (in press)
- [35] RATAJCZAK M, GEWIRTZ AM. Rola receptorów obdarzonych wewnętrzną aktywnością kinazy tyrozynowej w regulacji krwiotworzenia u człowieka. *Post Biol Kom* 1993; 20: 279–295.
- [36] REES RC, PARRY H. Macrophages in tumour immunity. [w] Lewis CE, McGee JO'D [red.] *The Macrophage*. Oxford, New York, Tokyo: IRL PRESS, Oxford University Press 1993: 325.
- [37] ROBAK T. Krwiotwórcze czynniki wzrostowe. *Post Hig Med Dośw* 1991; 45: 461–496.
- [38] ROBERTS WM, SHAPIRO LH, ASHMUN RA, LOOK AT. Transcription of the human colony-stimulating factor-1 receptor gene is regulated by separate tissue-specific promoters. *Blood* 1992; 79: 586–593. [
- [39] SHADDUCK RK, WAHEED A, WING EJ. Demonstration of a blood-bone barrier to macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1989; 73: 68–73.
- [40] SCHAAFSMA MR, FALKENBURG JHF, LANDEGENT JE, DUINKERKEN N, OSANTO S, RALPH P, KAUSHANSKY K, WAGEMAKER G, DAUNNE JV, WILLEMZE R, FIBBE WE. In vivo production of interleukin-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-6 during intravenous administration of high dose interleukin-2 in cancer patients. *Blood* 1991; 78: 1981–1987.
- [41] SHERR ChJ. Fibroblast and hematopoietic cell transformation by the fms oncogene (CSF-1 Receptor). *J Cell Physiol* 1987; suppl. 5: 83–87.
- [42] SHERR ChJ. Regulation of mononuclear phagocyte proliferation by colony-stimulating factor-1. *Inter J Cell Cloning* 1990; 8: 46–62.
- [43] SHERR ChJ. The fms oncogene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1988; 948: 225–243.
- [44] TARACH JS, NOWAKOWSKI A. Autologiczne krwiopochodne przeszczepy komórek macierzystych w leczeniu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego cz. I. *Acta Haematol Pol* 1992; 23: 165–169.
- [45] TESTA NG. In vitro biological activities of the haemopoietic growth factors: implications for their clinical use. *Acta Haematol* 1991; 86: 122–127.
- [46] TIMONY G, BREE A, METZGER M, HORGAN P, STOUDEMIRE J, GARNICK M. Pharmacokinetics of rhM-CSF. *Blood* 1990; 76, supp 1: 169 A. [
- [47] WHETTON AD, DEXTER TM. Myeloid haemopoietic growth factors. *Biochim et Biophys Acta* 1989; 989: 111–132.
- [48] YOSHIDA H, HAYASHI S-I, KUNISADA T, OGAWA M, NISHIKAWA S, OKAMURA H, SUDO T, SHULTZ LD, NISHIKAWA S-I. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1987; 330: 442–444.

Otrzymano: 20.02.1994 r.

Przyjęto: 25.02.1994 r.

Adresy autorów:

G. Weisło – 04-348 Warszawa, ul. Garwolińska 8/10 m. 129;

P. Szwach – 00-423 Warszawa, ul. Okrąg 3 D m. 15

FIZJOLOGICZNA REGULACJA AKTYWNOŚCI ENDOTELIN: TYPY RECEPTORÓW I PRZENOSZENIE SYGNAŁU

PHYSIOLOGICAL REGULATION ENDOTHELINS ACTIVITY: RECEPTOR TYPES AND SIGNAL TRANSDUCTION

Rozalia GRABOWSKA-BOCHENEK, Marcin ADAMCZAK

Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

Streszczenie. Endoteliny są grupą peptydów, których obecność wykazano w wielu tkankach i narządach. Została opisana sekwencja aminokwasów, konformacja i charakterystyczne właściwości tych peptydów. Pozwoliło to określić zależności pomiędzy strukturą a powinowactwem do receptorów, których swoistość i struktura została poznana. Receptory te, w zależności od powinowactwa do różnych agonistów, podzielone zostały na dwie grupy: ET_A i ET_B . Przedstawiono strukturę i funkcję białka receptorowego, a także szlaki wewnątrzkomórkowej transmisji sygnału.

Słowa kluczowe: antagonist, endoteliny, kanał wapniowy, miejsce wiązania, receptory

Summary. Endothelins are the group of peptides which existence in various tissues and organs are shown. The sequences of aminoacids and conformations, as well as the characteristic features of these peptides are also described. These facts let to establish dependences between structure of endothelins and receptor affinities, the specificity and structure of which have been known. These receptors, due to agonists affinity, were divided into two classes: ET_A and ET_B . The structure and function of receptor proteins, as well as the cellular signal pathways have been described.

Key words: antagonist, binding site, endothelins, calcium channel, receptors

Wykaz skrótów: ET – endoteliny; AA – kwas arachidonowy; ET_A -R – receptor endotelin typu A; ET_B -R – receptor endotelin typu B; ET_C -R – receptor endotelin typu C; DAG – diacyloglicerol; G – białko G; IP_3 – trifosforan inozytolu; IP_4 – tetrafosforan inozytolu; LT – leukotrieny; LX – lipoksyny; PA – kwas fosfatydowy; PG – prostaglandyny; PGE_2 – prostaglandyna E_2 ; PKC – fosfokinaza C; PLA – fosfolipaza A; PLC – fosfolipaza C; PLD – fosfolipaza D; SRTX – sarafotoksyna; SRTX-b – sarafotoksyna-b; TX – tromboksany; TXA_2 – tromboksan A_2 .

WPROWADZENIE

Termin endoteliny odnosi się do grupy szeroko rozpowszechnionych 21 aminokwasowych peptydów. W skład rodziny wchodzi 3 peptydy – ET-1, 2 i 3. [15]. Peptyd opisywany jako

VIC [4] okazał się być myślim odpowiednikiem ET-2. Ponadto do rodziny endotelin zalicza się sarafotoksyny, peptydy otrzymane z jadu węża *Atractaspis engaddensis*, bardzo zbliżone strukturą do endotelin ssaków. Po ukąszeniu, sarafotoksyny w znacznej ilości dostają się do krwioobiegu ofiary, reagują z receptorami dla endotelin, powodując skurcz naczyń wieńcowych, który często pociąga za sobą zawał serca [19]. Wysoki poziom homologii pomiędzy tymi peptydami, pozwolił zaliczyć je do jednej rodziny [23].

Endoteliny zostały odkryte przez Yanagisawa w komórkach śródbłonna naczyń [49]. Są one najsilniej działającymi substancjami kurczącymi naczynia krwionośne, jakie dotąd zostały poznane.

Działanie endotelin nie ogranicza się tylko do układu krążenia. Opisano ich obecność w wielu narządach i tkankach. Endoteliny są oznaczane w surowicy, a ich stężenie podnosi się w różnorodnych stanach chorobowych. Jak wiele innych hormonów i neurotransmiterów endoteliny powstają w wyniku ograniczonej proteolizy z prohormonów. Z pre-proendoteliny, polipeptydu składającego się z ok. 200 aminokwasów, powstaje 39-aminokwasowa, „wielka” endotelina, która następnie przy udziale enzymu nazwanego konwertazą endotelinową zostaje przekształcona w dojrzałą endotelinę [15].

STRUKTURA ENDOTELIN

Wszyscy przedstawiciele rodziny endotelin mają podobny plan budowy i wykazują wiele podobieństw strukturalnych. ET-2 ma 90% homologii z ET-1, a ET-3 – 71%. Cechami wspólnymi są:

- 1) obecność 2 wiązań dwusiarczkowych Cys¹-Cys¹⁵ i Cys³-Cys¹¹,
- 2) stała sekwencja aminokwasów na hydrofobowym C-końcu zawierająca Trp²¹,
- 3) polarny obszar utworzony przez Asp⁸-Lys⁹-Glu¹⁰.

Sekwencja N-końcowa (miedzy Cys³ a Cys¹¹, a szczególnie pomiędzy czwartym a siódmym aminokwasem) wykazuje bardzo dużą zmienność [23, 42].

Wstępne badania struktury trzeciorzędowej wykazały, że 30–35% łańcucha peptydowego cząsteczki endoteliny występuje w postaci helisy. Region helikalny obejmuje aminokwasy pomiędzy Lys⁹ a Cys¹⁵ [35].

Niezbędnymi dla wiązania się peptydu z receptorem elementami struktury endotelin są:

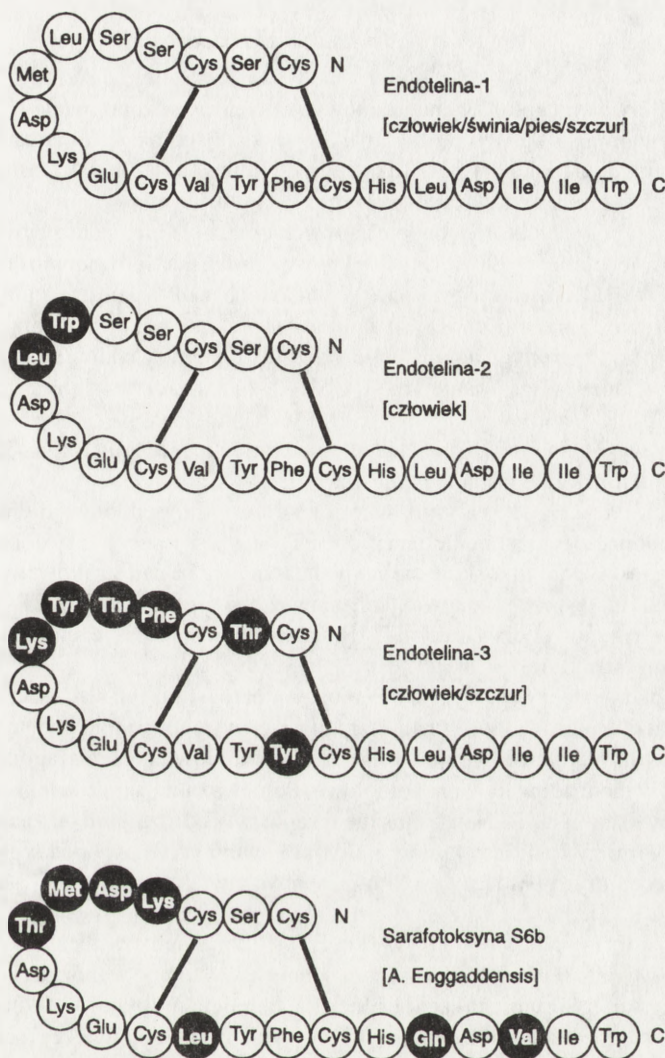
- grupa terminalna – delecja ostatniego aminokwasu Trp²¹ obniża 1000-krotnie aktywność endotelin [33, 42], a delecja ostatnich pięciu aminokwasów pozbawia je całkowicie aktywności [18];

- karboksylowe grupy Asp⁸ i Glu¹⁰;

- aromatyczność Phe¹¹ [30];

- cykliczna struktura peptydów – redukcja lub alkilacja obydwu mostków dwusiarczkowych prowadzi do całkowitej utraty aktywności [5, 42]. Zewnętrzny mostek cystynowy jest bardziej istotny dla aktywności niż wewnętrzny [5].

Badania nad strukturą endotelin i wpływem poszczególnych aminokwasów w ich sekwencji na aktywność pozwoliły na otrzymanie antagonistów receptorów endotelin. Nakajaha i wsp. [31] wyizolowali peptydy ze *Streptomyces maisakiensis* będące antagonistami receptorów endotelinowych. Penta-peptydy nazwane BE-18257A i BE-188257B mają odpowiednio struktury cyclo (-D-Glu-L-Ala-D-Val-L-Leu-D-Trp) i cyclo (-D-Glu-L-Ala-allo-D-Ile-L-



Rys.1. Struktura endotelin (ET-1, ET-2, ET-3) i sarafotoksyny S6b (SRTX-b)

Leu-D-Trp). W sposób silny i selektywny łączą się z receptorem ET_A -R, znosząc skurcz mięśni gładkich naczyń [24, 31].

Spinella i wsp. w wyniku dołączenia kwasu diaminopropionowego do pierwszego aminokwasu łańcucha peptydowego ET-1 oraz wymiany Cys^{15} na Ala^{15} otrzymali nowy peptyd, który charakteryzował się silnymi właściwościami antagonistycznymi w stosunku do endotelin [44]. Jest on nieselektywnym antagonistą zarówno receptorów ET_A -R, jak i ET_B -R. Badania nad peptydami BE-18257 pozwoliły ostatnio skonstruować bardziej silnego antagonistę znanego jako BQ-123 (cyklo -D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu-) [7].

TYPY RECEPTORÓW

Od czasu odkrycia receptorów endotelinowych przeprowadzono wiele badań z użyciem znakowanych antagonistów. Wyniki tych badań wskazujące na zróżnicowanie receptorów zarówno pod względem molekularno-strukturalnym, funkcjonalnym, jak i farmakologicznym sugerują obecność polimorfizmu receptorowego.

Klasyfikacja typów receptorów endotelinowych opiera się nie, jak to bywa w przypadku innych systemów receptorowych (np. muskarynowe), na ich powinowactwie do antagonistów, ale do agonistów [3]. Użycie agonistów w badaniach nad typami receptorów wynika z faktu, że selektywni antagoniści zostali dopiero niedawno odkryci. Biorąc za kryterium powinowactwo poszczególnych agonistów podzielono receptory endotelin na 3 grupy.

1. Receptory, które wiążą silniej ET-1 i SRTX-b, a znacznie słabiej inne endoteliny, nazywane są ET_A -R.

2. Receptory wysokiego powinowactwa dla wszystkich endotelin – ET_B -R [20].

3. Receptory, które silnie i selektywnie wiążą ET-3 – ET_C -R.

O ile receptory ET_A i ET_B zostały już dość dokładnie opisane, sklonowane, a ich sekwencje białkowe określone, o tyle istnienie receptora ET_C nie jest jeszcze tak dobrze udokumentowane. O obecności jego wnioskuje się na podstawie badań nad znakowanymi agonistami [6], ale nie został on jeszcze sklonowany. Ponieważ oba typy tzn. ET_A i ET_B są wykrywane przy użyciu sondy genowej cDNA dla ET_B -R, trzeci typ receptora, jeżeli istnieje, musi mieć całkiem odmienną strukturę.

W 1992 r. Sokolovsky i wsp. wykazali w mózgu i przedsionkach serca szczurów obecność nowego podtypu receptorów, które charakteryzują się występowaniem miejsc wiązania super wysokiego powinowactwa. Reagują one już na pikomolowe stężenia agonisty, gdy wcześniej opisywane reagowały na nanomolowe. Ponieważ nie są one selektywne, zaliczono je do receptorów klasy ET_B -R. Nowo opisane receptory w odróżnieniu od znanych wcześniej nie indukują hydrolizy fosfoinozytydów i nie tracą swej aktywności pod wpływem deglikozylacji. Receptory o bardzo wysokim powinowactwie nazwano ET_{B1} -R, a wcześniej opisane – ET_{B2} -R [5].

Dwie główne formy ludzkiego mRNA dla ET_B -R o masach cząsteczkowych 4,3 i 1,7 kb zostały odkryte w wielu tkankach. Największa ich ilość występuje w mózgu (kora i mózdzek), średnia – w łożysku, płucach, nerkach, nadnerczach, jelicie grubym i w dwunastnicy.

Analiza ludzkiego mRNA dla ET_A -R (4,3 kb) wykazała, że najwięcej receptorów jest w aorcie, dużo w płucach, jelicie grubym i łożysku, średnio w korze mózgu, przedsionku serca, nerce i dwunastnicy [42].

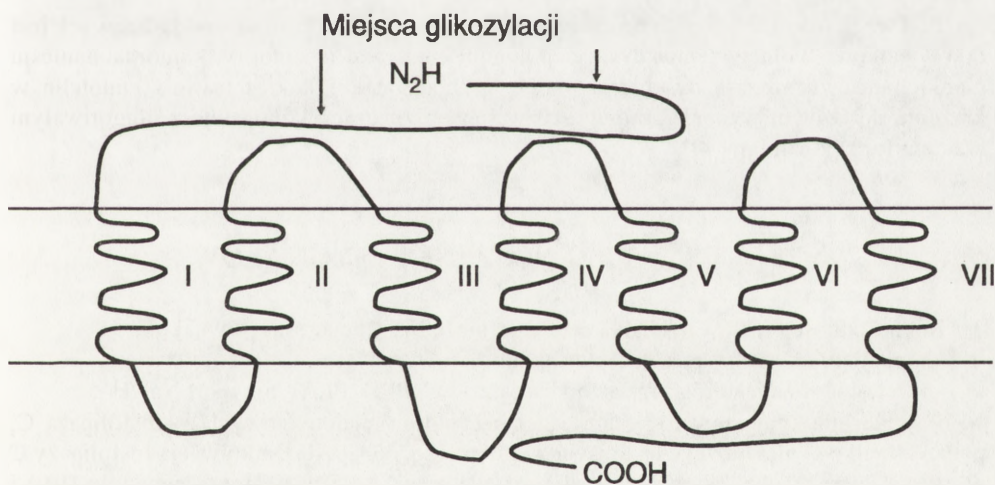
STRUKTURA RECEPTORÓW

Pierwszorzędową strukturę receptorów określono na podstawie badań nad sekwencją sond genowych cDNA [2, 39]. W kilku laboratoriach [11, 12, 25, 26, 39] sklonowano, zselekcjonowano i zrekonstruowano receptory ET-R. Ekspresję receptorów przeprowadzono głównie na komórkach lini COS-7 i na CHO-K1 [25] oraz na oocytach *Xenopus* [12]. Wyniki tych

badani potwierdziły występowanie podtypów receptorów. Analiza cDNA wykazała, że receptory mają zbliżoną ilość aminokwasów wahającą się od 415 do 442 i masę 46 900 do 49 629.

Receptory ET_A -R i ET_B -R są strukturalnie i funkcjonalnie odmienne, mają one jednak wiele cech wspólnych. Każdy zawiera 7 domen złożonych z 20–27 aminokwasów hydrofobowych, które reprezentują obszary transbłonowe, połączonych ze sobą odcinkami hydrofilowymi. Białka te wykazują podobieństwo topografii i sekwencji do opsyny pigmentu wzrokowego i do innych receptorów należących do rodziny heptahelikalnych receptorów związanych z białkami G [25, 39]. Obydwa typy receptorów mają N-kończącą sekwencję sygnałową [26, 39], która jest rzadką wśród tej rodziny białek, i długą, N-kończącą część zewnątrzkomórkową przechodzącą w pierwszą domenę błonową. Zewnątrzkomórkowa część N-kończąca w przypadku ET_A -R zawiera 80 aminokwasów, w przypadku ET_B -R – 101 aminokwasów. Wydaje się, że podobnie jak w przypadku receptorów β -adrenergicznych i receptorów hormonów peptydowych [3], poza układem domen błonowych istotną rolę w wiązaniu agonisty odgrywa część zewnątrzkomórkowa. Prawie wszystkie receptory endotelinowe mają konserwatywne sekwencje Asp-Arg-Tyr [25], które zostały opisane dla innych receptorów związanych z białkami G [3]. Sekwencje te zajmują stałą pozycję, niezależnie od źródła, dla ET_A -R peptyd 182–184, ET_B -R 198–200 (płuco szczura 197–199).

Część pozakomórkowa



Część cytoplazmatyczna

Rys.2. Schematyczne przedstawienie budowy receptora endotelinowego ET_A (szczegółowy opis w tekście); objaśnienia: I–VII domeny transbłonowe

Receptory endotelinowe mają parę miejsc zmian postranslacyjnych: miejsce dla N-glikozylacji (Asn-X-Ser/Thr) w pozycjach 29 i 62 (szczur i bydło), pozycja 59 (człowiek). Z badań Sokolowsky'ego wynika, że część receptorów ET_B-R jest glikoproteinami, a część nimi nie jest [44]. Receptory zawierają sześć reszt cysteinowych w C-końcowej domenie, jedna z nich jest być może połączona z kwasem palmitynowym (jak w przypadku receptorów β -adrenergicznych) [34] oraz kilka miejsc serynowych w trzeciej pętli cytoplazmatycznej i części C-końcowej, które są potencjalnymi substratami dla kinaz serynowych i treoninowych [10].

Homologia N-końcowej części receptora ET-A i ET-B [44] wynosi tylko 4%. Fakt ten sugeruje, że region ten odgrywa istotną rolę w selektywności wiązania agonisty. Badania nad niepełnymi receptorami wykazały, że do wiązania ligandów i selektywności niezbędna jest domena bliższa śródbłonowej części łańcucha N-końcowego, zawierająca jedno miejsce glikozylacji. Obcięcie całej części N-końcowej powodowało całkowitą utratę zdolności wiązania agonisty, a obcięcie tylko połowy reszty N-końcowej nie odbijało się na zdolności wiązania [10]. Z badań z użyciem chimerycznych receptorów ET_A/ET_B umieszczonych na komórkach jajnika chomika chińskiego wynika, że w wiązaniu ligandu bierze udział zarówno fragment N-końcowego łańcucha A, jak i pierwsza zewnątrzkomórkowa pętla [1, 10]. Oba te fragmenty tworzą trzeciorzędową strukturę miejsca wiązania ligandu. Przeniesienie fragmentu pierwszej zewnątrzkomórkowej pętli z ET_B-R na ET_A-R pozbawiło go zdolności wiązania ET-1. Przeniesienie tej samej pętli z ET_A-R na ET_B-R obdarzyło ten receptor zdolnością wiązania ET-1 [1]. Dla wiązania ligandu niezbędna jest także obecność fragmentu C-końcowego [10]. Przypuszcza się, że obecność kwasu palmitynowego we fragmencie C-końcowym stabilizuje konformację receptora poprzez „zakotwiczenie” go w błonie plazmatycznej [10].

Pod względem funkcjonalnym charakterystycznym dla receptorów endotelinowych jest fakt wyjątkowo wolnego tempa dysocjacji kompleksu ligand-receptor. W komórkach mięśni gładkich naczyń szczura dysocjacja prawie nie zachodzi. Półokres trwania endotelin w krążeniu nerkowym wynosi 2 minuty, co w sposób znaczący kontrastuje z długotrwałym efektem funkcjonalnym [44].

PROCESY PRZENOSZENIA SYGNAŁÓW

Różnorodność efektów działania endotelin może być tłumaczona dwójako:

- istnieniem różnych typów receptorów lub
- aktywacją różnych dróg przekazywania jak: PLC, PLD, PLA₂, antyport Na⁺/H⁺.

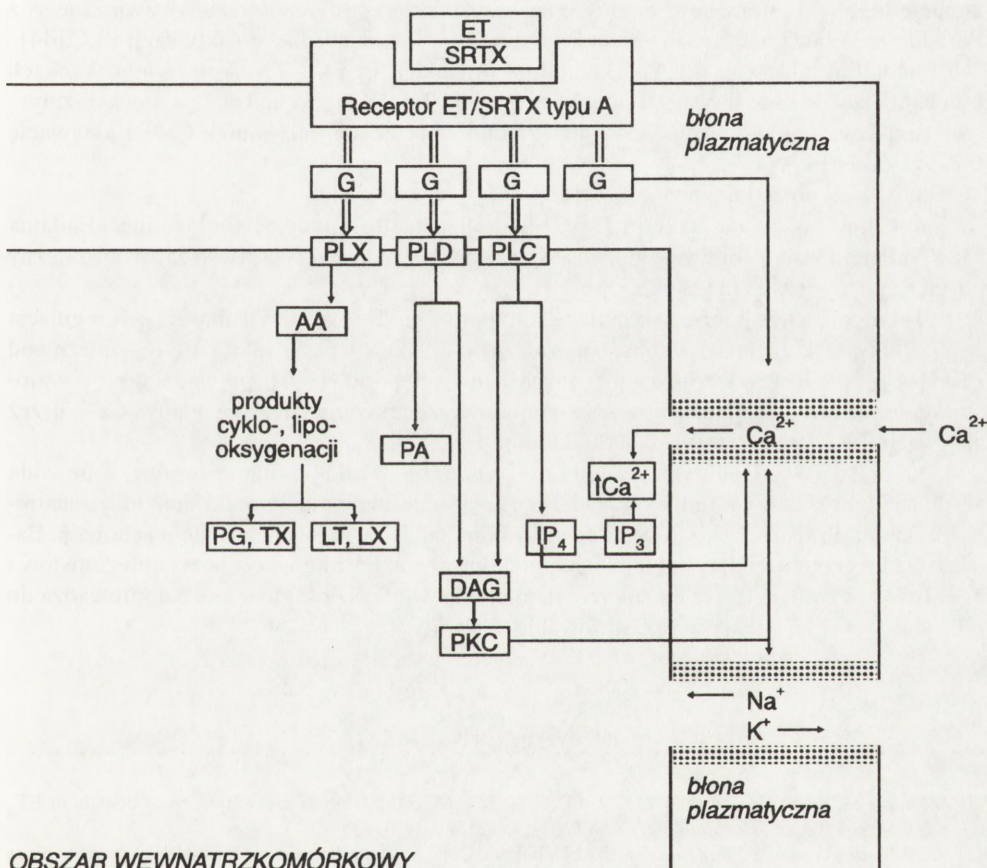
Najlepiej udokumentowany jest związek receptorów endotelinowych z fosfolipazą C, poprzez białko G niewrażliwe na toksynę krztuśca [25, 36, 39, 46]. Aktywacja fosfolipazy C prowadzi do rozkładu błonowych fosfoinozydów na 1,4,5-trójfosforan inozytolu (IP₃) i diacyloglicerol (DAG), z których każdy aktywuje osobną drogę przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego.

Obydwa typy receptorów są związane ze wzrostem stężenia Ca²⁺ w cytoplazmie [2, 9, 39, 46, 47]. Wzrost ten ma charakter dwufazowy. Faza pierwsza następuje po uaktywnieniu przez IP₃ wewnątrzkomórkowych wrażliwych na kofeinę zapasów Ca²⁺ [17]. Usunięcie jonów Ca²⁺ ze środowiska zewnątrzkomórkowego nie wpływa na przebieg tej fazy. Druga następuje przez pobór jonów Ca²⁺ ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Usunięcie jonów Ca²⁺ ze

środowiska zewnątrzkomórkowego, jak i działanie jonu niklowego – blokera kanału wapniowego znosi wzrost stężenia jonów Ca^{2+} [46]. W czasie drugiej fazy pod wpływem działania endoteliny zostają otwarte różne typy kanałów wapniowych.

Wydaje się, że główną rolę odgrywają kanały zależne od transbłonowego potencjału elektrycznego, zwane też kanałami zależnymi od napięcia (ang. *voltage-dependent channels*) a spośród nich kanały blokowane dihydropirydyną typu L [9, 28, 49]. W hodowli mio-cytów przedsionków serca szczura wykazano, że wzrost stężenia jonów Ca^{2+} zależy od

OBSZAR POZAKOMÓRKOWY



OBSZAR WEWNĄTRZKOMÓRKOWY

Rys. 3. Schematyczne przedstawienie transdukcji sygnału po aktywacji receptora ET/SRTX typu A (szczegółowy opis w tekście); objaśnienia: ET – endoteliny; AA – kwas arachidonowy; DAG – diacylglicerol; G – białko G; IP_3 – trifosforan inozytolu; IP_4 – tetrafosforan inozytolu; LT – leukotrieny; LX – lipoksyny; PA – kwas fosfatydowy;

PG – prostaglandyny; PKC – fosfokinaza C; PLA – fosfolipaza A; PLC – fosfolipaza C; PLD – fosfolipaza D;

SRTX – sarafotoksyna; TX – tromboksany; \square – kanały jonowe

otwarcia kanałów typu T a nie L. Funkcja kanałów zależnych od napięcia nie tylko jest sterowana poprzez depolaryzację błony cytoplazmatycznej, ale także przez wtórne przekaźniki: IP₄, DAG przez aktywację PKC i bezpośrednio przez reakcje z białkami G wrażliwymi na toksynę krztuśca [9, 14]. Ostatnie badania Iijema i wsp. nad komórkami mezangium i mięśniówki gładkiej wykazały, że następujący pod wpływem IP₃ wzrost stężenia Ca²⁺ aktywuje kanały chlorkowe. Pobór jonu Cl⁻ powoduje depolaryzację błony komórkowej i aktywację zależnych od napięcia kanałów wapniowych [13].

W niektórych tkankach, np. komórkach mezangium, opisano fakt otwierania się pod wpływem endotelin kanałów bramkowanych ligandem wrażliwych na dihydropirydynę i niezależnych od depolaryzacji [22, 28, 41].

W wielu doniesieniach [44] zwraca się uwagę, że stymulacja PLC zachodzi w znacznie wyższych stężeniach, niż by to wynikało z wartości K_d receptorów endotelinowych. Wyjaśnieniem tego faktu może być hipoteza, że wszystkie receptory endotelinowe związane są z PLC lub że pobudzenie więcej niż jednego receptora jest niezbędne do aktywacji PLC [44].

Endoteliny aktywują PLA₂ i stymulują produkcję PGE₂ i TXA₂ w wielu tkankach uruchamiając kaskadę kwasu arachidonowego [35, 36]. W grę wchodzi dwa mechanizmy:

- bezpośredniej aktywacji PLA₂ przez podwyższenie stężenia jonów Ca²⁺ i aktywację Ca²⁺-zależnej PLA₂ lub
- aktywacji pośredniej przez PKC [32].

Endoteliny aktywują także PLD [27] hydrolizującą fosfatydyloetanolaminę. Badania Mac Nultego i wsp. [27] wykazały, że aktywacja PLD zachodzi w sposób zarówno zależny od PKC, jak i niezależny [23].

ET-1 działa także poprzez stymulację antyportu Na⁺/H⁺. W przypadku ET_B-R regulacja antyportu Na⁺/H⁺ zachodzi w sposób niezależny od PKC, a w przypadku ET_A-R – zależny od PKC [48]. Alkaliczacja cytoplazmy przez nasilenie antyportu Na⁺/H⁺ prowadzi do wzrostu syntezy DAG, co pociąga za sobą stopniowe zwiększenie stężenia jonów Ca²⁺ przez aktywację PKC oraz przyspiesza cykl komórkowy.

Od czasu swego odkrycia endoteliny wzbudzają wielkie zainteresowanie z powodu zdolności wpływania na funkcje układu krążenia, mięśnie gładkie, nerki oraz układ neurohormonalny. Przypuszcza się, że endoteliny biorą udział w patogenezie wielu schorzeń. Badania nad receptorami dla endotelin, nad modulowaniem ich aktywności oraz antagonistów i agonistów pozwalają bliżej zrozumieć fizjologię, a w przyszłości być może doprowadzą do odkrycia związków mających zastosowanie terapeutyczne.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADACHI M, YANG YY, TRZECIAK A, FURUICHI Y, MIYAMOTO CH. Identification of domain of ET_A receptor required for ligand binding. *FEBS Letters* 1992; **311**: 179–183.
- [2] ARAI H, HORI S, ARAMORI I, OHKUBO H, NAKANISHI S. Cloning and expression of cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; **348**: 730–732.
- [3] BARAŃSKA J. Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce. Wyd. Polskie Towarzystwo Biochemiczne; Warszawa 1992.
- [4] BLOCH KD, HONG CC, EDDY RL, SHOWS TB, QUERTEMOUS T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2. *Genomic* 1991; **10**: 236–242.
- [5] DOHERTY A. M. Endothelin: a new challenge. *J Med Chem* 1992; **35**: 1494–1500.

- [6] EMORI T, HIRATA Y, MARUMO F. Specific receptors for endothelin-3 in cultured bovine endothelial cells and its cellular mechanism of action. *FEBS Lett* 1990; **263**: 261–264.
- [7] FUKAMI T, HAYAMA T, NIYAMA K, NAGASE T, MASE T, FUJITA K, KUMAGAI U, URAKAWA Y, IHARA M, KIMURA S, YANO M. Endothelin antagonistic cyclic pentapeptidases with high selectivity for the ET_A receptor. *Twelfth American Peptide Symposium Cambridge MA* 1991; June 16–21: 506.
- [8] FURUKAWA T, ITO H, NITTA J, TSUJINO M, ADACHI S, HIROE M, MARUMO F, SAWANOBORI T, HIRAOKA M. Endothelin-1 enhances calcium entry through T-type calcium channels in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circulation Res* 1992; **71**: 1242–1253.
- [9] GOTO K, KASUYA Y, MATSUKI N, TAKUWAY Y, KUHIRA H, ISHIKAWA T, KIMURA S, YANAGISAWA M, MASAKI T. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage dependent Ca channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 3915–3918.
- [10] HASHIDO K, GAMOU T, ADACHI M, TABUCHI H, WATANABE T, FURUICHI Y, MIYAMOTO CH. Truncation of N-terminal extracellular or C-terminal intracellular domains of human ET_A receptor abrogated the binding activity to ET-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **187**: 1241–1248.
- [11] HAYZER D J, ROSE PM, LYNCH JS, WEBB ML, KIENZLE BK, LIU EC-K, BOGOPSISAN EA, BRINSON E, RUNGE MS. Cloning and expression of human endothelin receptor: subtype A. *Am J Med Sci* 1992; **304**: 231–238.
- [12] HOSODA K, NAKAO K, ARAI H, SUGA SI, OGAWA Y, MUKOYAMA M, SHIRAKAMI G, SAITO Y, NAKANISHI S, IMURA H. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* 1991; **287**: 23–26.
- [13] IJIMA K, LIN L, NASJETTI A, GOLIGORSKY MS. Intracellular ramification of endothelin signal. *Am J Physiol* 1991; **260**: C982–C992.
- [14] INOUE Y, OIKE M, KITAMURA K, KURIYAMA H. Endothelin augments calcium channel currents on the smooth muscle cell membrane of guinea-pig portal vein. *J Physiol* 1990; **423**: 171–191.
- [15] INOUE A, YANAGISAWA M, KIMURA S, KASUYA Y, MIYAUCHI T, GOTO T, MASAKI T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2863–2867.
- [16] JONES CR, HILLEY CR, PELTON JT, MILLER RC. Endothelin receptor heterogeneity: structure activity. Autoradiographic and functional studies. *J Receptor Res* 1991; **11**: 299–310.
- [17] KAI H, KANAIDE H, NAKAMURA M. Endothelin-sensitive intracellular Ca²⁺ store overlaps with caffeine-sensitive one in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **158**: 235–243.
- [18] KIMURA S, KASUYA Y, SAWAMURA T, SHINMI O, SUGITA Y, YANAGISAWA M, GOTO K, MASAKI T. Structure-activity relationship of endothelin: importance of the C-terminal moiety. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **156**: 1182–1186.
- [19] KLOOG Y, AMBAR I, SOKOLOVSKY M, WOLLBERGG Z. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* 1988; **242**: 268–270.
- [20] KLOOG Y, BOUSSO-MITTLER D, BDOLAH A, SOKOLOVSKY M. Three apparent receptor subtypes for endothelin/sarafotoxin family. *FEBS Lett* 1989; **253**: 199–202.
- [21] KLOOG Y, SOKOLOVSKY M. Similarities in mode and sites of action of sarafotoxin and endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 1989; **10**: 10212–10214.
- [22] KIOWSKI W, LUSCHER TF, LINDER L, BUHLER FR. Endothelin-1-induced vasoconstriction in humans. Reversal by calcium channel blockade but not by nitrovasodilators or endothelium-derived relaxing factor. *Circulation* 1991; **83**: 469–475.
- [23] KONISHI F, KONDO T, INAGAMI T. Phospholipase D in cultured rat vascular smooth muscle cells and its activation by phorbol ester. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **179**: 1070–1076.
- [24] KOJIRI K, IHARA M, NAKAJIMA S, KAWAMURA K, FUNAISHI K, YANO M, SUDA H. Endothelin-binding inhibitors, BE-18257A and BE-18257B. I. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J Antibiotics* 1991; **44**: 1342–1347.
- [25] LIN HY, KAJI EH, WINKEL GK, IVES HE, LODISH HE. Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3185–3189.
- [26] LIU J, KELLY J, CASLEY DJ, JOHNSON CI, NAYLER WG. Solubilization and characterization of endothelin-1 receptor in rat cardiac-tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **166**: 299–307.
- [27] MAC NULTY EE, PLEVIN R, WAKELAM MJ. Stimulation of the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylcholine by endothelin, a complete mitogen for rat-1 fibroblast. *Biochem J* 1990; **272**: 761–766.

- [28] MADEDDU P, YANG X, ANANIA V, et al. Efficacy of nifedipine to prevent systemic and renal vasoconstrictor effects of endothelin. *Am J Physiol* 1990; **259**: F304–F311.
- [29] MENE'P, SIMONSON MS, DUNN MJ. Phospholipids in signal transduction of mesangial cells. *Am J Physiol* 1989; **256**: F375–F386.
- [30] NAKAJIMA K, KUBO S, KUMAGAYE SI, NISHIO H, TSUNEMI M, INUI T, KURODA H, CHINO N, WATANABE TX, KIMURA T, SAKAKIBARA S. Structure-activity relationship of endothelin: Importance of charged groups. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **163**: 424–429.
- [31] NAKAJIMA S, NIYAMA K, IHARA M, KOJIRI K, SUDA H. Endothelin-binding inhibitors, BE-18257A and BE-18257B. II. Structure determination. *J Antibiotics* 1991; **44**: 1348–1356.
- [32] NAOR Z. At the cutting edge: is arachidonic acid a second messenger in signal transduction? *Molec Cell Endocr* 1991; **80**: C181–C186.
- [33] NISHIKORI K, AKIYAMA H, INAGAKI Y, OHTA H, KASHIWABARA T, IWAMOTSU A, NOZIMU M, MORITA A. Receptor binding affinity and biological activity C-terminal elongated forms of endothelin-1. *Neurochem Int* 1991; **18**: 535–539.
- [34] O'DOWD BF, HNATOWICZ M, CARON MG, LEFKOWITZ RJ, BOUVIER M. Palmitoylation of human 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1989; **264**: 7564–7569.
- [35] PERKINS TD, HIDER RC, BARLOW DJ. Proposed solution structure of endothelin. *Int J Peptide Protein Res* 1990; **36**: 128–133.
- [36] RESNIK TJ, SCOTT-BURDEN T, BÜHLER FR. Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **157**: 1360–1368.
- [37] REYNOLDS EE, MOK LLS. Role of thromboxane A_2 /Prostaglandin H_2 Receptor in the vasoconstrictor response of rat aorta to endothelin. *J Pharmac Exp Ther* 1990; **252**: 915–921.
- [38] SAKURAI T, YANAGISAWA M, MASAKI T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 1992; **13**: 103–108.
- [39] SAKURAI T, YANAGISAWA M, TAKUWA Y, MIYAZAKI H, KIMURA S, GOTO K, MASAKI T. Cloning of cDNA encoding a non isopeptide-selective subtype of endothelin receptor. *Nature* 1990; **348**: 732–735.
- [40] SCHVARTZ I, ITTOOP O, HAZUM E. Direct evidence for multiple endothelin receptors. *Biochemistry* 1991; **30**: 4325–4327.
- [41] SIMONSON MS, DUNN MJ. Ca^{2+} signaling by distinct endothelin peptides in glomerular mesangial cells. *Exp Cell Res* 1991; **192**: 148–156.
- [42] SIMONSON MS, DUNN MJ. Endotelin. Pathways of transmembrane signaling. *Hypertension* 1990; Suppl I 15: 1–5 – 1–12.
- [43] SOKOLOVSKY M, AMBAR I, GALTRON R. A novel subtype of endothelin receptors. *J Biol Chem* 1992; **267**: 20551–20554.
- [44] SOKOLOVSKY M. Endothelins and sarafotoxins: Physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Pharmac Ther* 1992; **54**: 129–149.
- [45] SPINELLA MJ, PALIK AB, EVERITT J, ANDERSEN TT. Design and synthesis of specific endothelin 1 antagonist: Effects on pulmonary vasoconstriction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7443–7446.
- [46] TAKUWA Y, KASUYA Y, TAKUWA N, KUDO M, YANAGISAWA M, GOTO K, MASAKI T, YAMASHITA K. Endothelin receptor is coupled to phospholipase C via a pertussis toxin-insensitive guanine-nucleotide binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1990; **85**: 653–658.
- [47] WILLIAMS DL, JONES KL, PETTIBONE DJ, LIS EV, CLINESCHMIDT BV. Sarafotoxin S6c: An agonist distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **175**: 556–561.
- [48] VIGNE P, LADOUX A, FRELIN C. Endothelin activate Na^+/H^+ exchange in brain capillary endothelial cells via high affinity endothelin-3 receptor that is not coupled to phospholipase C. *J Biol Chem* 1991; **266**: 5925–5928.
- [49] YANAGISAWA M, KUNHARA H, KIMURA S, TOMOBE Y, KOBAYASHI M., YAZAKI Y, GOTO K, MASAKI T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; **332**: 411–415.

Otrzymano: 28.12.1993 r.

Przyjęto: 08.03.1994 r.

Adres autorów: Katedra i Zakład Biochemii i Chemii

Śląskiej Akademii Medycznej ul. Medyków 14, 40-752 Katowice

CZYNNIKI WZROSTOWE W JAJNIKU *

GROWTH FACTORS IN THE OVARY

Tadeusz KAMIŃSKI, Jadwiga PRZAŁA

Instytut Fizjologii Zwierząt, Akademia Rolniczo-Techniczna, Olsztyn

Streszczenie. Czynniki wzrostowe wpływają na wzrost i/lub różnicowanie komórek jajnika. Ich sekrecja, jak również wpływ na funkcje jajnika bywa często uzależniony od gonadotropin oraz produkowanych lokalnie hormonów, innych czynników wzrostu bądź nośników białkowych. EGF generalnie osłabia sterydogenезę, hamuje też indukowany przez FSH wzrost ilości receptorów dla LH w błonach komórek ziarnistych. Zbliżone działanie wykazuje FGF. Jest on oprócz tego aktywnym czynnikiem angiogenicznym. Przeciwny efekt przeważa w przypadku TGF β – odnosi się to zarówno do jego wpływu na sterydogenезę, jak i kontroli ilości receptorów LH. Także IGFs stymulują sterydogenезę w komórkach jajnika. IGFs mają specyficzne dla siebie nośniki o działaniu hamującym ich wpływ na jajnik.

Słowa kluczowe: jajnik, proliferacja, czynniki wzrostowe.

Summary. Growth factors have some effects on growth and/or differentiation of ovarian cells. Their secretion and influence on ovarian function is often depended upon gonadotropins, locally produced hormones, other growth factors or protein carriers. EGF generally diminishes steroidogenesis, inhibits FSH-induced formation of LH receptors in membranes of granulosa cells. Similar action exists to a certain degree in the case for FGF. Besides FGF shows an angiogenic activity. Conversely, TGF β induces steroidogenesis and the increase in the number of LH receptors. IGFs also stimulate steroidogenesis in ovarian cells, IGFs possess specific protein carriers. These proteins can impact on ovarian functions in a manner which is generally opposite to that of IGFs themselves.

Key words: ovary, proliferation, growth factors.

Badania dotyczące procesów wzrostowych jajnika wskazują na istotną rolę miejscowych regulatorów wzrostu, które działają w drodze auto- lub parakrynej. Pierwsze obserwacje dotyczące obecności czynników wzrostowych w jajnikach pochodzą z połowy lat 70 [42]. Stwierdzono wówczas, że epidermalny czynnik wzrostowy oraz fibroblastyczny czynnik wzrostowy nasilają proliferację komórek warstwy ziarnistej. Kilka lat później pojawiły się doniesienia o wpływie innych czynników wzrostowych na różnicowanie oraz funkcje endokryne komórek jajnika. Z kolei wyniki ostatnich prac rozszerzyły informacje o roli czynników wzrostowych sugerując ich wpływ na angiogenезę oraz selekcję i atreżję pęcherzyków. Ich działanie nie zostało jeszcze dobrze poznane, stąd w piśmiennictwie można spotkać sprzeczne doniesienia na temat ich funkcji.

*Praca finansowana przez KBN w ramach badań statutowych.

INSULINOPODOBNE CZYNNIKI WZROSTOWE (IGFs)

Insulinopodobne czynniki wzrostowe obejmują rodzinę polipeptydów stymulujących proliferację i różnicowanie komórek oraz wpływających na metabolizm w sposób zbliżony do insuliny. Należą do niej: IGF-I (zwany także somatomedyną C) – jednołańcuchowy peptyd o masie ok. 7,6 kDa, zbliżony do niego budową IGF-II o masie ok. 7,4 kDa oraz insulina. Stopień homologii między czynnikami wzrostu sięga 65% [97], natomiast między IGF-I i IGF-II a insuliną – odpowiednio 43 i 41% [26].

Głównym źródłem IGF-I w jajniku wydają się być komórki warstwy ziarnistej [4]. U szczura mają one bowiem mRNA dla IGF-I [54, 91]. Podobnie, IGF-II wyizolowano z płynu pęcherzykowego kobiet [94] i przypuszcza się, że miejscem jego produkcji są również komórki warstwy ziarnistej [118]. Z kolei u świń stwierdzono występowanie mRNA dla IGF-II w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego [51].

Wpływ na syntezę i uwalnianie w jajniku IGF-I mają: gonadotropiny, hormon wzrostu, hormony sterydowe, a także inne czynniki wzrostowe. Gonadotropiny wznagają wytwarzanie IGF-I przez komórki warstwy ziarnistej świń *in vitro* [58] oraz *in vivo* [50]. W jajniku szczura poziom mRNA dla IGF-I jest niski w proestrus i wysoki w estrus [22], co także potwierdza udział gonadotropin w regulacji produkcji IGF-I. Podobne różnice w koncentracji tego peptydu występują w płynie pęcherzykowym w zależności od rodzaju pęcherzyka – najwyższą koncentrację wykazano w pęcherzykach przedowulacyjnych [49]. Podanie świniom hCG i PMSG zwiększa stężenie IGF-I w płynie pęcherzykowym jednocześnie ze wzrostem stężenia progesteronu i estradiolu. Natomiast nie udało się stwierdzić podwyższonego poziomu IGF-I w surowicy, co sugeruje auto- bądź parakryne działanie IGF-I w jajniku [50]. W badaniach na świniach stwierdzono, że gonadotropiny nasilają syntezę mRNA dla IGF-I w komórkach warstwy ziarnistej [52]. Podobne działanie wykazują agoniści cAMP. Stymulatorem wytwarzania IGF-I okazał się także estradiol [58] oraz hormon wzrostu [51]. Estradiol działa synergistycznie z FSH stymulując wytwarzanie IGF-I, przy czym jego działanie jest hamowane przez inhibitor syntezy białek – cykloheksamid [58]. Nasuwa to przypuszczenie, że estradiol i FSH nasilają syntezę *de novo* tego peptydu. Czynnikiem wpływającym na wytwarzanie IGF-I są też EGF oraz PDGF w połączeniu z EGF [83].

Znacznie mniej wiadomo na temat regulacji wydzielania IGF-II. Zaobserwowano, że zarówno gonadotropiny, jak i hormon wzrostu nie są w stanie pobudzić wydzielania IGF-II u świń *in vivo* [98]. Także w badaniach *in vitro* hormony przysadki czy sterydy, które znane są jako stymulatory wydzielania IGF-I, w odniesieniu do IGF-II takiego działania nie wykazały [51]. Zatem regulacja syntezy i sekrecji IGF-I oraz IGF-II wydają się być całkowicie różne.

Tak IGF-I, jak i IGF-II mają specyficzne dla siebie receptory w komórkach jajnika. Receptor dla IGF-I składa się z czterech łańcuchów: dwóch α i dwóch β [119], receptor dla IGF-II natomiast ma strukturę monomeru [77]. Z uwagi na duże podobieństwo występujące między omawianymi czynnikami, IGF-I może wiązać się z receptorem dla IGF-II i odwrotnie. Obecność receptorów stwierdzono w komórkach warstwy ziarnistej szczurów [6], świń [14] i owiec [86] oraz w komórkach warstwy ziarnistej, osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego i oocytach kobiet [12], a także w ciałku żółtym kobiet [90]. Ilość receptorów wzrasta pod wpływem FSH, LH i estradiolu [7]. Hormony gonadotropowe wznagają łączenie się IGF-I z jego własnym receptorem w komórkach warstwy ziarnistej szczurów, przy czym wpływ ten jest dodatkowo zintensyfikowany w obecności GH [7,53]. Ilość receptorów dla IGF-I (typu I), oprócz gonadotropin i GH, regulowana jest prawdopodobnie przez czynniki

wewnątrzjajnikowe. Iniekcja *in vivo* agonisty GnRH niedojrzałym szczurom z usuniętą przysadką spowodowała znaczące obniżenie ilości receptorów typu I. Przeciwny efekt miało podanie antagonisty GnRH [10].

Insulinopodobne czynniki wzrostowe mają co najmniej sześć nośników białkowych – IGFs [13, 101, 102]. Ich znaczenie sprowadza się głównie do blokowania działania czynników wzrostowych, ale też do ochrony przed degradacją, a przez to do przedłużenia ich półokresu trwania. Obecność wymienionych białek stwierdzono w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego, komórkach warstwy ziarnistej i komórkach stromy jajnika [86]. Ich stężenie w płynie z małych pęcherzyków oraz pęcherzyków atrezyjnych jest znacznie wyższe w porównaniu do płynu uzyskanego z pęcherzyków dużych [23, 51]. Zarówno FSH, jak i związki aktywujące cyklazę adenylową (forskolina, toksyna cholery) czy też analogi cAMP hamują wytwarzanie IGFs [47]. Przeciwny efekt daje GH [98] oraz estradiol i EGF [85]. Podobnie insulina oraz IGF-I wzmagają produkcję IGFs [46, 47]. Stwierdzono, że nośniki białkowe hamują stymulowaną przez FSH sterydogenezę w komórkach warstwy ziarnistej oraz wychwytywanie przez nie ^3H -tyminy [17] blokując owulację z pęcherzyków jajnikowych *in vivo* [16].

Insulinopodobne czynniki wzrostowe wpływają na proliferację, różnicowanie oraz sterydogenezę komórek jajnika. Istnieją podstawy, aby sądzić, że IGFs pośredniczą w działaniu FSH na komórki warstwy ziarnistej, ponieważ podanie przeciwciał dla IGF-I hamuje zarówno sterydogenezę w komórkach warstwy ziarnistej indukowanych przez FSH, jak i ich wzrost [17]. IGFs zwiększają sekrecję progesteronu przez komórki warstwy ziarnistej [105, 116, 117] oraz luteinowe [65]. Jak wspomniano wcześniej, stężenie IGF-I i progesteronu w płynie pęcherzykowym są dodatnio skorelowane [106]. Można stąd przypuszczać o istnieniu powiązań między wydzielaniem obu związków. Poza progesteronem również sekrecja estradiolu [31, 109], inhibiny [18, 123] oraz proteoglikanów [9] pobudzana jest przez IGF-I. W komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego IGF-I działają synergistycznie z gonadotropinami wzmagając produkcję androgenów [21, 24]. Zaobserwowano też stymulujące oddziaływanie IGF-I na uwalnianie oksytocyny przez komórki granulozy pochodzące od krów [99]. IGFs osiągają swój wielokierunkowy wpływ na jajniki przez ułatwienie wytwarzania receptorów dla LH [8], nasilenie indukowanej przez FSH syntezy cAMP [8], pobudzanie wychwytywania lipoprotein i obrotu cholesterolu w komórce [51], czy wreszcie uaktywnienie cytochromu $\text{P}_{450\text{scC}}$, 17α hydroksylazy [74] oraz aromatazy [109].

EPIDERMALNY CZYNNIK WZROSTOWY (EGF)

Jest to peptyd złożony z 53 aminokwasów układających się w pojedynczy łańcuch. Jego występowanie stwierdzono w komórkach warstwy ziarnistej, luteinowych, osłonki wewnętrznej oraz w oocycie kobiet [75], w komórkach warstwy ziarnistej chomików [95] oraz w płynie pęcherzykowym świń [59]. Stężenie EGF w płynie z małych pęcherzyków jajnikowych jest znacznie wyższe w porównaniu do płynu pobranego z pęcherzyków średnich i dużych. Podobnie, immunohistochemiczne badania obecności EGF w komórkach warstwy ziarnistej chomików wykazały, że intensywność barwienia komórek pobranych z pęcherzyków preantralnych była wyższa od tych, które pochodziły z pęcherzyków antralnych. Udowodniono występowanie EGF w pęcherzykach pierwotnych ludzkich noworodków [1]. Przypuszczalnie jajniki są też miejscem syntezy EGF, bowiem małe ilości mRNA dla EGF znaleziono w jajniku

myszy [93]. Kluczową rolę w regulacji poziomu epidermalnego czynnika wzrostowego wydają się pełnić gonadotropiny. Wykazano, że usunięcie przysadki powoduje zanik obecności EGF w komórkach warstwy ziarnistej, natomiast iniekcja FSH przywraca poprzedni stan. Z kolei podanie LH pozwala zaobserwować występowanie EGF także w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka [96].

Receptory dla EGF zostały zlokalizowane: w komórkach granulocy [1, 33, 57, 75], komórkach luteinowych [1, 25, 75], osłonki wewnętrznej, oocycie [75] i pęcherzykach atrezyjnych [25].

Podanie szczurom z usuniętą przysadką FSH lub LH powoduje zwiększenie ilości receptorów dla EGF, natomiast iniekcje prolaktyny, analogu GnRH bądź estradiolu nie mają takiego wpływu [108]. Liczba receptorów EGF w błonie komórkowej komórek warstwy ziarnistej u szczurów uległa zwiększeniu w odpowiedzi na FSH oraz analog cAMP. Przeciwny efekt zanotowano w przypadku jajników świń, podanie FSH doprowadziło do spadku ich ilości [20].

Stwierdzono wyraźny wpływ epidermalnego czynnika wzrostowego na sterydogenezę jajnikową. W pochodzących od kobiet i szczurów komórkach warstwy ziarnistej hodowanych *in vitro*. EGF zmniejsza produkcję estradiolu stymulowaną przez FSH [1]. Podobnie, po iniekcji EGF owcom w okresie okołorodowym stwierdzono spadek poziomu estrogenów w osoczu [100]. Zaobserwowano stymulujący wpływ EGF na wytwarzanie progesteronu oraz na poziom mRNA dla cytochromu P₄₅₀_{scc} w komórkach warstwy ziarnistej szczurów [114]. U owiec dodatni wpływ EGF na stężenie progesteronu we krwi widoczny był jedynie w fazie pęcherzykowej po wylewie LH, w innych okresach cyklu estralnego takiego efektu nie zanotowano [100]. W przypadku ludzkich komórek ziarnistych synteza progesteronu, zarówno podstawowa jak i stymulowana przez hCG, ulegała nasileniu pod wpływem epidermalnego czynnika wzrostu [95]. U szczurów komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyka pobudzone hCG reagowały na podanie EGF obniżeniem wytwarzania androgenów [1]. EGF nie tylko stymuluje aktywność mitotyczną komórek i reguluje sterydogenezę, ale może także pobudzać wytwarzanie tkankowego aktywatora plazminogenu przez komórki warstwy ziarnistej [36], przyspieszać dojrzewanie oocytów [28], a także zwiększać sekrecję IGF-I przez komórki warstwy ziarnistej świń [83] oraz nasilać syntezę mRNA dla follistatyny [71]. Z drugiej strony może hamować stymulowany przez FSH wzrost ilości receptorów dla LH [62] oraz wytwarzanie inhibiny [124]. Rola EGF w rozwoju i różnicowaniu pęcherzyka może być zatem pobudzająca szczególnie we wczesnej jego fazie, niezależna od gonadotropin. Obserwowany wpływ hamujący na funkcje komórek warstwy ziarnistej, zależny od FSH może wynikać z przekształcania się pęcherzyka w pęcherzyk atrezyjny [79].

TRANSFORMUJĄCY CZYNNIK WZROSTOWY α (TGF α)

TGF α jest 50-aminokwasowym peptydem o budowie wykazującej duży stopień podobieństwa z EGF i działa na komórki przez receptor EGF [1].

W jajniku TGF α zlokalizowany jest w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka [64, 72]. Komórki osłonki mają również mRNA dla TGF α [103], przy czym jego ilość ulega podwyższeniu pod wpływem FSH [64].

TGF α nasila u bydła wzrost komórek osłonki wewnętrznej pęcherzyka i komórek warstwy ziarnistej [103]. Stwierdzono też zahamowanie produkcji estrogenów w komórkach ziarnistych szczurów stymulowanych przez FSH [2].

INHIBINA, AKTYWINA I TRASFORMUJĄCY CZYNNIK WZROSTOWY β (TGF β)

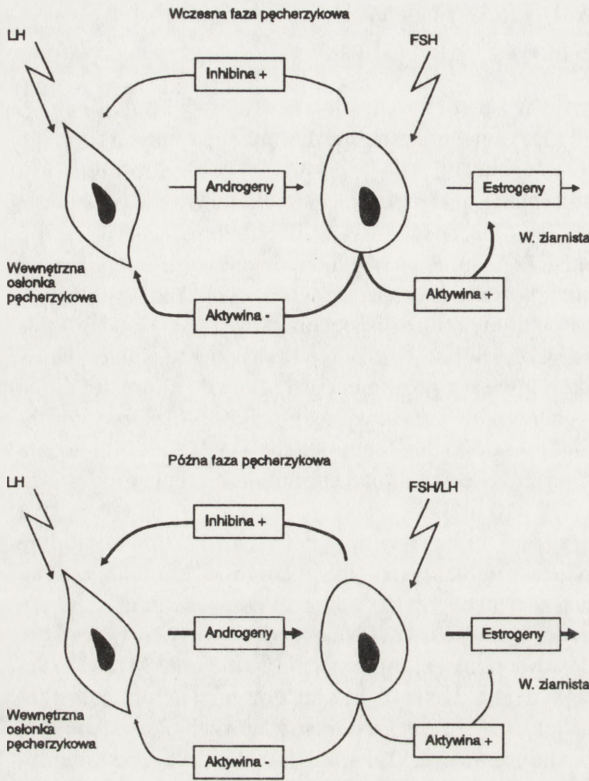
Inhibina jest glikoproteidem utworzonym z dwóch różnych łańcuchów α i β . Łańcuch β (13 kDa) jest mniejszy niż łańcuch α (20 kDa) i może występować w dwóch różnych formach β_A i β_B , zatem można wyróżnić trzy subjednostki: α -, β_A i β_B . W jajniku inhibina jest syntetyzowana przez komórki warstwy ziarnistej, a jej produkcja jest stymulowana przez FSH i regulowana przez LH, IGF-1 oraz EGF. Obecność mRNA dla inhibiny α -, β_A i β_B wykazano w komórkach warstwy ziarnistej i komórki te są także docelowym miejscem jej działania [27, 113, 115]. W badaniach przeprowadzonych na krowach wykazano współzależność pomiędzy koncentracją inhibiny a poziomem atrezji pęcherzyków [48]. Koncentracja subjednostki α inhibiny w płynie pęcherzykowym jest wyższa podczas wzrostu pęcherzyków niż podczas regresji i jest pozytywnie skorelowana z poziomem estradiolu do androstendionu ($r=0,78$), natomiast podczas regresji pęcherzyków wzrasta koncentracja $\alpha\beta$ dimeru i występuje negatywna korelacja poziomu estradiolu do androstendionu ($r=-0,92$). Inhibina działa supresyjnie na uwalnianie FSH, hamuje produkcję estradiolu i stymuluje sekrecję progesteronu.

Gonady produkują także aktywinę A ($\beta_A\backslash\beta_A$) i aktywinę AB ($\beta_A\backslash\beta_B$), która stymuluje biosyntezę i sekrecję FSH. Aktywina jest produkowana przez komórki granulozy, skąd dyfunduje do komórek osłonki wewnętrznej pęcherzyka, gdzie blokuje działanie LH, co prowadzi do osłabienia syntezy androgenów [56, 120, 121].

TGF β należy do rodziny polipeptydów obejmującej inhibinę, aktywinę oraz MIS (*Mullerian inhibiting substance*). TGF β jest peptydem o masie 25 kDa złożonym z dwóch jednakowych podjednostek. Każda z podjednostek ma 9 reszt cysteiny, z których 7 występuje w innych peptydach tej grupy. Sekwencja aminokwasów TGF β ludzi, świń i bydła jest identyczna, w porównaniu do ułożenia aminokwasów w łańcuchu TGF β u szczurów różni ją tylko jeden aminokwas [107]. Sugeruje się, że TGF β jest wydzielany w formie nieczynnej biologicznie, a następnie aktywowany przez plazminę [1]. Sklonowano dotychczas 3 geny TGF β – oznaczone odpowiednio TGF β_1 , TGF β_2 i TGF β_3 [1].

Obecność transformującego czynnika wzrostowego β stwierdzono w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka szczurów, bydła [104] i świń, ciała żółtych świń [37] oraz w komórkach warstwy ziarnistej szczurów [61]. W komórkach warstwy ziarnistej u ludzi i szczurów wykazano również mRNA dla TGF β_1 i TGF β_2 [87, 88]. Bardzo niewiele wiadomo na temat regulacji wytwarzania i sekrecji TGF β . Przypuszczalnie uczestniczy w niej FSH obniżając poziom mRNA dla TGF β w komórkach warstwy ziarnistej [87]. Odnośnie roli TGF β we wzroście jajnika istnieją sprzeczne doniesienia. Obok wyników badań wykazujących stymulujący wpływ TGF β na wzrost komórek jajnika [15, 30], są też takie mówiące o TGF β jako lokalnym inhibitorze proliferacji [82, 104]. Nie brak też wyników prac zaprzeczających jakoby TGF β w jakikolwiek sposób oddziaływał na wzrost komórek jajnika [5, 29].

W licznych pracach udowodniono istotną rolę TGF β w regulacji sterydogenezy. Stwierdzono, że dodanie do hodowli komórek osłonki wewnętrznej pęcherzyka i warstwy ziarnistej pochodzących od szczurów TGF β razem z FSH znacznie podwyższa aktywność aromatazy [5, 60] oraz stymuluje wytwarzanie progesteronu [29, 60]. Z kolei komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyka uzyskane od świń i hodowane z hCG jak i te, do których hCG nie było



Rys. 1. Hipotetyczna rola inhibiny i aktywiny w pęcherzyku jajnikowym wg Hilliera i Patha [56]; wczesna faza pęcherzykowa cyklu estralnego – aktywna produkowana przez komórki warstwy ziarnistej niedojrzałych pęcherzyków wzmacniający wpływ FSH na aromatazę tłumiąc jednocześnie syntezę androgenów w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka; późna faza pęcherzykowa cyklu estralnego – komórki warstwy ziarnistej przedowulacyjnych pęcherzyków odpowiadają na pobudzenie ze strony FSH i LH wzrostem produkcji inhibiny, równoległe obniża się wytwarzanie aktywiny, prowadzi to do wzrostu syntezy androgenów w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka, co w konsekwencji umożliwia też zwiększoną produkcję estrogenów przez komórki ziarniste

ziarnistych [89] oraz w komórkach luteinowych krów [110]. Ekspresja mRNA dla bFGF w komórkach luteinowych krów była pobudzana przez LH i angiotensynę II. Informacyjny RNA dla aFGF znaleziono natomiast w komórkach ziarnistych niedojrzałych płciowo szczurów, którym podano gonadotropiny [63].

Działanie FGF jest prawdopodobnie modulowane przez $TGF\beta$ i składnik błony podstawnej warstwy ziarnistej [39, 76]. Sugerowany jest udział FGF w rozbiciu błony podstawnej w okresie owulacji i formowania się ciała żółtego. Jest to możliwe dzięki zwiększeniu przez

dołączone, odpowiedziały na $TGF\beta$ wzrostem sekrecji estrogenów przy obniżonym wydzielaniu androgenów i progesteronu [24].

Wykazano także synergistyczne działanie $TGF\beta$ z LH w pobudzaniu produkcji cytochromu P_{450sc} [73]. Natomiast wpływ $TGF\beta$ na ciało żółte u bydła był różny w zależności od zastosowanej metodyki. Dodanie $TGF\beta$ do hodowli komórek luteinowych powodowało obniżenie uwalniania progesteronu i oksytocyny, natomiast wykorzystując system mikrodializy ciała żółtego stwierdzono pobudzające działanie tego czynnika na uwalnianie obu tych hormonów [81]. $TGF\beta$ powoduje też wzrost stymulowanej przez FSH indukcji receptorów LH oraz EGF w błonach komórek ziarnistych szczura [25, 32].

FIBROBLASTOWY CZYNNIK WZROSTOWY (FGF)

Występują dwie formy FGF: zasadowa (bFGF) zbudowana ze 146 aminokwasów i kwasowa (aFGF) mająca 140 aminokwasów. Mimo że są wytwarzane przez różne geny, podobieństwo budowy obu peptydów jest bardzo duże, łączą się też z tym samym receptorem. Oba rodzaje FGF wytwarzane są w jajniku. Syntezę bFGF stwierdzono w komórkach

ten czynnik syntezy tkankowego aktywatora plazminogenu w komórkach ziarnistych [67]. Wykazano też, że bFGF jest aktywnym czynnikiem angiogenicznym w ciałku żółtym [41].

Stosunkowo dobrze udokumentowany jest wpływ bFGF na różnicowanie komórek jajnika. W komórkach ziarnistych szczurów bFGF obniża aktywność aromatazy pobudzanej przez FSH [3], nie osłabia natomiast sekrecji estrogenów stymulowanej przez forskolinę. Powoduje także zmniejszenie liczby receptorów dla LH indukowanych przez FSH [84] oraz zahamowanie syntezy inhibiny [66] i relaksyny [112]. Wpływ bFGF na sekrecję progesteronu jest różny w zależności od gatunku: u świń widoczne jest zahamowanie [19], u szczurów i ludzi pobudzenie wydzielania progesteronu [40, 111]. W ciałku żółtym krów poddanych mikrodializie zauważalne jest wyraźne pobudzenie sekrecji progesteronu i oksytocyny pod wpływem tego peptydu [81]. Niewykluczony jest też udział bFGF w regulacji apoptozy komórek ziarnistych i komórek luteinowych [122].

PŁYTKOWY CZYNNIK WZROSTOWY (PDGF)

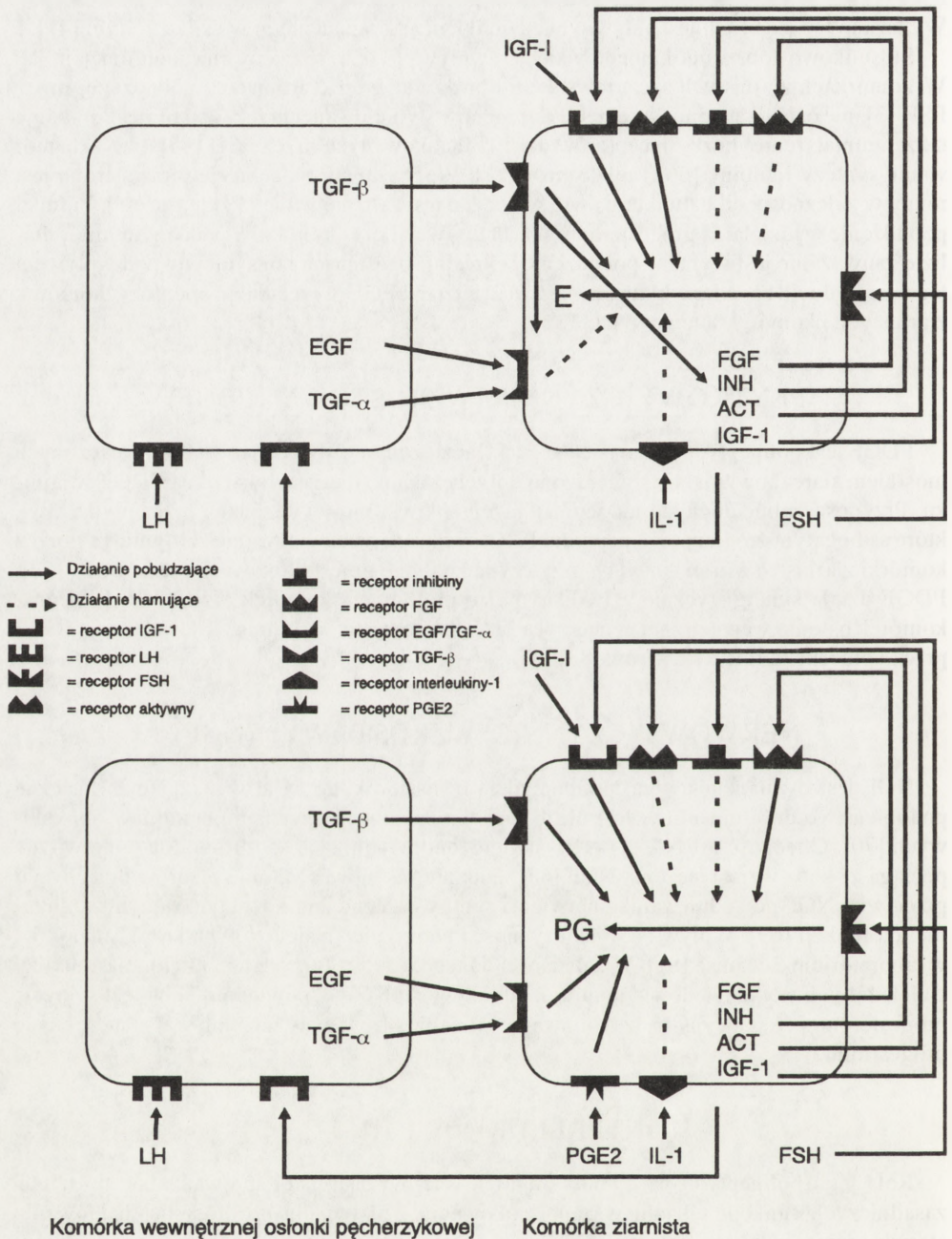
PDGF jest polipeptydem o masie ok. 31 kDa, złożonym z dwóch łańcuchów połączonych mostkiem siarczkowym. Nie stwierdzono dotychczas lokalnego wytwarzania PDGF w jajniku. Przypuszczalnie dociera on do gonad razem z krwią i jest wydzielany przez płytki krwi, które są bogatym źródłem tego peptydu. PDGF wzmacnia wychwytywanie ^3H -tymidyny przez komórki ziarniste świń *in vitro* [1], przy czym działanie to jest blokowane przez $\text{TGF}\beta$ [82]. PDGF działa synergistycznie z EGF nasilając proliferację komórek ziarnistych [80] oraz komórek osłonki wewnętrznej pęcherzyka [78]. Zwiększa też wspólnie z EGF sekrecję IGF-I przez komórki ziarniste szczurów [83].

NERWOWY CZYNNIK WZROSTOWY (NGF)

NGF jest dwułańcuchowym polipeptydem o masie ok. 26 kDa, wykazującym znaczne podobieństwo do proinsuliny. Jest niezbędny w rozwoju i odżywianiu neuronów obwodowych [70]. Obecność mRNA dla NGF stwierdzono w jajnikach szczurów. Ich odnerwienie pociąga za sobą wzrost stężenia NGF [68]. Podanie zaś noworodkom szczurów przeciwciał przeciwko NGF powoduje zanik unerwienia sympatycznego jajników i tym samym zaburzenie ich funkcji [69]. Wpływ NGF na czynność endokrynną ciałek żółtych krów badany był w laboratorium Schamsa [81]. W zależności od tego, czy wykorzystano system mikrodializy ciałek żółtych czy też hodowle komórek luteinowych, NGF odpowiednio pobudzał sekrecję progesteronu i oksytocyny bądź hamował uwalnianie oksytocyny nie wpływając na sekrecję progesteronu.

INTERLEUKINA 1 (IL-1)

Rola tego polipeptydu na terenie komórek warstwy ziarnistej sprowadza się do trzech zasadniczych funkcji: udziału w zapoczątkowaniu i ułatwianiu proliferacji, hamowaniu sterydogenezy indukowanej przez FSH oraz ekspresji receptora dla LH, hamowaniu stymulowanej przez LH morfologicznej luteinizacji komórek ziarnistych [34, 35, 43, 44, 45].



Rys. 2. Autokryny i parakryny wpływ czynników wzrostu na działanie FSH oraz syntezę estradiolu i progesteronu, schemat zamieszczony w pracy Gordana i wsp. [38]

INNE CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA PROCESY WZROSTOWE JAJNIKA

W jajniku produkowane są hormony lub prekursorzy hormonów, takie jak: GnRH, pro-opiomelanokortyna (POMC), lokalny układ renina-angiotensyna. Wpływ GnRH na jajnik może być pobudzający lub hamujący w zależności od stadium rozwoju pęcherzyka. W początkowych stadiach rozwoju GnRH wywiera wpływ hamujący, obniżając tworzenie receptora dla LH i sterydogenezę. Natomiast w pęcherzykach przedowulacyjnych pobudza syntezę progesteronu i wpływa na proces owulacji [11, 55].

Rola jajnikowych opioidów oraz czynników układu renina-angiotensyna w procesach wzrostowych jajnika jest dopiero badana. Ważną rolę w jajniku odgrywają także prostaglandyny czy oksytocyna, które mogą działać jako regulatory sterydogenezы. Wykrycie czynników lokalnych wytwarzanych przez gonady i ich udział w miejscowej regulacji to wynik doświadczeń naukowych ostatnich lat w odróżnieniu od mechanizmów centralnych, które były i są przedmiotem badań wielu dziesięcioleci.

Lokalne regulatory są czynnikami modulującymi funkcje komórek, przez które są wytwarzane (regulatory autokryne) lub komórek sąsiednich (regulatory parakryne). Generalnie czynniki wzrostowe są niezbędne dla przygotowania wejścia komórki w fazę G_1 cyklu komórkowego, następnie w fazę S i rozpoczęcia syntezy DNA [92].

TABELA. Charakterystyka jajnikowych czynników wzrostu

| Czynnik wzrostu | Masa cząsteczkowa [kDa] | Działanie | Lokalizacja | Komórki docelowe |
|-----------------|-------------------------|------------------------------------------------|-------------------|---------------------|
| IGF-I | 7,6 | >LH-R, E ₂ , P ₄ , A | GC | GC, TC, CL, oocyt |
| IGF-II | 7,4 | >LH-R, E ₂ , P ₄ , A | GC, TC | GC, TC |
| EGF | 6,1 | <LH-R, E ₂ , >FSH-R, P ₄ | GC, TC, CL, oocyt | GC, TC, CL, oocyt |
| TGF α | 5,6 | <E ₂ | TC | GC |
| Inhibina | 32 | <E ₂ , >P ₄ , A | GC | GC |
| Aktywina | 28 | >E ₂ , <P ₄ , A | GC | TC |
| TGF β | 25 | >LH-R, E ₂ , P ₄ , <A | GC, TC, CL | GC, TC, CL |
| FGF | 15 | >P ₄ , <LH-R, E ₂ | GC, CL | GC, CL |
| PDGF | 31 | | | GC, TC |
| NGF | 26 | >P ₄ | jajnik szczurów | CL, jajnik szczurów |
| IL-1 | 17,5 | <LH-R, E ₂ , P ₄ | makrofagi | GC |

GC – komórki ziarniste, TC – komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyka, CL – ciało żółte, FSH-R – receptor FSH, LH-R – receptor LH, P₄ – progesteron, E₂ – estradiol, A – androgeny, > – wzrost, < – spadek

LITERATURA

- [1] ACKLAND JF, SCHWARTZ NB, MAYO KE, DODSON RE. Nonsteroidal signals in the gonads. *Physiol Rev* 1992; 72: 731–787.
- [2] ADASHI EY, RESNICK CE. Antagonistic interactions of transforming growth factors in the regulation of granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 1986; 119: 1879–1881.
- [3] ADASHI EY, RESNICK CE, CROFT CS, MAY IV, GOSPODAROWICZ D. Basic fibroblast growth factors as a regulator of ovarian granulosa cell differentiation: a novel non-mitogenic role. *Mol Cell Endocrinol* 1988; 55: 7–14.
- [4] ADASHI EY, RESNICK CE, D'ERCOLE AJ, SVOBODA ME, van WYK JJ. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 1985; 6: 400–421.

- [5] ADASHI EY, RESNICK CE, HERNANDEZ ER, MAY JV, PURCHIO AF, TWARDZIK DR. Ovarian transforming growth factor- β (TGF- β): cellular site(s), and mechanism (s) of action. *Mol Cell Endocrinol* 1989; **61**: 247–256.
- [6] ADASHI EY, RESNICK CE, HERNANDEZ ER, SVOBODA ME, van WYK JJ. Characterization and regulation of a specific cell membrane receptor for somatomedin-C/insulin-like growth factor I in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1988; **122**: 194–201.
- [7] ADASHI EY, RESNICK CE, SVOBODA ME, van WYK JJ. Follicle stimulating hormone enhances somatomedin-C binding to cultured rat granulosa cells: evidence for c-AMP dependence. *J Biol Chem* 1986; **261**: 3923–3926.
- [8] ADASHI EY, RESNICK CE, SVOBODA ME, van WYK JJ. Somatomedin-C enhances induction of LH receptors by FSH in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1985; **116**: 2369–2375.
- [9] ADASHI EY, RESNICK CE, SVOBODA ME, van WYK JJ, HASCALL VC, YANAGISHITA M. Independent and synergistic activities of somatomedin-C in the stimulation of proteoglycan in the cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1986; **118**: 456–463.
- [10] ADASHI EY, RESNICK CE, VERA A, HERNANDEZ E. In vivo regulation of granulosa cell type-I insulin-like growth factors receptors: evidence for an inhibitory role for the putative endogenous ligand(s) of the ovarian gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrinology* 1991; **128**: 3130–3139.
- [11] AMSTERDAM A, ROTMENSCH S. Structure-function relationship during granulosa cell differentiation. *Endocrine Rev* 1987; **8**: 309–337.
- [12] BALBONI GC, VANNELLI GB, BARNIT, ORLANDO C, SERIO M. Transferrin and somatomedin-C receptors in the human ovarian follicles. *Fertil Steril* 1987; **48**: 706–712.
- [13] BALLARD FJ, BAXTER RC, BINOUX M, CLEMMONS DR, DROP SLS, HALL K, HINTZ RI, RECHLER MM, RUTANEN EM, SCHWANDER JC. Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; **70**: 817–818.
- [14] BARANAO JLS, HAMMOND JM. Comparative effects of insulin and insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **124**: 484–490.
- [15] BENDELL JJ, DORRINGTON J. Rat theca/interstitial cells secrete a transforming growth factor- β -like factor that promotes growth and differentiation in rat granulosa cell. *Endocrinology* 1988; **123**: 941–948.
- [16] BICSAK TA, LING N, DE PAOLO LV. Ovarian intrabursal administration of insulin-like growth factor-binding protein inhibits follicle rupture in gonadotropin-treated immature rats. *Biol Reprod* 1991; **44**: 599–603.
- [17] BICSAK TA, SHIMONAKA M, MALKOWSKI M, LING M. Insulin-like growth factor-binding protein (IGF-BP) inhibition of granulosa cell function: effect on cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, deoxyribonucleic acid synthesis and comparison with the effect of an IGF-I antibody. *Endocrinology* 1990; **126**: 2184–2189.
- [18] BICSAK TA, TUCKER EM, CAPPEL S, VAUGHAN J, RIVIER J, VALE W, HSUEH AJW. Hormonal regulation of granulosa cell inhibition biosynthesis. *Endocrinology* 1986; **119**: 2711–2720.
- [19] BISWAS SB, HAMMOND SW, ANDERSON LD. Fibroblast growth factors from bovine pituitary and human placenta and their function in the maturation of porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 1988; **123**: 559–566.
- [20] BUCK PA, SCHOMBERG DW. ¹²⁵I-iodo epidermal growth factor binding and mitotic responsiveness of porcine granulosa cells are modulated by differentiation and follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 1988; **122**: 28–33.
- [21] CARA JF, ROSENFELD RL. Insulin-like growth factor I and insulin potentiate luteinizing hormone-induced androgen synthesis by rat ovarian thecal interstitial cells. *Endocrinology* 1988; **123**: 773–739.
- [22] CARLSSON B, CARLSSON L, BILLIG H. Estrous cycle-dependent co-variation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) messenger ribonucleic acid and protein in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1989; **64**: 271–275.
- [23] CATALDO NA, GIUDICE LC. Insulin-like growth factor binding protein profiles in human ovarian follicular fluid correlate with follicular functional status. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; **74**: 821–829.
- [24] CAUBO B, DEVINNA RS, TONETTA SA. Regulation of steroidogenesis in cultured porcine theca cells by growth factors. *Endocrinology* 1989; **125**: 321–326.
- [25] CHABOT JG, ST-ARNAUD R, WALKER P, PELLETIER G. Distribution of epidermal growth factor receptors in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1986; **44**: 99–108.
- [26] DAUGHADAY WH, ROTWEIN P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989; **10**: 68–91.
- [27] DE JONG FH. Inhibin. *Physiol Rev* 1988; **68**: 555–607.
- [28] DEKEL N, SHERIZLY I. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology* 1985; **116**: 406–409.
- [29] DODSON WC, SCHOMBERG DW. The effect of transforming growth factor- β on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1987; **120**: 512–516.

- [30] DORRINGTON JH, BENDELL JJ, KHAN SA. Interactions between FSH, estradiol-17 and transforming growth factor- β regulate growth and differentiation in the rat gonad. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; **44**: 441–447.
- [31] ERICKSON GF, GARZO VG, MAGOFFIN DA. Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; **69**: 716–724.
- [32] FENG P, CATT KJ, KNECHT M. Transforming growth factor- β regulates the inhibitory action of epidermal growth factor during granulosa cell differentiation. *J Biol Chem* 1986; **261**: 14167–14170.
- [33] FUJINAGA H, YAMOTO M, NAKANO R, SHIMA K. Epidermal growth factor binding sites in porcine granulosa cells and their regulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 1992; **46**: 705–709.
- [34] FUKUOKA M, MORI T, TAI S, YASUDA K. Interleukin 1 inhibits luteinization of porcine granulosa cells in culture. *Endocrinology* 1987; **122**: 367–369.
- [35] FUKUOKA M, YASUDA K, TAI S, TAKAKURA K, MORI T. Interleukin 1 stimulates growth and inhibits progesterone secretion in the cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1988; **124**: 884–890.
- [36] GALWAY AB, OIKAWA M, NY T, HSUEH AJW. Epidermal growth factor stimulates tissue plasminogen activator activity and messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells: mediation by pathways independent of protein kinases-A and -C. *Endocrinology* 1989; **125**: 126–135.
- [37] GANGRADE BK, MAY JV. The production of transforming growth factor- β in the porcine ovary and its secretion in vitro. *Endocrinology* 1990; **127**: 2372–2380.
- [38] GIORDANO G, BARRECA A, MINUTO F. Growth factors in the ovary. *J Endocrinology Invest* 1992; **15**: 689–707.
- [39] GOSPODAROWICZ D. Fibroblast growth factor: involvement in early embryonic development and ovarian function. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 1989; **7**: 21–28; Thieme Medical Publishers, New York.
- [40] GOSPODAROWICZ D. Molecular characterization of fibroblast growth factor and possible role in early and late embryonic development. Growth factors and the ovary 1989; 75–94.
- [41] GOSPODAROWICZ D, CHENG J, LUI GM, BAIRD A, ESCH F, BOHLEN P. Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1985; **117**: 2383–2391.
- [42] GOSPODAROWICZ D, ILL CR, BIRDWELL CR. Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro. Characterization of the response of granulosa cells to FGF and EGF. *Endocrinology* 1977; **100**: 1108–1120.
- [43] GOTTSCHALL PE, KATSUURA G, DAHL RR, HOFFMANN ST, ARIMURA A. Discordance in the effects of interleukin 1 on rat granulosa cell differentiation induced by FSH or activators of adenylate cyclase. *Biol Reprod* 1988; **39**: 1074–1085.
- [44] GOTTSCHALL PE, KATSUURA G, HOFFMANN ST, ARIMURA A. Interleukin 1: an inhibitor of luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cell. *FASEB J* 1988; **2**: 2492–2496.
- [45] GOTTSCHALL PA, UEHARA A, HOFFMANN ST, ARIMURA A. Interleukin-1 inhibits FSH-induced differentiation in rat granulosa cell in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **149**: 502–507.
- [46] GRIMES RW, HAMMOND JM. Insulin and insulin-like growth factors (IGFs) stimulate production of IGF binding proteins by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1992; **131**–136.
- [47] GRIMES RW, SAMARAS SE, BARBER JA, SHIMASAKI S, LING N, HAMMOND JM. Gonadotropin and cAMP modulation of IGF binding protein production in ovarian granulosa cells. *Am J Physiol* 1992; **262**: 497–503.
- [48] GUILBAULT LA, RAMILLIER P, MATTON P, GLENCROSS RG, BEARD AJ, KNIGHT PG. Relationships between the level of atresia and inhibin contents (α subunit and $\alpha\beta$ dimer) in morphologically dominant follicles during their growing and regressing phases of development in cattle. *Biol Reprod* 1993; **48**: 268–276.
- [49] HAMMOND JM, BARANAO JLS, SKALERIS D, KNIGHT AB, ROMANUS JA, RECHLER MM. Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1985; **117**: 2553–2555.
- [50] HAMMOND JM, HSU CJ, KLINDT J, TSANG BK, DOWNEY BR. Gonadotropins increase concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I porcine follicular fluid in vivo. *Biol Reprod* 1988; **38**: 304–308.
- [51] HAMMOND JM, MONDSCHHEIN JS, SAMARAS SE, CANNING SF. The ovarian insulin-like growth factors, a local amplification mechanism for steroidogenesis and hormone action. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1991; **40**: 411–416.
- [52] HATEY F, LANGLOIS I, MUSSANT P, BONNET A, BENNE F, GASSER F. Gonadotropins induce accumulation of insulin-like growth factor-I mRNA in pig granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1992; **86**: 205–211.
- [53] HERNANDEZ ER, ROBERTS CT, HURWITZ A, LEROITH D, ADASHI EY. Rat ovarian insulin-like growth factor-II gene expression is theca-interstitial cell-exclusive: hormonal regulation and receptor distribution. *Endocrinology* 1990; **127**: 3249–3253.

- [54] HERNANDEZ ER, ROBERTS CT, LEROITH D, ADASHI EY. Rat ovarian insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene expression is granulosa cell selective: 5' untranslated mRNA variant representation and hormonal regulation. *Endocrinology* 1989; **125**: 572-574.
- [55] HILLENSJO T, LE MAIRE WJ. Gonadotropin releasing hormone agonist stimulates meiotic maturation of follicle enclosed rat oocytes in vitro. *Nature* 1980; **287**: 145-146.
- [56] HILLIER SG, PATH MRC. Paracrine control of follicular estrogen synthesis. (w) *Seminars in Reproductive Endocrinology*. Thieme Medical Publishers 1991; **9**: 332-340.
- [57] HOPKINS CR, BOOTHROYD B, GREGORY H. Early events following the binding of epidermal growth factor to surface receptors on ovarian granulosa cells. *Eur J Cell Biol* 1981; **24**: 259-265.
- [58] HSU CJ, HAMMOND JM. Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 1987; **120**: 198-207.
- [59] HSU CJ, HOLMES SD, HAMMOND JM. Ovarian epidermal growth factor-like activity, concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **147**: 242-247.
- [60] HUTCHINSON LA, FINDLAY JK, DEVOS FL, ROBERTSON DM. Effects of bovine inhibin, transforming growth factor- β and bovine activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **146**: 1405-1412.
- [61] KIM IC, SCHOMBERG DW. The production of transforming growth of factor- β activity by rat granulosa cell cultures. *Endocrinology* 1989; **124**: 1345-1351.
- [62] KNECHT M, CATT KJ. Modulation of cAMP-mediated differentiation in ovarian granulosa cells by epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 1983; **258**: 2789-2794.
- [63] KOOS RD, SEIDEL RH. Detection of acidic fibroblast growth factor mRNA in the rat ovary using reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **165**: 82-88.
- [64] KUDLOW JE, KOBRIN MS, PURCHIO AF, TWARDZIK DK, HERNANDEZ ER, ASA SL, ADASHI EY. Ovarian transforming growth factor- α gene expression: immunohistochemical localization to the theca interstitial cells. *Endocrinology* 1987; **121**: 1577-1579.
- [65] LANDHEIM RG, TESONE M, CHARREAU EH. Insulin action and characterization of insulin receptors in rat luteal cells. *Endocrinology* 1984; **115**: 752-756.
- [66] LAPOLT PS, PIQUETTE GN, SOTO N, SINCICH C, HSUEH AJ. Regulation of inhibin subunit messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1990; **127**: 823-831.
- [67] LAPOLT PS, YAMOTO M, VELJKOVIC M, SINCICH C, NY T, TSAFRIRI A, HSUEH AJ. Basic fibroblast growth factor induction of granulosa cell tissue-type plasminogen activator and oocyte maturation: potential role as a paracrine ovarian hormone. *Endocrinology* 1990; **127**: 2357-2363.
- [68] LARA HE, HILL DF, KATZ KH, OJEDA SR. The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: effect of denervation and hormonal treatment. *Endocrinology* 1990; **126**: 357-363.
- [69] LARA HE, MCDONALD JK, OJEDA SR. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 1990; **126**: 364-375.
- [70] LEVI-MONTALCINI R. The nerve growth factor 35 years later. *Science Wash* 1987; **237**: 1154-1162.
- [71] LINDSELL CE, MISRA V, MURPHY BD. Regulation of follistatin messenger ribonucleic acid in porcine granulosa cells by epidermal growth factor and the protein kinase-C pathway. *Endocrinology* 1993; **132**: 1630-1636.
- [72] LOBB DK, KOBRIN MS, KUDLOW JE, DORRINGTON JH. Transforming growth factor- α in the adult bovine ovary: identification in growing ovarian follicles. *Biol Reprod* 1989; **40**: 1087-1093.
- [73] MAGOFFIN D, GANCEDO B, ERICKSON GF. Transforming growth factor- β promotes differentiation of ovarian theca-interstitial cells but inhibits androgen production. *Endocrinology* 1989; **125**: 1951-1958.
- [74] MAGOFFIN D, KURTZ KM, ERICKSON GF. Insulin-like growth factor-I selectively stimulates cholesterol side-chain cleavage expression in ovarian theca-interstitial cells. *Molec Endoc* 1990; **4**: 489-496.
- [75] MARUO T, LADINES-LLAVE CA, SAMOTO T, MATSUO H, MANALO A, ITO H, MOCHIZUKI M. Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. *Endocrinology* 1993; **132**: 924-931.
- [76] MASSAGUE J. A helping hand from proteoglycans. *Current Biology* 1991; **1**: 117-119.
- [77] MASSAGUE J, CZECH MP. The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *J Biol Chem* 1982; **257**: 5038-5045.
- [78] MAY JV, BRIDGE AJ, GOTCHER ED, GANGRADE BK. The regulation of porcine theca cell proliferation in vitro: synergistic actions of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *Endocrinology* 1992; **131**: 689-697.

- [79] MAY JV, BUCK PA, SCHOMBERG DW. Epidermal growth factor enhances (125 I) iodo-follicle-stimulating hormone binding by cultured porcine granulosa cell. *Endocrinology* 1987; **120**: 2413-2420.
- [80] MAY JV, FROST JP, BRIDGE AJ. Regulation of granulosa cell proliferation: facilitative roles of platelet-derived growth factor and low density lipoprotein. *Endocrinology* 1990; **126**: 2896-2905.
- [81] MIYAMOTO A, OKUDA K, SCHWEIGERT FJ, SCHAMS D. Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- β and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *J Endocrinol* 1992; **135**: 103-114.
- [82] MONDSCHHEIN JS, CANNING SF, HAMMOND JM. Effects of transforming growth factor-b on the production of immunoreactive insulin-like growth factor-I and progesterone on 3H-thymidine incorporation in porcine granulosa cell cultures. *Endocrinology* 1988; **123**: 1970-1976.
- [83] MONDSCHHEIN JS, HAMMOND JM. Growth factors regulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by cultured porcine granulosa cell. *Endocrinology* 1988; **123**: 463-468.
- [84] MONDSCHHEIN JS, SCHOMBERG DW. Growth factors modulate gonadotropin receptor induction in granulosa cell cultures. *Science Wash* 1981; **211**: 1170-1180.
- [85] MONDSCHHEIN JS, SMITH SA, HAMMOND JM. Production of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by porcine granulosa cells: identification of IGFBP-2 and -3 and regulation by hormones and growth factors. *Endocrinology* 1990; **127**: 2298-2306.
- [86] MONGET P, MONNIAU D, DURAND P. Localization, characterization and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. *Endocrinology* 1989; **125**: 2486-2493.
- [87] MULHERON GW, SCHOMBERG DW. Rat granulosa cells express transforming growth factor- β type 2 messenger ribonucleic acid which is regulatable by follicle-stimulating hormone in vitro. *Endocrinology* 1990; **126**: 1777-1779.
- [88] MULHERON GW, BOSSERT NL, LAPP JA, WALMER DK, SCHOMBERG DW. Human granulosa-luteal and cumulus cell express TGF, type 1 and type 2 mRNA. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; **74**: 458-460.
- [89] NEUFELD G, FERRARA N, SCHWEIGERER L, MITCHELL R, GOSPODAROWICZ D. Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1987; **121**: 597-603.
- [90] OBASIOLU CCW, KHAN-DAWOOD FS, DAWOOD MY. Insulin-like growth factor I receptors in human corpora lutea. *Fertil Steril* 1992; **57**: 1235-1240.
- [91] OLIVER JE, AITMAN TJ, POWELL JF, WILSON CA, CLAYTON RN. Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology* 1989; **124**: 2671-2679.
- [92] PLEDGER WJ. Regulation of cell proliferation: serum growth factor control of ordered series of G_1 events. In *Control of Cell Growth and Proliferation*. New York 1985; 108-131.
- [93] RALL LB, SCOTT J, BELL GI, CRAWFORD RJ, PENSCHOW JD, NIALL HD, COGHIAN JP. Mouse preproepidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature Lond* 1985; **313**: 228-230.
- [94] RAMASHARMA K, CABRERA CM, LI CH. Identification of insulin-like growth factor-II in human seminal and follicular fluids. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **140**: 536-542.
- [95] RICHARDSON MC, GADD SC, MASSON GM. Augmentation by epidermal growth factor of basal and stimulated progesterone production by human luteinized granulosa cells. *J Endocrinol* 1989; **121**: 397-402.
- [96] ROY SK, GREENWALD GS. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. *Endocrinology* 1990; **126**: 1309-1317.
- [97] RUTANEN EM, PEKONEN F. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Acta Endocrinologica (Copenh)* 1990; **123**: 7-13.
- [98] SAMARAS SE, MONDSCHHEIN JS, BRYAN K, HAGEN D, HAMMOND JM. Growth hormone effects on ovarian function in gilts: changes in insulin-like growth factors and their binding proteins. *Biol Reprod* 1990; **42** (Supl 1): 126.
- [99] SCHAMS D, KOLL R, LI CH. Insulin-like growth factor-I stimulates oxytocin and progesterone production by bovine granulosa cells in culture. *J Endocrinol* 1988; **116**: 97-100.
- [100] SHAW G, JORGENSE GI, TWEEDALE R, TENISON M, WATERS MJ. Effect of epidermal growth factor on reproductive function of ewes. *J Endocrinol* 1985; **107**: 429-436.
- [101] SHIMASAKI S, GAO L, SHIMONAKA M, LING N. Isolation and molecular cloning of insulin-like growth factor-binding protein-6. *Mol Endocrinol* 1991; **5**: 938-948.
- [102] SHIMASAKI S, SHIMONAKA M, ZHANG H-P, LING N. Identification of five different insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) from adult rat serum and molecular cloning of a novel IGFBP-5 in rat and human. *J Biol Chem* 1991; **266**: 10646-10653.
- [103] SKINNER MK, COFFEY RJ. Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor- α by theca cells. *Endocrinology* 1988; **123**: 2632-2638.

- [104] SKINNER MK, KESKI-OJA J, OSTEEEN KG, MOSES HL. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor- β which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology* 1987; **121**: 786–792.
- [105] SPICER LJ, ALPIZAR E, ECHTERNKAMP SE. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J Anim Sci* 1993; **71**: 1232–1241.
- [106] SPICER LJ, ECHTERNKAMP SE, CANNING SF, HAMMOND JM. Relationship between concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in follicular fluid and various biochemical markers of differentiation in biovine antral follicles. *Biol Reprod* 1988; **39**: 573–580.
- [107] SPORN MB, ROBERTS AB, WAKEFIELD LM, ASSOIAN RK. Transforming growth factor- β : biological function and chemical structure. *Science Wash* 1986; **233**: 532–534.
- [108] ST-ARNAUD R, WALKER P, KELLY PA, LABRIE F. Rat ovarian epidermal growth factor receptors: characterization and normal regulation. *Mol Cell Endocrinol* 1983; **31**: 43–52.
- [109] STEINKAMPF MP, MENDELSON CR, SIMPSON ER. Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P-450 of human granulosa cell. *Mol Cell Endocrinol* 1988; **59**: 93–99.
- [110] STIRLING D, WATERMAN MR, SIMPSON ER. Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. *J Reprod Fertil* 1991; **91**: 1–8.
- [111] TAPANAINEN J, LEINONEN PJ, TAPANAINEN P, YAMAMOTO M, JAFFE RB. Regulation of human granulosa-luteal cell progesterone production and proliferation by gonadotropins and growth factors. *Fertil Steril* 1987; **48**: 576–580.
- [112] TAYLOR MJ, CLARK CL. Basic fibroblast growth factor inhibits basal and stimulated relaxin secretion by cultured porcine luteal cells: analysis by reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* 1992; **130**: 1951–1956.
- [113] TORNEY AH, HODGSON YM, FORAGE R, KRETZER DM. Cellular localization of inhibin mRNA in the bovine ovary by in situ hybridization. *J Reprod Fert* 1989; **86**: 391–399.
- [114] TRZECIAK WH, DUDA T, WATERMAN MR, SIMPSON ER. Effects of epidermal growth factor on the synthesis of the cholesterol side-chain cleavage enzyme complex in rat ovarian granulosa cells in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* 1987; **52**: 43–50.
- [115] TURNER IM, SAUNDERS PTK, SHIMASAKI S, HILLIER SG. Regulation of inhibin subunit gene expression by FSH and estradiol in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1989; **125**: 2790–2792.
- [116] VELDHIJS JD, FURLANETTO RW. Trophic actions of human somatomedin C\insulin-like growth factor I on ovarian cells: in vivo studies with swine granulosa cells. *Endocrinology* 1985; **116**: 1–8.
- [117] VELDHIJS JD, FURLANETTO RW, JUCHTER D, GARMEY J, VELDHIJS P. Trophic actions of human somatomedin C\insulin-like growth factor I on ovarian cells: in vitro studies with swine granulosa cells. *Endocrinology* 1985; **116**: 1235–1242.
- [118] VOUTILAINEN R, MILLER WL. Coordinate trophic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and cholesterol side-chain cleavage enzyme P450_{SCC} in human steroidogenic tissues. *Proc Nat Acad Sci USA* 1987; **84**: 1590–1594.
- [119] WILKINS JR, D'ERCOLE AJ. Affinity-labeled plasma somatomedin-C\insulin-like growth factor I binding proteins. *J Clin Invest* 1984; **75**: 1350–1358.
- [120] WOODRUFF TK, LYON RJ, HANSEN SE, RICE GC, HATHER JP. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology* 1990; **127**: 3196–3205.
- [121] YING SY. Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of FSH. *Endocr Rev* 1988; **9**: 267–293.
- [122] ZELEZNIK AJ, IHRIG LL, BASSETT SG. Developmental expression of Ca²⁺Mg²⁺-dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells. *Endocrinology* 1989; **125**: 2218–2220.
- [123] ZHIWEN Z, CARSON RS, HERRINGTON AS, LEE VWK, BURGER HG. Follicle stimulating hormone and somatomedin-C stimulate inhibin production by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 1987; **120**: 1633–1637.
- [124] ZHIWEN Z, HERRINGTON AC, CARSON RS, FINDLAY JK, BURGER HG. Direct inhibition of rat granulosa cell inhibin production by epidermal growth factor in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1987; **54**: 213–220.

Otrzymano: 23.11.1993 r.

Przyjęto: 08.02.199 r.

Adres autora: Instytut Fizjologii Zwierząt, Akademia Rolniczo-Techniczna,
ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn

SEKWENCJE ALFOIDALNE JAKO ELEMENT STRUKTURY CENTROMERU*

ALPHOID REPEATS AS A STRUCTURAL ELEMENT OF A CENTROMERE

Michał WITT

Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Streszczenie. W artykule zwięźle omówiono strukturę rodziny centromerowych sekwencji alfoidalnych, ze szczególnym uwzględnieniem sekwencji występujących w chromosomie Y człowieka. Wyszczególniono grupy białek wchodzących w specyficzne interakcje z tą rodziną powtarzających się sekwencji DNA oraz opisano dwa modele organizacji przestrzennej sekwencji alfoidalnych.

Słowa kluczowe: centromer, sekwencje alfoidalne

Summary. In this article a structure of centromeric alphoid repeats has been described with a special emphasis on alphoid repeats of human Y chromosome. Groups of proteins interacting with these repetitive sequences has been specified and two steric models of alphoid repeats has been presented.

Key words: centromere, alphoid repeats

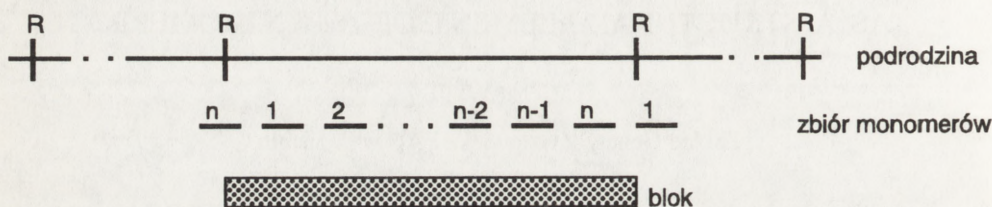
Centromer (przeważnie pierwotne) chromosomu ssaków składa się z trzech zasadniczych części; w kolejności od wewnątrz do zewnątrz centromeru są to:

- 1) domena parowania, w której obrębie dochodzi do interakcji chromatyd siostrzanych w metafazie,
- 2) domena centralna, składająca się głównie z powtarzających się sekwencji DNA,
- 3) domena kinetochorowa (kinetochor), mająca za zadanie interakcję z wrzecionem kariokinetycznym [9].

Około 5% genomu człowieka wypełnia rodzina powtarzających się sekwencji DNA, zwana sekwencjami alfoidalnymi lub satelitami α (*alphoid repeats*). Jest to jedyna znana rodzina sekwencji satelitarnych występujących wyłącznie w obrębie centromeru. Stanowi ona główny składnik domeny centralnej centromerów wszystkich chromosomów człowieka i

*Artykuł ten został napisany w ramach realizacji projektu badawczego nr 4 4734 92 03 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

całego rzędu naczelných [17]. Zasadniczą jednostką powtarzającą się w obrębie satelitów α jest monomer długości 171 bp. Określona liczba liniowo ułożonych monomerów tworzy chromosomowo specyficzną jednostkę strukturalną wyższego rzędu – blok [17]. Odpowiednia liczba kopii bloku tworzy region liniowych powtórzeń alfa satelitów (*tandem repeat array*), zwany inaczej podrodziną (*subfamily*). Do tej pory zidentyfikowano 33 różne podrodziny sekwencji alfoidalnych. Niektóre z tych podrodzin występują wyłącznie w jednym chromosomie, inne wchodziły w skład kilku różnych chromosomów. Ponadto niektóre chromosomy mają w swym centromerze tylko jedną podrodzinę alfa satelitów, podczas gdy inne zawierają tych podrodzin kilka [1].



Rys. Schemat hierarchicznej organizacji satelitów alfa: R – miejsce trawienia enzymem restrykcyjnym; 1, 2, ..., n-1, n – numeracja monomerów w bloku

Zróznicowanie sekwencji poszczególnych monomerów w obrębie jednego bloku jest znaczne i wynosi 20–40%, natomiast różnice sekwencji analogicznych monomerów różnych bloków w obrębie jednego chromosomu są bardzo niewielkie (2%). Blok taki zdefiniowany jest przez liczbę wchodzących w jego skład monomerów (wielkość bloku) oraz przez wzór trawienia określonym enzymem restrykcyjnym, uwidaczniającym go w postaci prążka hybrydacyjnego w metodzie Southerna. Cechą charakterystyczną chromosomu jest liczba kopii całego bloku oraz sekwencja nukleotydów całej podrodziny. Liczba kopii monomeru w obrębie bloku waha się w granicach od 5 (chromosom 11) do 32 (chromosom Y); wielkość bloku mieści się w przedziale od 0,68 kb (chromosom 18) do 5,5 kb (chromosom Y); liczba kopii bloku wynosi od 10 (chromosom 7) do 5 000 (chromosom X), cały region (podrodzina) zajmuje zaś od 100 kb (chromosom 7) do 10 000 kb (chromosom X) [17].

W przypadku np. sekwencji alfoidalnych chromosomu Y można stwierdzić, że monomery 171 bp wykazują bardzo niewielkie zróznicowanie sekwencji w obrębie jednego bloku – homologia struktury I-rzędowej wynosi tu ponad 99% [10]. Odpowiednia liczba kopii monomeru ($n = 32$) tworzy blok rozpoznawany przez enzym restrykcyjny EcoRI i ujawniający się w postaci prążka hybrydacyjnego wielkości 5,5 kb, specyficznego wyłącznie dla chromosomu Y [20]. W linii komórkowej 3E7 (komórki hybrydowe zawierające 4 kopie chromosomu Y) wykryto wariant bloku wielkości ok. 6,0 kb, zawierający dwa dodatkowe monomery 171 bp; bloki o takiej strukturze tworzyły w obrębie regionu sekwencji alfoidalnych dwa zgrupowania oddalone od siebie o ok. 90 kb [11]. Badania ilościowe wykazały, że blok 5,5 kb powtórzony jest w obrębie chromosomu Y od 100 do 500 razy. Potwierdzono centromerową

lokalizację fragmentu 5,5 kb, otrzymywanego przy użyciu restryktazy EcoRI, a wyselekcjonowanego z biblioteki genomowej DNA chromosomu Y badaniem z użyciem hybrydyzacji in situ komórek hybrydowych zawierających różne fragmenty chromosomu Y człowieka. Stwierdzono wprawdzie hybrydyzację krzyżową tego fragmentu z centromerami autosomów 13, 14 i 15 pary, jednakże żaden z tych chromosomów nie zawiera struktury organizacyjnej wyższego rzędu wielkości 5,5 kb. Udowodniono również, że sekwencje alfoidalne chromosomu Y nie wykazują dużego pokrewieństwa strukturalnego z sekwencjami alfoidalnymi chromosomu X [14,17].

Przy użyciu autoprzeciwciał surowicy krwi osób z chorobami reumatoidalnymi wykazano obecność kilku różnych białek w obszarze centromeru chromosomów. Białkom tym przypisuje się różne znaczenie w powiązaniu z zasadniczą funkcją centromeru chromosomów, tj. organizacją właściwego rozdziału chromosomów do komórek potomnych podczas podziału mito- i mejotycznego. Grupę tych białek nazwano CENP (*centromere proteins*) i dość dobrze scharakteryzowano: CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-D, INCENPs (*inner centromere proteins*) i CLIPs (*chromatid linking proteins*) [15]. Stwierdzono, że satelity α związane są z białkami centromerowymi w ciągu całego cyklu komórkowego [7]. Ponadto wykazano udział sekwencji alfoidalnych w formowaniu funkcjonalnego centromeru po transfekcji in vitro tychże sekwencji do komórek małpy [4]. Sugerować to może od dawna postulowany udział tej rodziny powtarzających się sekwencji w funkcji, a nie tylko strukturze centromeru. Okazało się, że CENP-B bezpośrednio wiąże się z fragmentem długości 17 bp, wchodzącym w skład monomeru sekwencji alfoidalnych (171 bp). Interakcję tę stwierdzono zarówno in vitro, jak in vivo, a fragment 17 bp nazwano *CENP-B box* [6]. Choć brak dotąd ostatecznego dowodu na udział zarówno CENP-B, jak i sekwencji alfoidalnych w funkcji centromeru warto dodać, że *CENP-B box* znaleziono również u myszy w obrębie tzw. mniejszych satelitów (*minor satellites*), będących w genomie myszy odpowiednikiem sekwencji alfoidalnych naczelnych [15].

W chwili obecnej przyjmowane są dwa modele organizacji przestrzennej sekwencji alfoidalnych [3]. W pierwszym z nich satelity centromerowe (sekwencje alfoidalne u naczelnych, satelity mniejsze u myszy) stanowią jeden ciągły element strukturalny na przestrzeni całego przewężenia pierwotnego. W drugim modelu region satelitów alfa nie stanowi ciągłej całości, ale „przetykany” jest innymi sekwencjami powtarzającymi się, koniecznymi dla właściwego funkcjonowania centromeru. W każdym z modeli sekwencje te mogą spełniać rolę czynnika odpowiedzialnego za inicjację organizacji kinetochoru poprzez regularne rozłożenie specyficznych miejsc rozpoznawczych dla białek CENP (np. *CENP-B box* czy jemu podobnych) wzdłuż włókna chromatynowego. Obydwa te modele są w pełni zgodne ze znacznie lepiej poznaną strukturą centromeru chromosomów drożdży *Schizosaccharomyces pombe*, wykazującymi wiele podobieństw do centromerów chromosomów u wyższych *Eucaryota* [2]. Z innych powtarzających się sekwencji satelitarnych, obecnych w centromerach chromosomów, wymienić można np.: klasyczne satelity I, II i III [8], satelity α [12], konserwatywne sekwencje (GGAAT)_n [3], sekwencje powtarzające się bogate w pary A-T (ATRS, *AT-rich sequences*) [13], czy satelity sn5 [5]. Jednak w przeciwieństwie do sekwencji alfoidalnych wymienione sekwencje satelitarnie ani nie występują we wszystkich bez wyjątku chromosomach, ani lokalizacyjnie nie zawsze związane są wyłącznie z regionami pericentromerowymi chromosomów [16].

Ze względu na swą specyficzną chromosomową sekwencję alfoidalne obecnie chętnie są używane jako narzędzie do identyfikacji poszczególnych chromosomów [18], w badaniach struktury chromosomów [19] oraz w analizie sprzężeń [1].

LITERATURA

- [1] CHOO KH, VISSSEL B, NAGY A, EARLE E, KALITSIS P. A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA on all the human chromosomes, and derivation of a new consensus sequence. *Nucleic Acids Res* 1992; **19**: 1179–1182.
- [2] CLARKE L. Centromeres of budding and fission yeasts. *Trends Genet* 1990; **6**: 150–154.
- [3] GRADY DL, RATLIFF RL, ROBINSON DL, MCCANLIES EC, MEYNE J, MOYZIS RK. Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 1695–1699.
- [4] HAAF T, WARBURTON PE, WILLARD HF. Integration of human alpha-satellite DNA into simian chromosomes: centromere protein binding and disruption of normal chromosome segregation. *Cell* 1992; **70**: 681–696.
- [5] JOHNSON DH, KROISEL PM, KLAPPER HJ, ROSENKRANZ W. Microdissection of a human marker chromosome reveals its origin and a new family of centromeric repetitive DNA. *Hum Molec Genet* 1992; **1**: 741–747.
- [6] MASUMOTO H, MASUKATA H, MURO Y, NOZAKI N, OKAZAKI T. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol* 1989; **109**: 1963–1973.
- [7] MASUMOTO H, SUGIMOTO K, OKAZAKI T. Alphoid satellite DNA is tightly associated with centromere antigens in human chromosomes throughout the cell cycle. *Exp Cell Res* 1989; **181**: 181–196.
- [8] PROSSER J, FROMMER M, PAUL C, VINCENT PC. Sequence relationships of three human satellite DNAs. *J Mol Biol* 1985; **187**: 145–155.
- [9] RATTNER JB. The structure of the mammalian centromere. *BioEssays* 1991; **13**: 51–56.
- [10] TYLER-SMITH C. Structure of repeated sequences in the centromeric region of the human Y chromosome. *Development* 1987; **101** Suppl.: 93–100.
- [11] TYLER-SMITH C, BROWN WRA. Structure of the major block of alphoid satellite DNA on the human Y chromosome. *J Mol Biol* 1987; **195**: 457–470.
- [12] WAYE JS, WILLARD HF. Human α satellite DNA: Genomic organization and sequence definition of a class of highly repetitive tandem DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 6250–6254.
- [13] WEVRICK R, WILLARD VP, WILLARD HF. Structure of DNA near long tandem arrays of alpha satellite DNA at the centromere of human chromosome 7. *Genomics* 1992; **14**: 912–923.
- [14] WILLARD HF. Molecular organization of repeated DNA sequences on the human Y chromosome. [W] The Y Chromosome, Part A: Basic Characteristics of the Y Chromosome. AA.Sandberg (red.), Alan R. Liss, Inc., New York, 1985; 125–140.
- [15] WILLARD HF. Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends Genet* 1990; **6**: 410–416.
- [16] WILLARD HF. Centromeres – primary constrictions are primarily complicated. *Hum Molec Genet* 1992; **1**: 667–668.
- [17] WILLARD HF, WAYE JS. Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends Genet* 1987; **3**: 192–198.
- [18] WITT M, ERICKSON RP. A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1989; **82**: 271–274.
- [19] WITT M, MICHALCZAK K, LATOS-BIELEŃSKA A, JARUZELSKA J, KUCZORA I, LOPEZ M. An improved, non-isotopic method of screening cells from patients with abnormalities of sexual differentiation for Y-chromosomal DNA content. *J Med Genet* 1993; **30**: 304–307.
- [20] WOLFE J, DARLING SM, ERICKSON RP, CRAIG IW, BUCKLE VJ, RIGBY PWJ, WILLARD HF, GOODFELLOW PN. Isolation and characterization of an alphoid centromeric repeat family from the human Y chromosome. *J Mol Biol* 1985; **182**: 477–485.

Otrzymano: 20.01.1994 r.

Przyjęto: 02.03.1994 r.

Adres autora: Zakład Genetyki Człowieka PAN, 60-479 Poznań, ul. Strzeszyńska 32.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

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

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

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

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

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

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

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać 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.

Redakcja wysoko sobie ceni przysyłanie tekstów prac na dyskietce. Ułatwia to i przyspiesza przygotowanie artykułu do druku. Bardzo pożądaną jest załączenie wydruku danych cyfrowych zamieszczanych na wykresach, gdyż wtedy łatwiej jest przygotować je komputerowo.

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

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

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

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

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

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

TREŚĆ

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| W tym Zeszytcie Postępów Biologii Komórki | 1 |
| HRABEC E., PŁUCIENNICZAK A.: Heterogenność histonów H1 ssaków | 3 |
| MAŁUSZYŃSKA J.: Chromosom B – pasożyt czy funkcjonalny składnik genomu? | 15 |
| KILIAŃSKA Z.: Matriks jądrowa. I. Izolowanie, skład chemiczny i ultrastruktura | 27 |
| KOPIECZNA-GRZEBIENIAK E., TARNAWSKI R., GRABOWSKA-BOCHENEK R.: Trombocyty a miażdżycza | 43 |
| WCISŁO G., SZWECH P.: Czynniki pobudzający kolonie-1 (CSF-1) – właściwości i zastosowanie kliniczne | 53 |
| GRABOWSKA-BOCHENEK R., ADAMCZAK M.: Fizjologiczna regulacja aktywności endoteliny: typy receptorów i przenoszenie sygnału | 69 |
| KAMIŃSKI T., PRZAŁA J.: Czynniki wzrostowe w jajniku | 79 |
| WITT M.: Sekwencje alfoidalne jako element struktury centromeru | 93 |

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. zostały 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, ukazał 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